

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291866** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.07

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.01.08

---

(54) **АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ЭПИТЕЛИАЛЬНОМУ КАДГЕРИНУ**

---

(31) 20151325.6

(32) 2020.01.10

(33) EP

(86) PCT/NL2021/050009

(87) WO 2021/141492 2021.07.15

(71) Заявитель:

**КЛИНГ БИОТЕРАПЬЮТИКС Б.В.**  
(NL)

(72) Изобретатель:

**Бомонт Тим, Мерат Сабрина Джулия  
Луиза, Кваккенбос Марк Йерун, Кедде  
Мартейн, Спитс Херген (NL)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к антителам, специфичным к эпителиальному кадгерину, а также к их применениям в диагностике и лечении таких заболеваний, как рак.

**202291866**  
**A1**

**202291866**

**A1**

# АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ЭПИТЕЛИАЛЬНОМУ КАДГЕРИНУ

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к областям биологии, медицины и  
5 иммунологии.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Трансмембранный белок эпителиальный кадгерин (Е-кадгерин; также  
известный, среди прочего, как CD324, кадгерин-1, САМ 120/80 и увоморулин) является  
10 членом надсемейства кадгеринов. Е-кадгерин известен в данной области техники как  
кальций-зависимый гликопротеин межклеточной адгезии с молекулярной массой  
около 120 кДа, состоящий из пяти внеклеточных кадгериновых (ЕС) повторов (ЕС1-  
ЕС5), трансмембранной области и высококонсервативного цитоплазматического хвоста.  
Е-кадгерин является важным типом белка межклеточной адгезии, плотно  
15 удерживающим вместе эпителиальные клетки. Понижающая регуляция Е-кадгерина  
снижает силу клеточной адгезии в ткани, что может привести к увеличению клеточной  
подвижности и эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП). Утрата функции или  
экспрессии Е-кадгерина была связана с прогрессированием рака и метастазированием.

## 20 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретения предложены антитела, специфичные к Е-  
кадгерину, и их антигенсвязывающие фрагменты, обладающие структурными и  
функциональными признаками, указанными в настоящем документе.

25 В различных вариантах осуществления изобретения предложено антитело или  
его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связывают один или более О-  
маннозилированных остатков треонина Е-кадгерина, где указанные один или более О-  
маннозилированных остатков треонина присутствуют в положениях аминокислот 467-  
472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В предпочтительных  
30 вариантах осуществления на связывание указанного антитела или  
антигенсвязывающего фрагмента с указанным Е-кадгерином влияет присутствие  
остатка О-маннозилированного треонина в положении 467, остатка О-  
маннозилированного треонина в положении 468, остатка О-маннозилированного  
треонина в положении 470, остатка О-маннозилированного треонина в положении 472,  
35 остатка глутаминовой кислоты в положении 463, остатка серина в положении 465,  
остатка серина в положении 469 и/или остатка валина в положении 477  
последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А, в частности, наличие

остатка О-маннозилированного треонина в положении 467, и/или остатка О-маннозилированного треонина в положении 468, и/или остатка О-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанный остаток серина в положении 465 и/или 469 является О-маннозилированным. В предпочтительных вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа лучше, чем О-маннозилированный полноразмерный Е-кадгерин. В предпочтительных вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа по меньшей мере в 2 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 3 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 4 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз лучше, чем О-маннозилированный полноразмерный Е-кадгерин.

15 В различных вариантах осуществления изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или более и необязательно каждое из следующего:

а. CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $GFX_1FSX_2AW$ , где  $X_1$  представляет собой Т или I и где  $X_2$  представляет собой N или Y; или CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $GFX_1FSX_2AW$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

25 б. CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $IKSKIDG X_1T X_2$ , где  $X_1$  представляет собой G или E, и где  $X_2$  представляет собой Т или I; или CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $IKSKIDG X_1T X_2$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

30 в. CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $TPGVGX_1NX_2PYYFDR$ , где  $X_1$  представляет собой А или Т и где  $X_2$  представляет собой D или N; или CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $TPGVGX_1NX_2PYYFDR$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

- d. CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QSVLCRSNNKNC;  
или CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  
5 QSVLCRSNNKNC 1, 2 или 3 консервативными заменами;
- e. CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WAX<sub>1</sub>, где X<sub>1</sub> представляет собой S или C;  
или CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности WAX<sub>1</sub> 1, 2 или 3  
10 консервативными заменами;
- f. CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYSNTPQT;  
или CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности QQYSNTPQT 1,  
15 2 или 3 консервативными заменами.

В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VH, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VL, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22, как представлено в таблице 1. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по  
25 меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по  
30 меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.  
Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами областей CDR.

В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело.

5 В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgA. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно  
10 настоящему изобретению относится к изотипу IgM. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgD. В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческий IgA, IgM или IgD.

15 В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgG. В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно IgG1. В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой  
20 человеческий IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно человеческий IgG1.

В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению являются афукозилированными.

В отдельных вариантах осуществления предложено антитело или его  
25 антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующие с антителом, выбранным из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно  
30 с O-маннозилированным усеченным E-кадгерином массой 70 кДа.

В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению обладает одной или более, и предпочтительно каждой из следующих характеристик:

35 - связывается с 3 внеклеточным (ЕС3) доменом O-маннозилированного E-кадгерина;

- связывает О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа лучше, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 3 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 4 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз лучше, чем О-маннозилированный полноразмерный Е-кадгерин; и

- связывает опухолевые клетки, коэкспрессирующие Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик:

- связывает подтипы рака толстой кишки CMS1, CMS2, CMS3 и CMS4;

- связывает линию клеток карциномы толстой кишки SW948 лучше, чем здоровые медуллярные эпителиальные клетки тимуса, или дендритные клетки, или клетки Лангерганса.

В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению связаны с другим соединением. В отдельных вариантах осуществления указанное другое соединение представляет собой терапевтическое соединение. В отдельных вариантах осуществления указанное другое соединение представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из иммуномодулирующего соединения, соединения, связывающегося с Т-клетками, соединения, связывающегося с естественными клетками-киллерами (НК-клетками), соединения, связывающегося с естественными киллерными Т-клетками (НКТ-клетками), соединения, связывающегося с гамма-дельта Т-клетками, CD3-специфичного связывающего соединения, TGF $\beta$ -специфичного связывающего соединения, цитокина, второго антитела или его антигенсвязывающей части, детектируемой метки, лекарственного средства, химиотерапевтического препарата, цитотоксического средства, токсического фрагмента, гормона, фермента и радиоактивного соединения. В некоторых вариантах осуществления указанное иммуномодулирующее соединение не является Fc-хвостом антитела согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанное иммуномодулирующее соединение представляет собой неприродное иммуномодулирующее соединение.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, которые напрямую или опосредованно связаны с терапевтическим соединением, также

называются в настоящем документе конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) согласно изобретению.

5 Изобретение также относится к биспецифичному или мультиспецифичному связывающему соединению, предпочтительно биспецифичному или мультиспецифичному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащему:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению; и
- иммуномодулирующее соединение.

10 В некоторых вариантах осуществления указанное иммуномодулирующее соединение не является Fc-хвостом антитела согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанное иммуномодулирующее соединение представляет собой неприродное иммуномодулирующее соединение.

15 Изобретение также относится к биспецифичному или мультиспецифичному связывающему соединению, предпочтительно биспецифичному или мультиспецифичному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащему:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению; и
- 20 - соединение, связывающееся с Т-клетками, или соединение, связывающееся с естественными клетками-киллерами (НК-клетками), или соединение, связывающееся с естественными киллерными Т-клетками (НКТ-клетками), или соединение, связывающееся с гамма-дельта Т-клетками.

25 Изобретение также относится к биспецифичному или мультиспецифичному связывающему соединению, предпочтительно биспецифичному или мультиспецифичному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащему:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению; и
- 30 - CD3-специфичное связывающее соединение.

35 Изобретение также относится к биспецифичному или мультиспецифичному связывающему соединению, предпочтительно биспецифичному или мультиспецифичному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащему:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению; и

- KLRG1-специфичное связывающее соединение.

Изобретение также относится к биспецифичному или мультиспецифичному связывающему соединению, предпочтительно биспецифичному или

5 мультиспецифичному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащему:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению; и
- CD103-специфичное связывающее соединение.

10 Изобретение также относится к биспецифичному или мультиспецифичному связывающему соединению, предпочтительно биспецифичному или мультиспецифичному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащему:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению; и
- 15 - TGF $\beta$ -специфичное связывающее соединение.

Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

- 20 - один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и
- один Fab-фрагмент другого антитела, предпочтительно специфичного к Т-клетке, NK-клетке, NKT-клетке или гамма-дельта Т-клетке.

25 Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

- один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и
- 30 - один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к CD3.

Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

- 35 - один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и

- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к KLRG1 или CD103.

Также предложено биспецифичное антителу или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие:

- один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и
- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к TGF $\beta$ .

В отдельных вариантах осуществления предложена T-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR), которая способна связывать O-маннозилированный E-кадгерин, где указанная CAR-T-клетка содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела согласно изобретению. Указанная CAR-T-клетка предпочтительно также содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела согласно изобретению. Предпочтительно указанные последовательности CDR1-3 присутствуют на поверхности указанной CAR-T-клетки в одноцепочечном формате.

Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, обладающим структурными и функциональными признаками, указанными в настоящем документе. В различных вариантах осуществления изобретения предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая антителу или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, или кодирующая по меньшей мере переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению.

В отдельных вариантах осуществления предложена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-39; и/или содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-44, как представлено в таблице 1. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%,

более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более  
5 предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.  
Предпочтительно указанные вариации последовательностей расположены за пределами областей CDR.

10 В отдельных вариантах осуществления нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению содержит ДНК или РНК.

В отдельных вариантах осуществления нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению содержит кДНК, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), закрытую нуклеиновую кислоту (LNA) или спираль ДНК/РНК.

15 В отдельных вариантах осуществления нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке-хозяине, не являющейся клеткой человека.

В отдельных вариантах осуществления нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках  
20 HEK293T или клетках CHO.

Изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанный вектор представляет собой CAR-T-клеточный вектор, содержащий последовательность  
25 нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенраспознающий домен и домен активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления указанный CAR-T-клеточный вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен.

30 Изобретение также относится к выделенной или рекомбинантной клетке-хозяину или отличному от человека животному, содержащим антитело, антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, ADC или CAR-T-клетку согласно настоящему изобретению. В отдельных вариантах осуществления указанная  
клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, бактериальную клетку,  
35 растительную клетку, клетку HEK293T или клетку CHO.

Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело, антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, ADC, CAR-T-клетку или клетку-хозяина согласно настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая также содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Изобретение также относится к составному набору, содержащему антитело, антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, ADC, CAR-T-клетку или клетку-хозяина согласно изобретению.

В отдельных вариантах осуществления композиция или составной набор согласно изобретению дополнительно содержит по меньшей мере одно другое терапевтическое средство.

Изобретение также относится к способу получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор согласно изобретению, и предоставление возможности указанной клетке-хозяину транскрибировать указанную нуклеиновую кислоту или вектор, тем самым продуцируя указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Указанный способ предпочтительно дополнительно включает выделение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента из указанной клетки-хозяина и/или из культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-хозяин снабжена вектором, который содержит как последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь указанного антитела, так и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-хозяин снабжена по меньшей мере двумя разными векторами, где один вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь указанного антитела, а второй вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь указанного антитела.

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, полученные способом согласно изобретению.

Изобретение также относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, или биспецифичному антителу, или мультиспецифичному антителу, или ADC, или CAR-T-клетке, или нуклеиновой кислоте, или вектору, или клетке-хозяину согласно изобретению для применения в качестве лекарственного средства, или  
5 профилактического средства, или диагностического средства.

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения расстройства,  
10 связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанное расстройство представляет собой E-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак. В некоторых вариантах осуществления указанный рак также содержит опухолевые клетки, которые  
15 экспрессируют TGF $\beta$ .

В различных вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота,  
20 или вектор, или клетка-хозяин для применения согласно изобретению, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетку, или нуклеиновую кислоту, или вектор, или клетку-хозяина комбинируют с другим терапевтическим средством, эффективным для лечения и/или предотвращения расстройства, связанного с  
25 клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

Изобретение также относится к применению антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или  
30 мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению для изготовления лекарственного средства.

Также предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или  
35 CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения или

предотвращения расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу. В частных вариантах осуществления указанные клетки представляют собой опухолевые клетки. В частных вариантах осуществления указанная О-маннозилтрансфераза представляет собой ТМТСЗ. Также предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения или предотвращения Е-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака. В частных вариантах осуществления указанный Е-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак представляет собой эпителиальный рак. В некоторых вариантах осуществления указанный Е-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак выбран из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходноклеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза.

В некоторых вариантах осуществления указанный Е-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

Изобретение также относится к способу лечения и/или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества

антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и/или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению, и/или нуклеиновой кислоты согласно изобретению, и/или вектора или клетки согласно изобретению, и/или композиции или составного набора согласно изобретению. Также предложен способ по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного рака, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и/или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению, и/или нуклеиновой кислоты согласно изобретению, и/или вектора или клетки согласно изобретению, и/или композиции или составного набора согласно изобретению. Указанная композиция предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию согласно изобретению.

Изобретение также относится к применению антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению для определения того, содержит ли образец клетки, предпочтительно опухолевые клетки, содержащие O-маннозилированный E-кадгерин.

Также предложен способ определения наличия в образце клеток, предпочтительно опухолевых клеток, содержащих O-маннозилированный E-кадгерин, где способ включает:

- приведение указанного образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению, и
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки с клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, присутствуют ли в указанном образце клетки, содержащие O-

маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно опухолевые клетки, содержащие O-маннозилированный E-кадгерин.

Также предложен способ определения наличия в образце клеток, предпочтительно опухолевых клеток, экспрессирующих E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно TMTСЗ, где способ включает:

- приведение указанного образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению, и
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно TMTСЗ, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, присутствуют ли в указанном образце клетки, предпочтительно опухолевые клетки, экспрессирующие E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно TMTСЗ.

Изобретение также относится к способу определения того, страдает ли индивидуум, являющийся человеком или отличный от человека, раком, положительным на O-маннозилированный E-кадгерин, где способ включает:

- приведение опухолевых клеток указанного индивидуума в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению,
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки с опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли опухолевые клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, страдает ли указанный индивидуум раком, положительным на O-маннозилированный E-кадгерин.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ представляет собой способ *ex vivo*. В других вариантах осуществления указанный способ осуществляют *in vivo*.

5

## ГРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. (А) Показана полноразмерная аминокислотная последовательность Е-кадгерина (Uniprot Q9UII7), включая нумерацию, используемую по всему тексту описания. (В) Указаны различные домены Е-кадгерина. Взято из Berx et al. Genomics 10 1995. Красным цветом обозначен предполагаемый эпитоп связывания АТ1636. (С) Показан усеченный белок массой 70 кДа, также обозначенный в примерах как р70, с трансмембранным (курсивом) и внутриклеточным доменами.

Фиг. 2. (А) SDS-PAGE, в котором осуществляли разделение образцов иммунопреципитатов антител АТ1002 и АТ1636. Стрелки обозначают белковые «полосы», которые были иммунопреципитированы с помощью АТ1636 и проанализированы с помощью масс-спектрометрии, ЖКТ = Jurkat, отрицательная контрольная Т-клеточная линия, DLD1 представляет собой клеточную линию карциномы толстой кишки, М = маркер молекулярной массы, IP = иммунопреципитация и АТ1002 - антитело отрицательного контроля. (В) Вестерн-блот, демонстрирующий иммунопреципитацию полноразмерного Е-кадгерина кроличьим антителом EP700Y (Abscam) и антителом, специфичным к С-концевому внутриклеточному домену (BD Biosciences), а также иммунопреципитацию белка р70 20 посредством АТ1636 из клеток DLD1. EP700Y; связывается с *внеклеточным* мембранно-проксимальным доменом EC5; C-tail intra, мышинное антитело к Е-кадгерину, специфичное к С-концевому внутриклеточному домену Е-кадгерина (BD Bioscience), которое также использовалось для обнаружения, и АТ1636 взаимодействует с эпитопом, который избирательно экспонируется на форме р70 Е-кадгерина.

30

Фиг. 3. Графическое представление полноразмерного и усеченного Е-кадгерина р70. Указатели в форме леденцов обозначают известные сайты гликозилирования О-маннозы (Larsen PNAS (2017) и Vester-Christensen, PNAS (2013)), в то время как темно-серые указатели в форме леденцов обозначают предполагаемые сайты гликозилирования О-маннозы, а светло-серые указатели в форме леденцов обозначают потенциально маннозиллированные сайты, которые обнаружили авторы изобретения с 35

помощью масс-спектрометрии E-кадгерина р70, иммунопреципитированного AT1636. Аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, важны для связывания AT1636, что было установлено посредством сканирования аланином. Известно, что остатки 472 и 474 в верхнем регистре являются O-маннозилированными, а 470

5     предположительно будет маннозилированным, как описано Larsen et al 2017 и Vester-Christensen et al 2013. В полноразмерном E-кадгерине (вверху) изображены области связывания антител SC10.17 (моноклональные антитела к CD324 и их применения, US9534058 (B2)) и EP700Y, а также область связывания  $\beta$ -катенина.

10    Фиг. 4. Проточный цитометрический анализ связывания AT1636 с клетками DLD1, предварительно обработанными различными ингибиторами. Показаны гистограммы (сплошные линии, незакрашенная гистограмма) AT1636 и контрольных антител AT1002 и EP700Y в концентрации 5 мкг/мл на клетках DLD1, предварительно

15    обработанных в течение 48 часов ингибиторами Mann (ингибитор маннозилтрансферазы: 4-оксо-2-тиоксо-3-тиазолидинилуксусная кислота (Sigma)) или CMK (фурин, включающий ингибитор конвертаз: деканоил-RVKKR-CMK (Tocris)). Закрашенные гистограммы обозначают связывание с необработанными клетками.

Фиг. 5. (А) Отбор и выделение субклонов (красный прямоугольник) с повышенным связыванием с рекомбинантным белком E-кадгерин по сравнению со средним связыванием родительского клона E-кадгерина, 7G02. Клетки окрашивали рекомбинантными белками E-кадгерина и IgG(H+L)-Alexa647 и антителом против мышиного Fc-PE. Клонирование отдельных клеток гейтированных клеток проводили с помощью сортировщика клеток (FACS ARIA, BD). (В) Отбор субклонов с повышенным

20    связыванием антигена E-кадгерина по сравнению с родительским клоном 7G02. Родительские клетки AT1636 с низким уровнем GFP смешивали с субклональными клетками с высоким уровнем GFP. Эту смесь клеток окрашивали на связывание E-кадгерина и экспрессию BCR. Показана интенсивность связывания антигена, связанная с экспрессией BCR субклонов (синий) по сравнению с родительскими

25    клетками 7G02 (оранжевый).

30

Фиг. 6. (А) Показаны кривые связывания высокоаффинных вариантов AT1636 и AT1636 с линией клеток CRC человека DLD1, линией клеток эпителия молочной железы MCF10a и линией клеток CRC мыши CMT93, обнаруженные с помощью

35    проточной цитометрии (обозначена средняя интенсивность флуоресценции (MFI) красителя Alexa647, конъюгированного с козьим вторичным античеловеческим

антителом (Invitrogen)). Антитела EP700Y и SC10.17 не обладают перекрестной реактивностью с E-кадгерином мыши. (B) Указано отношение связывания вариантов AT1636 и AT1636–YN и –YN с контрольным антителом AT1002, определенное с помощью проточной цитометрии на линии клеток эпителия кожи A431, линии клеток легкого A546 и линии мышечных клеток CMT93.

Фиг. 7. (A) SPR-связывание AT1636, вариантов AT1636–NY и –YN с растворимым E-кадгерином p70. 5,0 мкг/мл антитела вводили в пятно, иммобилизованное 2,0 мкг/мл E-кадгерина p70. В качестве контроля использовали кроличьи антитела против E-кадгерина человека EP700Y, специфичные в отношении домена EC5. Связывание выявляют с помощью анализа ELISA с мультиплексной SPR-визуализацией IBIS (B) для определения связывания AT1636 и варианта AT1636–YN с рекомбинантным иммобилизованным полноразмерным E-кадгерином (левая панель), E-кадгерином p70 (средняя панель) и доменом D3 E-кадгерина, содержащим замену M470A (предотвращающую маннозилирование этого остатка) (правая панель). Антитело SC10.17 использовали в качестве контрольного антитела для связывания с полноразмерной формой (домен EC1), но не с доменами p70 и D3. AT1002 представляет собой человеческое антитело отрицательного контроля, специфичное к вирусу гриппа. (C) Анализ ELISA с использованием широкого диапазона концентраций AT1636 и его вариантов для связывания с рекомбинантным иммобилизованным полноразмерным E-кадгерином (левая панель), E-кадгерином p70 (средняя панель) и доменом D3 E-кадгерина, содержащим замену M470A (предотвращающую маннозилирование этого остатка) (правая панель). AT1002 представляет собой человеческое антитело отрицательного контроля, специфичное к вирусу гриппа.

Фиг. 8. (A) Вестерн-блоттинг, демонстрирующий исходный образец и элюат (FT) после иммунопреципитации AT1636 и специфического элюирования p70 из иммунопреципитатов AT1636 с использованием высоких уровней маннопиранозида. (B) ELISA, демонстрирующий связывание AT1636 с полноразмерным E-кадгерином (Sino Biological), полученным из клеток HEK (левая панель), и отсутствие связывания AT1636 с E-кадгерином, полученным из *E. coli* (Lsbio) (правая панель). E-кадгерин, продуцируемый *E. coli*, распознается антителом EP700Y.

Фиг. 9. Замена аланином в домене EC3 (D3) усеченного E-кадгерина p70 выявляет несколько аминокислот, которые необходимы для связывания AT1636. Связывание AT1636 с рекомбинантными слитыми белками небольшого масштаба D3-FLAG-

мышинный Fc изучали с помощью ELISA при захвате антимышиного Fc. Все белки были экспрессированы в одинаковых количествах в культуральных супернатантах, а связывание D3-дикий тип установлено равным 1, и все они нормированы для обнаружения анти-FLAG.

5

Фиг. 10. Изображенный вычислительный анализ представляет собой комбинированную экспрессию мРНК ТМТС3 и E-кадгерина в нескольких опухолеспецифических линиях клеток; в середине круга указано количество линий опухолевых клеток, включенных на тип ткани. Светло-серым цветом показан процент линий опухолевых клеток, которые имеют высокий ( $\geq 7$  раз) уровень экспрессии как E-кадгерина, так и ТМТС3 и, таким образом, предполагается, что они будут распознаны АТ1636. Пороговое значение 7 было выбрано на основании анализа проточной цитометрии, который показал, что такие линии клеток могут связываться с антителом АТ1636, см. таблицу 3. Ткани, в норме отрицательные как на ТМТС3, так и на E-кадгерин, представляют собой гемопоэтическую и лимфоидную ткани, кости и мягкие ткани (данные Института Брода: <https://portals.broadinstitute.org/ccle>, J. Barretina, Nature (2012)).

10

15

20

25

Фиг. 11. Проточный цитометрический анализ, свидетельствующий об увеличении связывания АТ1636 с клетками SK-MEL-5, трансдуцированными конструкцией, содержащей полноразмерный E-кадгерин. SK-MEL-5 обычно отрицательны по E-кадгерину, но экспрессируют ТМТС3. АТ1636 (сплошная линия) не связывается с SK-MEL-5 (слева), но связывается при сверхэкспрессии E-кадгерина (в центре). Также EP700Y (справа) теперь связывает SK-MEL-5. Светло-серая кривая — фоновое окрашивание изотипического контроля.

30

Фиг. 12. Индуцированный кшРНК нокдаун ТМТС3 приводит к уменьшению связывания АТ1636, как следует из данных проточной цитометрии. Помимо контрольного рандомизированного вектора кшРНК, был разработан и испытан зонд кшРНК, нацеленный на ТМТС3. Экспрессия ТМТС3 сильно снижена, как следует из данных количественной ПЦР (слева). Нокдаун ТМТС3 привел к более чем 3-кратному снижению связывания АТ1636 (правая панель, сплошная линия).

35

Фиг. 13. (А) графическое изображение структуры одновалентного рекрутера Т-клеток (mTCE), состоящего из АТ1636 или АТ1636-IYN, слитых с анти-CD3 UCNT1. (В) Соединения тестировали в 2D-модели клеточной культуры, где люциферазные и GFP-

положительные линии клеток CRC DLD1, HT29 и HCT116 культивировали в течение ночи в количестве 5000 клеток/лунка (96 лунок) перед инкубацией в течение 2 дней со суммарными нестимулированными МНПК в качестве эффекторных клеток. Клеточную цитотоксичность устанавливали измерением экспрессии люциферазы в течение 48 часов. (C) Графическое представление структуры одновалентного биспецифичного формата выступ-во-впадину (KiH) как для AT1636, AT1636-IYN или AT1002, так и для scFv к CD3ε, происходящего из антитела UCST1. (D) Соединения были протестированы в 2D-модели клеточной культуры, где люцифераза- и GFP-положительные линии клеток CRC DLD1 и HT29 и линию клеток меланомы A375 культивировали в течение ночи в количестве 5000 клеток/лунка (96 лунок) перед инкубацией с биспецифичными одновалентными AT1636, AT1636-IYN и AT1002 с UCST1 scFv CD3ε формата KiH и затем культивировали в течение 2 дней с нестимулированными суммарными МНПК в качестве эффекторных клеток. Клеточную цитотоксичность оценивали путем измерения активности люциферазы в конце 48-часового периода инкубации.

Фиг. 14. Стабильная сверхэкспрессия E-кадгерина p70 и полноразмерного E-кадгерина в линиях клеток, обычно экспрессирующих E-кадгерин (DLD1, HCT116 и HT29), и клетках, обычно отрицательных по E-кадгерину (SK-MEL-5). В левом столбце показаны клетки, трансдуцированные пустым вектором. При сверхэкспрессии E-кадгерина p70 все клетки демонстрируют морфологический фенотип деадгезии (свидетельствующий о фенотипе ЭМП).

Фиг. 15. Проточный цитометрический анализ связывания AT1636 с клетками DLD1, культивируемыми в течение длительного периода с TGFβ, по сравнению с клетками, культивируемыми в отсутствие TGFβ.

Фиг. 16. Снижение роста клеток и количества клеток после добавления TGFβ и AT1636-IYN. (A) Культуры клеток A431 в отсутствие и в присутствии TGFβ и AT1636 и варианта AT1636-IYN. На панели верхнего ряда показаны клетки A431, культивированные в течение 5 дней на обработанном пластике для культивирования тканей, на панели нижнего ряда показаны клетки A431, культивированные на покрытом фибронектином пластике, с использованием 10-кратного увеличения. На левых панелях показаны клетки, культивированные в культуральной среде, на средних панелях в присутствии TGFβ и справа с TGFβ и AT1636-IYN. В лунках, культивируемых в присутствии TGFβ и AT1636-IYN, наблюдалось меньше

(жизнеспособных) клеток и меньше адгезивных клеток. Не наблюдалось никаких различий между клетками, культивируемыми в пластиковых или покрытых фибронектином планшетах, и не наблюдалось эффекта для AT1636-wt или контрольного антитела AT1002 (не показано). (B) Подробный репрезентативный обзор с использованием 20-кратного увеличения клеток A431, культивируемых в лунках, покрытых фибронектином, после культивирования в течение 7 дней в присутствии TGF $\beta$  (левая панель) и TGF $\beta$  и AT1636-IYN (правая панель). На правой панели наблюдаются больше округлых умирающих одиночных клеток и меньше адгезивных клеток.

10

Фиг. 17. Анализ динамики интернализации AT1636 и его вариантов в клетках DLD1, обнаруженных с помощью флуоресцентного микроскопа (Incucyte) с использованием pH-чувствительного красителя Zenon pHrodo iFL. Все антитела, кроме отрицательного контроля AT1002, интернализуются.

15

Фиг. 18. Указано покрытие клеточной поверхности меченых CFSE CD103+ Т-клеток, инкубированных на связанных с планшетом полноразмерным E-кадгерине и белке E-кадгерине p70 после инкубации с AT1636 и его вариантами и CD103-специфичным антителом (MCA708).

20

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**Е-кадгерин**

5 Е-кадгерин у человека кодируется геном CDH1, также известным как CD324. Аминокислотная последовательность Е-кадгерина человека, известная в настоящее время, представлена на фиг. 1А. Е-кадгерин представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 120 кДа, локализующийся в зоне слипания эпителиальных клеток. Е-кадгерин является членом большого семейства кадгеринов, 10 которые можно разделить на несколько подтипов: классические кадгерины I типа, такие как Е-кадгерин (CDH1), N-кадгерин (CDH2) и Р-кадгерин (CDH3); классические кадгерины II типа, такие как VE-кадгерин (CDH5) и OB-кадгерин (CDH11); десмосомальные кадгерины; семипроходные трансмембранные кадгерины; кадгерины группы FAT и dachsous (DCHS); и протокадгерины (PCDH). Е-кадгерин представляет 15 собой трансмембранный белок, состоящий из трех компонентов: (1) внеклеточный кадгериновый домен (EC), ответственный за гомотипическое кадгерин-кадгериновое взаимодействие (2) однопроходный трансмембранный домен или семипроходный трансмембранный домен и (3) цитоплазматический домен, который выполняет функцию соединителя между клеточной поверхностью, ассоциированными 20 цитоплазматическими белками катенинами и цитоскелетом. Кадгерины участвуют в росте организмов (эмбриогенезе), заживлении ран, опухолевой инвазии и метастазировании.

Е-кадгерин, помимо того, что он является кальций-зависимой молекулой адгезии, также является важным регулятором образования эпителиальных контактов. 25 Его ассоциация с катенинами необходима для межклеточной адгезии и поляризации эпителиальных клеток/пластов эпителия между латеральной и апикальной мембраной. Фосфорилирование тирозина может разрушить эти комплексы, что приведет к изменению свойств клеточной адгезии. Экспрессия Е-кадгерина часто бывает подавлена в высокоинвазивных, плохо дифференцированных карциномах. 30 Повышенная экспрессия Е-кадгерина в этих клетках снижает инвазивность. Таким образом, потеря экспрессии или функции Е-кадгерина, по-видимому, является важным этапом прогрессирования опухолей. Кроме того, кадгерины играют жизненно важную роль в инвазии и миграции клеток посредством эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) - обратимого процесса. ЭМП - очень разнотипный процесс, который 35 может управляться многими внешними сигналами (воспаление, стресс, гипоксия, иммунные ответы и т. д.). Общеизвестно, что в первую очередь основой ЭМП является

сильная регуляция индуцирующих ЭМП факторов транскрипции (семейства *Snail*, *E47*, *Twist* и *Zeb*), которая, например, путем связывания TGF $\beta$ , Wnt, интегринов и факторов роста с клетками, приводит к понижающей регуляции E-кадгерина, ZO-1, десмоплакина и повышению уровня, сред прочего, виментина, фибронектина, N-кадгерина. Клетки проходят через процесс, в котором их фенотип больше напоминает фенотип «стволовости». В последние годы эта модель изменилась, потому что было замечено, что клетки могут также «демонстрировать» ЭМП без понижающей или повышающей регуляции известных маркеров ЭМП. Это явление было названо частичным ЭМП, гибридным ЭМП/МЭП и квази-ЭМП. В большинстве новых моделей предлагается система, в которой клетки способны регулировать экспрессию белка (например, интернализация белка, высокий/низкий белковый обмен) или клетки вместе (кластеры) имеют разный режим активности/инвазивности. E-кадгерин играет доминирующую роль в этих процессах, и в этом отношении O-маннозилирование E-кадгерина считается дополнительным инструментом для опухолевых клеток, регулирующим адгезию и изменения морфологии при взаимодействии с окружающим матриксом.

### **Антитела к E-кадгерину и их антигенсвязывающие фрагменты**

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые способны специфично связывать O-маннозилированный E-кадгерин. В некоторых вариантах осуществления антитела являются выделенными. В некоторых вариантах осуществления антитела являются синтетическими или рекомбинантными. Примечательно, что изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим последовательности VH и VL, которые основаны на последовательностях VH и VL человеческого антитела, полученного от человека, который страдал от карциномы толстой кишки IV стадии с метастазами, но который находился в полной ремиссии в течение многих лет после химиотерапии. Напротив, многие известные в настоящее время терапевтические антитела обычно получают путем иммунизации животных, отличных от человека, таких как мыши, крысы, верблюдовые, кролики или козы, с необязательно последующим процессом гуманизации. Такие гуманизированные антитела по-прежнему сопряжены с риском неблагоприятных побочных действий из-за иммунной реакции реципиента на последовательности нечеловеческого происхождения. Кроме того, многие терапевтические антитела или их фрагменты, известные из уровня техники, получены из искусственных библиотек фагового дисплея, в которых тяжелые и легкие цепи

иммуноглобулина спарены случайным образом. Напротив, настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам с естественным образом спаренными тяжелыми и легкими цепями на основе последовательностей антитела, которое было продуцировано *in vivo* в организме пациента-человека, находящегося в  
5 полной ремиссии.

Поскольку Е-кадгерин широко экспрессируется во многих эпителиальных тканях, до создания настоящего изобретения он не рассматривался в данной области техники в качестве подходящего антигена для терапевтического применения, особенно  
10 с учетом того факта, что Е-кадгерин часто подавлен в опухолевых клетках для того, чтобы способствовать ЭМП. Однако, настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые способны специфично связывать укороченную форму Е-кадгерина с молекулярной массой приблизительно 70 кДа, которая часто активирована в опухолевых клетках.

15 Термин «антитело» в контексте настоящего документа охватывает белковые молекулы, а также любые их антигенсвязывающие фрагменты. Указанные белковые молекулы предпочтительно являются иммуноглобулиновыми белками, что означает, что они принадлежат к классу иммуноглобулиновых белков. В некоторых вариантах  
20 осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один или более доменов, которые связывают эпитоп на антигене, где такие домены предпочтительно получены из переменного домена антитела или обладают гомологичной ему последовательностью.

Определяющие комплементарность участки (CDR) представляют собой  
25 гипервариабельные участки, присутствующие в переменных доменах тяжелой цепи и переменных доменах легкой цепи. В случае полноразмерных антител CDR 1-3 тяжелой цепи и CDR 1-3 связанной легкой цепи вместе образуют антигенсвязывающий сайт.

30 Область кристаллизующегося фрагмента (Fc) природного антитела состоит из доменов CH2 и CH3 двух тяжелых цепей.

Как правило, антигенсвязывающий фрагмент антитела способен связывать тот же антиген, что и указанное антитело, хотя и не обязательно в той же степени. В  
35 некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере участок CDR3 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере участок

CDR3 тяжелой цепи и участок CDR3 легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления указанные участки CDR3 тяжелой и легкой цепей спарены друг с другом.

5 В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере домен VH. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и участки CDR1, CDR2 и CDR3 легкой  
10 цепи антитела. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере домен VL. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере домен VH и VL.

Неограничивающими примерами антител или антигенсвязывающих  
15 фрагментов согласно изобретению являются полноразмерное антитело, DuoBody® (биспецифичное антитело, содержащее два разных IgG1), однодоменное антитело или нанотело (содержащее один домен VH или VL), одноцепочечный переменный фрагмент (scFv; содержащий домен VH и домен VL, обычно соединенные коротким линкерным пептидом), Fv-фрагмент (содержащий домен VH и домен VL, обычно без  
20 линкера), unibody™, Fd-фрагмент (содержащий домен VH и домен CH1), диатело (содержащее два домена VH и два домена VL, где VH связан с VL таким коротким линкером, что они не могут спариваться друг с другом, но спариваются с VL и VH другой цепи, тем самым создавая два антигенсвязывающих сайта), Fab-фрагмент (содержащий константный домен тяжелой цепи CH1, константный домен легкой цепи  
25 CL и переменные домены тяжелой и легкой цепи VH и VL) и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент (содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком).

В различных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и  
30 переменную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления указанная VH спарена с указанной VL.

Антитела для терапевтического применения предпочтительно максимально  
35 близки к природным антителам субъекта, подлежащего лечению (например, человеческие антитела для субъектов-людей). В различных вариантах осуществления антитело согласно изобретению представляет собой полноразмерное антитело,

предпочтительно полноразмерное антитело IgG, или IgM, или IgA. В контексте настоящего документа полноразмерное антитело IgG представляет собой двухвалентную молекулу, содержащую две тяжелые цепи гамма-класса и две легкие цепи. Как хорошо известно специалисту, тяжелая цепь антитела является более крупной из двух типов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Природная тяжелая цепь обычно содержит константный домен CH, который содержит константные области CH1, CH2 и CH3, и переменный домен (VH), который участвует в связывании антигена. Легкая цепь антитела является меньшей из двух типов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Природная легкая цепь обычно содержит константный домен (CL) и переменный домен (VL). Переменный домен легкой цепи часто, но не всегда, участвует в связывании антигена вместе с переменным доменом тяжелой цепи.

Полноразмерное антитело IgD представляет собой двухвалентную молекулу, содержащую две тяжелые цепи дельта-класса и две легкие цепи.

Полноразмерное антитело в случае IgM представляет собой декавалентную или додекавалентную молекулу, содержащую 5 или 6 связанных иммуноглобулинов, в которой каждый мономер иммуноглобулина имеет два антигенсвязывающих сайта, образованные тяжелой и легкой цепью.

Полноразмерное антитело в случае IgA может быть мономерным или димерным.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей, в отличие от мышинных или гуманизированных антител, в которых последовательности CDR или переменной области или константной области нечеловеческого происхождения связаны с риском антимишиного иммунного ответа у людей-реципиентов.

В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgG, предпочтительно IgG1. Это обеспечивает преимущества для медицинских применений у людей, например, потому что антитела IgG1 обычно имеют благоприятный период полувыведения при введении людям *in vivo*. Кроме того, Fc-хвост IgG1 позволяет осуществлять эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления антитело или

антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению представляет собой человеческое IgG, предпочтительно человеческое IgG1.

5 В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgG3. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgG4.

10 В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgA. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению относится к изотипу IgD.

15 В различных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более мутаций. Такие мутации включают, например, аминокислотные замены, вставки или делеции. В контексте настоящего документа полноразмерные антитела, в которых один или более, предпочтительно не более 20, аминокислотных остатков удалены без существенного изменения характеристик связывания полученного антитела, по-прежнему считаются полноразмерными антителами.

25 В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению имеют модифицированный Fc-хвост. В некоторых вариантах осуществления указанный Fc-хвост был модифицирован путем замены одной или более аминокислот и/или изменений характера гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления указанный Fc-хвост был модифицирован для снижения ADCC-активности. В некоторых вариантах осуществления указанный Fc-хвост был модифицирован для повышения ADCC-активности. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению афукозилированы и вследствие этого обладают повышенной ADCC-активностью.

35 Термины «способный связывать», «специфичный к», «способный специфично связывать», «обладающий способностью специфично связывать» и «связывает» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к взаимодействию между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, и его мишенью (также

называемой его антигеном). Это означает, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывается с указанным антигеном по сравнению с другими антигенами или аминокислотными последовательностями.

5 Таким образом, хотя антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут неспецифично связываться с другими антигенами или аминокислотными последовательностями, аффинность связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с его антигеном значительно выше, чем аффинность неспецифичного связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с другими антигенами или аминокислотными последовательностями.

10 Как правило, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, которые каким-либо образом модифицированы, сохраняют по меньшей мере 50% своей активности связывания (по сравнению с исходным антителом). Предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению  
15 сохраняет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% своей связывающей активности по сравнению с исходным антителом.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит консервативные или неконсервативные  
20 аминокислотные замены, которые по существу не изменяют его биологическую активность (получаемый в результате вариант называется в настоящем документе «консервативным вариантом» или «вариантом с сохраненной функцией», соответственно). В некоторых вариантах осуществления такой консервативный вариант или вариант с сохраненной функцией сохраняет по меньшей мере 80%, 90%, 95% или  
25 100% своей связывающей активности по сравнению с исходным антителом.

В контексте настоящего документа консервативные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется другим остатком с преимущественно аналогичными свойствами (размером, гидрофобностью и т. д.), так что общая функция антитела по существу не затрагивается. Как правило, замены  
30 аминокислотных остатков в пределах одного класса, представленные в таблице 2, считаются консервативными аминокислотными заменами.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, также могут быть  
35 специфичными к другому соединению, если эпитоп О-маннозилированного Е-кадгерина, который связывается указанным антителом или антигенсвязывающим

фрагментом, также присутствует в указанном другом соединении. В таком случае антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, называемые в настоящем документе специфичными к О-маннозилированному Е-кадгерину, также являются специфичными к такому другому соединению, содержащему такой же тип О-маннозилированного эпитопа. Такой другой О-маннозилированный эпитоп может продуцироваться *in vivo* другой О-маннозилтрансферазой, отличной от О-маннозилтрансфераз, которые продуцируют О-маннозилированный Е-кадгерин *in vivo*. Следовательно, термин «связывание» или «специфичный к» не исключает связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению с другим белком или белком(ами), которые содержат такой же тип О-маннозилированного эпитопа.

«Аффинность связывания» относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего документа «аффинность связывания» относится к характеристической аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность обычно может быть представлена равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ), которую рассчитывают как отношение  $k_{off}$  к  $k_{on}$ , см., например, Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Аффинность можно измерить обычными методами, известными в данной области техники, такими как, например, анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, BiaCore (GE Healthcare), Octet (Fortebio) или прибор IBIS-iSPR от IBIS Technologies BV (Хенгело, Нидерланды), или анализы в жидкой фазе, например, Kinexa.

В контексте настоящего документа термины «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержит цепь нуклеотидов, более предпочтительно ДНК, кДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержит неприродные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и/или ненуклеотидные структурные звенья, которые выполняют ту же функцию, что и природные нуклеотиды, такие как, например, спираль ДНК/РНК, пептидо-нуклеиновая кислота (PNA) и/или запертая нуклеиновая кислота (LNA).

Процент идентичности аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, или термин «% идентичности последовательности», определен в настоящем документе как процент остатков в  
5 аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты-кандидате, идентичных остаткам в эталонной последовательности после выравнивания этих двух последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области техники, например, «Align 2».

10

В контексте настоящего документа термин в единственном числе охватывает термин «один или более».

15

#### **Иллюстративные антитела, специфичные к Е-кадгерину**

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, специфичным к О-маннозилированному Е-кадгерину и обладающим определенными структурными и функциональными особенностями, а также к их терапевтическим применениям для лечения или предотвращения заболевания.

20

Неограничивающим примером такого заболевания является рак, характеризующийся наличием О-маннозилированного Е-кадгерина.

25

В контексте настоящего документа термин «О-маннозилированный Е-кадгерин» относится к белку Е-кадгерину, который содержит по меньшей мере один остаток треонина или серина с О-связанной маннозой, что означает, что манноза присоединена к атому кислорода указанного треонина или серина. В некоторых вариантах осуществления указанный белок Е-кадгерин содержит по меньшей мере один остаток однократно О-маннозилированного треонина или серина. Термин «остаток однократно О-маннозилированного треонина» относится к остатку треонина, который содержит О-  
30 связанную маннозу без присоединения другого сахарного фрагмента к указанной О-связанной маннозе. Термин «остаток однократно О-маннозилированного серина» относится к остатку серина, который содержит О-связанную маннозу без присоединения другого сахарного фрагмента к указанной О-связанной маннозе.

35

В различных вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, специфичные к О-

маннозилированному E-кадгерину, где связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с указанным E-кадгерином зависит от присутствия остатка O-маннозилированного треонина в положении 467, остатка O-маннозилированного треонина в положении 468, остатка O-маннозилированного треонина в положении 470, остатка O-маннозилированного треонина в положении 472, остатка глутаминовой кислоты в положении 463, остатка серина в положении 465, остатка серина в положении 469 и/или остатка валина в положении 477 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

В различных вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные к O-маннозилированному E-кадгерину, где связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с указанным E-кадгерином зависит от присутствия одного или более остатков O-маннозилированного треонина в области аминокислот 467-472 E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент зависит от присутствия остатка O-маннозилированного треонина в положении 467, и/или остатка O-маннозилированного треонина в положении 468, и/или остатка O-маннозилированного треонина в положении 470, и/или остатка O-маннозилированного треонина в положении 472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент зависит от присутствия остатка O-маннозилированного треонина в положении 468 и остатка O-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент зависит от присутствия остатка O-маннозилированного треонина в положении 467, и остатка O-маннозилированного треонина в положении 468, и остатка O-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент зависит от присутствия остатка O-маннозилированного треонина в положении 467, и остатка O-маннозилированного треонина в положении 468, и остатка O-маннозилированного треонина в положении 470, и остатка O-маннозилированного треонина в положении 472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с указанным E-кадгерином дополнительно зависит от присутствия остатка глутаминовой кислоты в положении 463, и/или остатка серина в положении 465, и/или остатка серина в положении 469, и/или остатка валина в положении 477

последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанный остаток серина в положении 465 и/или 469 является O-маннозилированным.

5 В контексте настоящего документа связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента «зависит от» определенного аминокислотного остатка, если замена указанного аминокислотного остатка аланином снижает связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с его антигеном по меньшей мере на 40%, предпочтительно по меньшей мере на 50%,  
10 предпочтительно по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%.

15 В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, специфичные к O-маннозилированному E-кадгерину и специфично связывающему остаток O-маннозилированного треонина в положении 467, и/или остаток O-маннозилированного треонина в положении 468, и/или остаток O-маннозилированного треонина в  
20 положении 470, и/или остаток O-маннозилированного треонина в положении 472, и/или остаток глутаминовой кислоты в положении 463, и/или остаток серина в положении 465, и/или остаток серина в положении 469, и/или остаток валина в положении 477 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления указанный остаток серина в положении 465 и/или  
25 469 является O-маннозилированным.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к O-маннозилированному E-кадгерину и специфично связывающему один или более остатков O-маннозилированного треонина E-кадгерина, где указанный один или более остатков O-маннозилированного  
30 треонина присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие один или более остатков  
35 O-маннозилированного треонина, выбранных из группы, состоящей из остатка O-маннозилированного треонина в положении 467, остатка O-маннозилированного

треонина в положении 468, остатка О-маннозилированного треонина в положении 470 и остатка О-маннозилированного треонина в положении 472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 467 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 468 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А. В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 468 и остаток О-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 467, и остаток О-маннозилированного треонина в положении 468, и остаток О-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие остаток О-маннозилированного треонина в положении 467, и остаток О-маннозилированного треонина в положении 468, и остаток О-маннозилированного треонина в положении 470, и остаток О-маннозилированного треонина в положении 472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область Е-кадгерина, содержащую Т468 и Т470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-

маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка треонина являются О-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их  
5 антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область Е-кадгерина, содержащую Т467, Т468 и Т470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах  
10 осуществления все три остатка треонина являются О-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область Е-кадгерина, содержащую Т467, Т468, Т470 и Т472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где указанные остатки треонина являются О-маннозилированными. В  
15 некоторых вариантах осуществления два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления три из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все четыре остатка треонина являются О-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их  
20 антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область Е-кадгерина, содержащую Т468, S469 и Т470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления указанный  
25 остаток серина является О-маннозилированным.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область Е-кадгерина, содержащую Т467, Т468, S469 и Т470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из  
30 указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления указанный остаток серина является О-маннозилированным.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их  
35 антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область Е-кадгерина,

содержащую S465, T467, T468, S469 и T470 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является O-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является O-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются O-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область E-кадгерина, содержащую S465, T467, T468, S469, T470 и T472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является O-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является O-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются O-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область E-кадгерина, содержащую E463, S465, T467, T468, S469, T470 и T472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является O-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются O-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является O-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются O-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие область E-кадгерина, содержащую E463, S465, T467, T468, S469, T470, T472 и V477 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А, где по меньшей мере один из указанных остатков

треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются О-маннозилированными.

10 В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие эпитоп Е-кадгерина, содержащий последовательность TST, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления указанный остаток серина является О-маннозилированным.

15 В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие эпитоп Е-кадгерина, содержащий последовательность TTST, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления указанный остаток серина является О-маннозилированным.

20 В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие эпитоп Е-кадгерина, содержащий последовательность STTST, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются О-маннозилированными.

30 В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие эпитоп Е-кадгерина, содержащий последовательность STTSTT, где по меньшей мере один из указанных

остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются О-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие эпитоп Е-кадгерина, содержащий последовательность ESTTSTTT, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются О-маннозилированными.

В некоторых вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающие эпитоп Е-кадгерина, содержащий последовательность ESTTSTTTV, где по меньшей мере один из указанных остатков треонина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления все из указанных остатков треонина являются О-маннозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один остаток серина является О-маннозилированным. В некоторых вариантах осуществления оба остатка серина являются О-маннозилированными.

Е-кадгерин известен в данной области техники как продукт гена CDH1, который у человека имеет молекулярную массу приблизительно 120 кДа. Однако авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что О-маннозилированная усеченная форма Е-кадгерина также существует в природе. В этой усеченной форме с молекулярной массой приблизительно 70 кДа отсутствуют внеклеточные домены ЕС1 и

ЕС2 полноразмерного E-кадгерина. Внеклеточные домены 5, 4 и часть внеклеточного домена ЕС3 при этом присутствуют в усеченной форме массой 70 кДа. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что эта усеченная форма E-кадгерина массой 70 кДа присутствует на поверхности многих типов эпителиальных клеток и часто активирована в опухолевых клетках. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что активация формы E-кадгерина массой 70 кДа способствует росту опухоли, среди прочего ввиду того, что усеченная форма массой 70 кДа стимулирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), как показано в примерах, тем самым увеличивая миграцию опухолевых клеток и метастазирование. Более того, полагают, что активация формы E-кадгерина массой 70 кДа способствует механизму ускользания опухоли от иммунного ответа, поскольку усеченная форма E-кадгерина массой 70 кДа в меньшей степени способна связывать иммунные клетки по сравнению с полноразмерной формой E-кадгерина массой 120 кДа. Согласно настоящему изобретению чрезмерная представленность O-маннозилированной формы E-кадгерина массой 70 кДа может способствовать ускользанию от распознавания иммунными клетками посредством CD3, KLRG1 или CD103 и способствовать ЭМП без полного подавления E-кадгерина. Таким образом, активация усеченной формы массой 70 кДа на опухолевых клетках может уменьшить взаимодействия между этими опухолевыми клетками и иммунными клетками, тем самым способствуя ускользанию опухоли от иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены антитела и их антигенсвязывающие части, которые связывают вышеупомянутый O-маннозилированный усеченный E-кадгерин массой 70 кДа лучше, чем хорошо известный O-маннозилированный полноразмерный E-кадгерин массой приблизительно 120 кДа. В предпочтительных вариантах осуществления предложены антитела и их антигенсвязывающие части, которые связывают O-маннозилированный усеченный E-кадгерин массой 70 кДа по меньшей мере в 2 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 3 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 4 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз лучше, чем O-маннозилированный полноразмерный E-кадгерин. Эта характеристика позволяет увеличить опухолеспецифичность и уменьшить неблагоприятные побочные действия, вызванные связыванием со здоровыми тканями, в случаях, когда усеченная форма E-кадгерина массой 70 кДа значительно активирована на опухолевых клетках. В контексте настоящего документа термин «полноразмерный E-кадгерин» относится к известному продукту гена CDH1, который у людей имеет молекулярную массу

приблизительно 120 кДа, как, например, показано на фиг. 1А. Термин «усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа» или «форма Е-кадгерина массой 70 кДа» относится к форме Е-кадгерина более маленького размера с молекулярной массой от 60 до 80 кДа, обычно приблизительно 70 кДа, которая также встречается в природе на поверхности

5 эпителиальных клеток. Как показано на фиг. 1С, в этой встречающейся в природе усеченной форме Е-кадгерина с молекулярной массой от 60 до 80 кДа отсутствуют внеклеточные домены ЕС1 и ЕС2 полноразмерного Е-кадгерина. Внеклеточные домены 5, 4 и часть внеклеточного домена ЕС3 при этом присутствуют в этой усеченной

10 форме массой 70 кДа. Термин «О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа» относится к вышеупомянутому усеченному белку Е-кадгерину массой 70 кДа, который содержит по меньшей мере один остаток О-маннозилированного треонина или серина, предпочтительно по меньшей мере остаток О-маннозилированного треонина в

положении 467, и/или положении 468, и/или положении 470, как показано на фиг. 1А.

15 В отдельных вариантах осуществления антитело к Е-кадгерину или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит:

- CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность TPGVGX<sub>1</sub>NX<sub>2</sub>PYYFDR, где X<sub>1</sub> представляет собой А или Т и где X<sub>2</sub> представляет собой D или N; и
- 20 - CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYSNTPQT.

В отдельных вариантах осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный

25 Е-кадгерин, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или более и необязательно каждое из следующего:

- a. CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GFX<sub>1</sub>FSX<sub>2</sub>AW, где X<sub>1</sub> представляет собой Т или I и где X<sub>2</sub> представляет собой N или Y;
- 30 b. CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность IKSKIDG X<sub>1</sub>T X<sub>2</sub>, где X<sub>1</sub> представляет собой G или E, и где X<sub>2</sub> представляет собой Т или I;
- c. CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную
- 35 последовательность TPGVGX<sub>1</sub>NX<sub>2</sub>PYYFDR, где X<sub>1</sub> представляет собой А или Т и где X<sub>2</sub> представляет собой D или N;

d. CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QSVLCRSNNKNC;

e. CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WAX<sub>1</sub>, где X<sub>1</sub> представляет собой S или C;

- 5 f. CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYSNTPQT;  
или CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности QQYSNTPQT 1, 2 или 3 консервативными заменами.

10

Необязательно, консервативная аминокислотная замена применяется к по меньшей мере одной из вышеупомянутых последовательностей CDR. В некоторых вариантах осуществления указанная консервативная замена включает замену одного или более аминокислотных остатков класса аминокислот, как представлено в таблице 2, другим аминокислотным остатком того же класса аминокислот. Неограничивающие 15 примеры консервативных аминокислотных замен включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, другим гидрофобным остатком и замену одного полярного остатка другим полярным остатком, например, замену аргинина лизином, глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой 20 или глутамина аспарагином. Предпочтительно после консервативной аминокислотной замены благоприятная характеристика связывания E-кадгерина родительского антитела сохраняется или даже улучшается. Предпочтительно последовательности CDR таких вариантов отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от исходных 25 последовательностей.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело к E-кадгерину или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, содержащие:

- 30 - CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность TPGVGX<sub>1</sub>NX<sub>2</sub>PYYFDR, где X<sub>1</sub> представляет собой A или T и где X<sub>2</sub> представляет собой D или N; или CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности TPGVGX<sub>1</sub>NX<sub>2</sub>PYYFDR 1, 2 или 3 консервативными заменами; и 35 - CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYSNTPQT, или CDR3 вариабельной области легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности QQYSNTPQT 1, 2 или 3 консервативными заменами.

5 Также предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать O-маннозилированный E-кадгерин, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или более и необязательно каждое из следующего:

- а. CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $GFX_1FSX_2AW$ , где  $X_1$  представляет собой T или I и где  $X_2$  представляет собой N или Y;  
 10 или CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $GFX_1FSX_2AW$  1, 2 или 3 консервативными заменами;
- б. CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $IKSKIDGX_1TX_2$ , где  $X_1$  представляет собой G или E, и где  $X_2$  представляет собой T или I;  
 15 или CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $IKSKIDGX_1TX_2$  1, 2 или 3 консервативными заменами;
- в. CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $TPGVGX_1NX_2PYYFDR$ , где  $X_1$  представляет собой A или T и где  $X_2$  представляет собой D или N;  
 20 или CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $TPGVGX_1NX_2PYYFDR$  1, 2 или 3 консервативными заменами;
- г. CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $QSVLCRSNNKNC$ ;  
 25 или CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $QSVLCRSNNKNC$  1, 2 или 3 консервативными заменами;
- е. CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $WAX_1$ , где  $X_1$  представляет собой S или C;  
 30 или CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $WAX_1$  1, 2 или 3 консервативными заменами;
- 35

f. CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYSNTPQT;  
или CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности QQYSNTPQT 1, 2 или 3 консервативными заменами.

В таблице 1 представлены последовательности предпочтительных антител согласно изобретению. Эти предпочтительные антитела обозначены в настоящем документе как антитела AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN. Эти антитела связывают O-маннозилированный E-кадгерин, в частности, недавно обнаруженную усеченную форму E-кадгерина массой приблизительно 70 кДа, как описано выше в настоящем документе.

Последовательности CDR тяжелой и легкой цепей этих предпочтительных антител соответствуют последовательностям GFX<sub>1</sub>FSX<sub>2</sub>AW, IKSKIDGX<sub>1</sub>TX<sub>2</sub>, TPGVGX<sub>1</sub>NX<sub>2</sub>PYYFDR, QSVLCRSNNKNC, WAX<sub>1</sub> и QQYSNTPQT, как описано выше в пунктах а)-f).

В контексте настоящего документа термины «AT1636», «E-C06», «D-H04», «D-A02», «D-E09», «E-A04», «E-B09», «C-A05», «C-A03», «C-B02», «C-D04-A», «C-D04-B», «F-C08», «D-G03», «D-F10», «C-E08», «D-B06», «D-G05», «D-H08», «C-H01», «D-C12», «D-C11», «E-C10», «AT1636-I», «AT1636-Y», «AT1636-E», «AT1636-N», «AT1636-YN», «AT1636-IYN» и «AT1636-IYEN» охватывают все антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие по меньшей мере участки CDR1-3 тяжелой и легкой цепи, предпочтительно вариабельные области тяжелой и легкой цепи этих антител, как представлено в таблице 1.

На основе антител, представленных в таблице 1, можно получить антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие O-маннозилированный E-кадгерин и содержащие по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, представленного в таблице 1. Таким образом, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, как представлено в таблице 1. Указанная последовательность CDR предпочтительно представляет собой последовательность CDR3 антитела, как представлено в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи антитела, как представлено в таблице 1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN.

10 В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают O-маннозилированный E-кадгерин и содержат последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи одного или более антител, представленных в таблице 1.

15 В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи одного и того же антитела, представленные в таблице 1. Таким образом, согласно этому варианту осуществления последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN или AT1636-IYEN совместно присутствуют в одном антителе или антигенсвязывающем фрагменте. Такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать общую легкую цепь, которая определена в настоящем документе как легкая цепь, способная функционально спариваться с 25 множеством различных тяжелых цепей, посредством чего сохраняется антигенная специфичность указанных тяжелых цепей. Этот подход основан на хорошо известном факте, что тяжелая цепь часто является основным фактором аффинности и специфичности. Спаривание общей легкой цепи с отдельно взятой тяжелой цепью обычно обеспечивает благоприятную конформацию, в то время как такая общая легкая цепь не вносит значительного вклада в антигенную специфичность.

30 В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит все три CDR тяжелой цепи и все три CDR легкой цепи одного и того же антитела, представленные в таблице 1. Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепи антитела, выбранного из группы,

состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN.

5

Последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) антител AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN также представлены в таблице 1. На основе этих последовательностей VH и/или VL дополнительно можно получить антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают O-маннозилированный E-кадгерин и содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и/или вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, представленные в таблице 1, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Как правило, вариации последовательности VH и VL от 80 до 99% допустимы при сохранении антигенной специфичности, особенно когда участки CDR остаются неизменными. Таким образом, в настоящем документе также предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие последовательность VH или VL, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1.

15  
20

Таким образом, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела, представленную в таблице 1, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%. Также предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, представленную в таблице 1, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, представленные в таблице 1, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей

25  
30  
35

мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

- 5 Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, представленные в таблице 1, или
- 10 последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи антитела, как представлено в таблице 1. Предпочтительно указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит
- 15 последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела, как представлено в таблице 1.

Например, в некоторых вариантах осуществления один или более каркасных остатков последовательности VH или VL, представленной в таблице 1, модифицированы для снижения иммуногенности и/или для повышения

20 эффективности связывания или стабильности полученного антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Каркасные последовательности, например, оптимизируют путем мутирования молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такую каркасную последовательность, после чего предпочтительно тестируют характеристики

25 полученного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Таким путем можно получить улучшенные связывающие соединения.

В некоторых вариантах осуществления один или более каркасных остатков мутированы обратно в последовательность зародышевой линии, из которой получено антитело AT1636, для снижения иммуногенности. Способы сравнения каркасной области отдельно взятого антитела с последовательностью зародышевой линии, из

30 которой получено антитело, хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления один или более каркасных остатков последовательности VH или VL, представленной в таблице 1, модифицированы для

удаления одного или более Т-клеточных эпитопов, тем самым снижая потенциальную

35 иммуногенность полученного антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Это называется деиммунизацией. Способы деиммунизации каркасной области отдельно

взятого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента также хорошо известны в данной области техники, как, например, описано в De Groot et al, 2005.

В некоторых вариантах осуществления не более 10 аминокислотных остатков из  
5 каркасных остатков последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1, модифицированы по сравнению с указанной последовательностью VH или VL, как представлено в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления не более 8 аминокислотных остатков из каркасных остатков последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1, являются модифицированными. В некоторых вариантах  
10 осуществления не более 5 аминокислотных остатков из каркасных остатков последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1, являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления не более 3 или 2 аминокислотных остатков из каркасных остатков последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1, являются модифицированными. В некоторых вариантах  
15 осуществления 1 аминокислотный остаток из каркасных остатков последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1, является модифицированным.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, способные связывать O-  
20 маннозилированный E-кадгерин, содержащие:  
- переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VH, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17; и/или  
- переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей  
25 мере на 80% идентичную последовательности VL, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

Предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело AT1636. Это антитело является предпочтительным, поскольку оно  
30 способно связывать O-маннозилированный E-кадгерин, экспрессируемый на опухолевых клетках, в частности, недавно обнаруженную усеченную форму E-кадгерина массой приблизительно 70 кДа, как описано выше в настоящем документе. Особым преимуществом AT1636 является то, что оно связывает эту усеченную форму E-кадгерина массой 70 кДа лучше, чем полноразмерный E-кадгерин массой  
35 приблизительно 120 кДа. Эта характеристика AT1636 обычно позволяет увеличить опухолеспецифичность в случаях, когда O-маннозилированный усеченный E-кадгерин

массой 70 кДа активирован на опухолевых клетках. Еще одно преимущество того, что АТ1636 обладает избирательностью в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа, заключается в том, что полноразмерный Е-кадгерин широко экспрессируется. Следовательно, в отсутствие избирательности в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа широко экспрессируемый полноразмерный Е-кадгерин может работать как поглотитель и/или вызывать нежелательные эффекты. Кроме того, уровни экспрессии полноразмерного Е-кадгерина очень высоки и поэтому часто неразличимы между здоровыми и опухолевыми эпителиальными клетками, в то время как избирательность в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа обеспечивает более высокую опухолеспецифичность. Кроме того, Е-кадгерин выполняет важную барьерную функцию, поэтому желательно избегать значительного вмешательства в здоровую функцию Е-кадгерина.

Кроме того, АТ1636 получено от человека, который страдал от карциномы толстой кишки IV стадии с метастазами, но который находился в полной ремиссии в течение многих лет после химиотерапии, что свидетельствует о терапевтической эффективности. Примечательно, что АТ1636 относится к изотипу IgG3. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей.

Кроме того, АТ1636 было выбрано на основании его способности связывать экспрессирующий О-маннозилированный Е-кадгерин рак толстой кишки подтипов CMS1, CMS2, CMS3 и CMS4. АТ1636 связывается с опухолевыми клетками, в частности, с эпителиальными опухолевыми клетками, более конкретно с экспрессирующими О-маннозилированный Е-кадгерин раковыми клетками, такими как, например, экспрессирующие О-маннозилированный Е-кадгерин клетки рака толстой кишки, клетки рака молочной железы, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака эндометрия, клетки рака легкого и клетки рака пищевода, как показано в примерах. Таким образом, антитело АТ1636 является особенно подходящим для лечения и/или диагностики расстройства, связанного с присутствием клеток, экспрессирующих О-маннозилированный Е-кадгерин, таких как экспрессирующие О-маннозилированный Е-кадгерин раковые клетки, в частности, раковые клетки, которые экспрессируют недавно открытую усеченную форму Е-кадгерина массой приблизительно 70 кДа.

Антитела E-C10, D-C12 и D-C11, представленные в таблице 1, имеют такие же последовательности CDR 1-3 тяжелой и легкой цепи, что и АТ1636, и поэтому обладают

такой же специфичностью связывания. Эти антитела также являются предпочтительными антителами согласно изобретению, среди прочего, потому что они способны связывать O-маннозилированный E-кадгерин, экспрессируемый на клетках, в частности, недавно открытую усеченную форму E-кадгерина массой приблизительно 5 70 кДа, как описано в настоящем документе, более конкретно один или более остатков O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А, и поэтому они являются очень подходящими для лечения и/или диагностики расстройства, связанного с наличием таких клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин, в особенности раковых клеток. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей.

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антител AT1636, E-C10, D-C12 и D-C11, как представлено в таблице 1, представляют собой GFTFSNAW, IKSKIDGGTT и TPGVGANDPYYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этих антител AT1636, E-C10, D-C12 и D-C11 представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антителу или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела AT1636 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 1. Последовательность VL антитела AT1636 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антителу или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%,

более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более  
5 предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент,  
10 способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более  
15 предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более  
20 предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела AT1636, как представлено в таблице 1.

25  
Последовательность VH антитела E-C10 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 1. Последовательность VL антитела E-C10 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 22. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-  
30 кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более  
35 предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере

91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%,  
5 более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.  
Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие  
10 последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по  
15 меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на  
20 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела E-C10, как представлено в таблице 1.

25 Последовательность VH антитела D-C12 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 13. Последовательность VL антитела D-C12 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 13, и  
30 последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%,  
35 более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

- 5 Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по
- 10 меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более
- 15 предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по
- 20 меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-C12, как представлено в таблице 1.

- Последовательность VH антитела D-C11 представлена в таблице 1 как SEQ ID
- 25 NO: 14. Последовательность VL антитела D-C11 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности,
- 30 идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере
- 35 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по

меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

5 Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по 10 меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 15 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент 20 содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-C11, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом AT1636, или E-C10, или D-C12, или D-C11 за 25 связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1A.

30 Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом AT1636, или E-C10, или D-C12, или D-C11 за связывание с клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на O-маннозилированный E-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют 35 O-маннозилированный E-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом AT1636, или E-C10, или D-C12, или D-C11 за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

5

Антитела E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E и AT1636-N, представленные в таблице 1, также являются предпочтительными антителами согласно изобретению. Эти антитела также способны связывать O-маннозилированный E-кадгерин, экспрессируемый на клетках, в частности, недавно открытую усеченную форму E-кадгерина массой приблизительно 70 кДа, более конкретно один или более остатков O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А, и поэтому являются очень подходящими для лечения и/или диагностики расстройства, связанного с наличием таких клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин, в особенности раковых клеток. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей в этих антителах снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей.

20

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антител E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09 и AT1636-I, представленные в таблице 1, представляют собой GFIFSNAW, IKSKIDGGTT и TPGVGANDPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этих антител E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09 и AT1636-I представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

35

Последовательность VH антител E-C06 и D-H04 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 2. Последовательность VL антител E-C06 и D-H04 представлена в таблице

1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления  
предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-  
маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH,  
представленную в SEQ ID NO: 2, и последовательность VL, представленную в SEQ ID  
5 NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.  
Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по  
меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более  
предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%,  
более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере  
10 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей  
мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по  
меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более  
предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%,  
более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере  
15 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации  
последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами  
участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено  
антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-  
маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH,  
20 представленную в SEQ ID NO: 2, и последовательность VL, представленную в SEQ ID  
NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%,  
предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на  
86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по  
меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более  
25 предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на  
91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по  
меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более  
предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на  
96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по  
30 меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное  
антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3  
тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела E-C06 или D-H04,  
как представлено в таблице 1.

35 Последовательность VH антител D-A02, D-E09, E-A04, E-B09 и AT1636-I  
представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 3. Последовательность VL антител D-A02, D-

Е09, Е-А04, Е-В09 и АТ1636-І представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-A02, D-E09, Е-А04, Е-В09 или АТ1636-І, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом E-C06, или D-H04, или D-A02, или D-E09, или E-A04, или E-B09, или AT1636-I за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом E-C06, или D-H04, или D-A02, или D-E09, или E-A04, или E-B09, или AT1636-I за связывание с клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на O-маннозилированный E-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют O-маннозилированный E-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом E-C06, или D-H04, или D-A02, или D-E09, или E-A04, или E-B09, или AT1636-I за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно TMTСЗ.

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела C-A05, представленные в таблице 1, представляют собой GFIFSNAW, IKSKIDGETT и TPGVGANDPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела C-A05 представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность qsvlCRsnnknC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность qquSNtpQT.

Последовательность VH антитела C-A05 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 4. Последовательность VL антитела C-A05 представлена в таблице 1 как SEQ ID

NO: 19. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 4, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 4, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела C-A05, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-A05 за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-

маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-А05 за связывание с клетками, содержащими О-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на О-маннозилированный E-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный E-кадгерин на своей поверхности.

10

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-А05 за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют E-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

15

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антител С-А03, С-В02 и АТ1636-Е, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSNAW, IKSKIDGETT и TPGVGANDPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этих антител С-А03, С-В02 и АТ1636-Е представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антител С-А03, С-В02 и АТ1636-Е представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 5. Последовательность VL антител С-А03, С-В02 и АТ1636-Е представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 5, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.

Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по

меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 5, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела С-А03, или С-В02, или АТ1636-Е, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-А03, или С-В02, или АТ1636-Е за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-А03, или С-В02, или АТ1636-Е за связывание с

клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин на своей поверхности.

5

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-А03, или С-В02, или АТ1636-Е за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТС3.

10

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела С-D04-А, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSNAW, IKSKIDGETT и TPGVGANNPYYFDR.

Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела С-D04-А представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах

15

осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи,

содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий

20

последовательность TPGVGANNPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий

последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий

последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела С-D04-А представлена в таблице 1 как SEQ ID

25 NO: 6. Последовательность VL антитела С-D04-А представлена в таблице 1 как SEQ ID

NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-

кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 6, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности,

30

идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по

меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более

предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%,

более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере

35

91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по

меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 6, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела C-D04-A, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-D04-A за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1A.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-D04-A за связывание с клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на O-маннозилированный E-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют O-маннозилированный E-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антителу или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-D04-A за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно TMTСЗ.

5

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела C-D04-B, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSNAW, IKSKIDGETT и TPGVGANNPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела C-D04-B представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAC и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антителу или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAC, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела C-D04-B представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 6. Последовательность VL антитела C-D04-B представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 20. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антителу или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 6, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 20, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых

35

вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 6, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 20, или последовательности, идентичные им по

5 меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на

10 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент

15 содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела C-D04-B, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-D04-B за связывание с O-маннозилированным E-

20 кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1A.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-D04-B за связывание с клетками, содержащими O-

25 маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на O-маннозилированный E-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют O-маннозилированный E-кадгерин на своей поверхности.

30

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-D04-B за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

35

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антител F-C08, D-G03 и AT1636-N, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSNAW, IKSKIDGGTT и TPGVGANNPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этих антител F-C08, D-G03 и AT1636-N представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела F-C08 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 7. Последовательность VL антитела F-C08 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более

предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антителио или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антителя F-C08, как представлено в таблице 1.

Последовательность VH антителио D-G03 и AT1636-N представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 8. Последовательность VL антителио D-G03 и AT1636-N представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антителио или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 8, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.

Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антителио или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 8, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на

86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по  
 меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более  
 предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на  
 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по  
 5 меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более  
 предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на  
 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по  
 меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное  
 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3  
 10 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-G03 или  
 AT1636-N, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  
 которые конкурируют с антителом F-C08, или D-G03, или AT1636-N за связывание с О-  
 15 маннозилированным Е-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более  
 остатками О-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях  
 аминокислот 467-472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  
 20 которые конкурируют с антителом F-C08, или D-G03, или AT1636-N за связывание с  
 клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с  
 опухолевыми клетками, положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин.  
 Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин  
 на своей поверхности.

25

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  
 которые конкурируют с антителом F-C08, или D-G03, или AT1636-N за связывание с  
 клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-  
 кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

30

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела D-F10, представленные в  
 таблице 1, представляют собой GFTFNSAW, IKSKIDGGTT и TPGVGTNNPYYFDR.

Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела C-A05 представляют собой  
 QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах

35

осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные  
 связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи,

содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGTNNPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела D-F10 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 9. Последовательность VL антитела D-F10 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 9, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 9, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более

предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-F10, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом D-F10 за связывание с О-маннозилированным Е-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками О-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом D-F10 за связывание с клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом D-F10 за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антител С-Е08, D-В06, D-Г05, АТ1636-У и D-Н08, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSYAW, IKSKIDGGTT и TPGVGANDPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этих антител С-Е08, D-В06, D-Г05 и D-Н08 представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий

последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антител C-E08, D-B06 и AT1636-Y представлена в  
5 таблице 1 как SEQ ID NO: 10. Последовательность VL антител C-E08, D-B06 и AT1636-  
Y представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах  
осуществления предложено антителу или антигенсвязывающий фрагмент, способные  
связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH,  
представленную в SEQ ID NO: 10, и последовательность VL, представленную в SEQ ID  
10 NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.  
Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по  
меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более  
предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%,  
более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере  
15 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей  
мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по  
меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более  
предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%,  
более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере  
20 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации  
последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами  
участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено  
антителу или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-  
маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH,  
25 представленную в SEQ ID NO: 10, и последовательность VL, представленную в SEQ ID  
NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%,  
предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на  
86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по  
меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более  
30 предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на  
91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по  
меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более  
предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на  
96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по  
35 меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное  
антителу или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3

тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела C-E08, или D-B06, или AT1636-Y, как представлено в таблице 1.

Последовательность VH антитела D-G05 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 10. Последовательность VL антитела D-G05 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 21. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 10, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 21, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 10, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 21, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент

содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-G05, как представлено в таблице 1.

Последовательность VH антитела D-H08 представлена в таблице 1 как SEQ ID  
5 NO: 11. Последовательность VL антитела D-H08 представлена в таблице 1 как SEQ ID  
NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело  
или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-  
кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 11, и  
последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности,  
10 идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность  
последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по  
меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более  
предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%,  
более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере  
15 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей  
мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по  
меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более  
предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%,  
более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.  
20 Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH  
и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых  
вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент,  
способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие  
последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 11, и последовательность VL,  
25 представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по  
меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более  
предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на  
87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по  
меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более  
30 предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на  
92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по  
меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более  
предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на  
97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по  
35 меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент

содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела D-H08, как представлено в таблице 1.

5 Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-E08, или D-B06, или D-G05, или D-H08, или AT1636-Y за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками O-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

10 Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-E08, или D-B06, или D-G05, или D-H08, или AT1636-Y за связывание с клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на O-маннозилированный E-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют O-маннозилированный E-кадгерин на своей поверхности.

20 Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом C-E08, или D-B06, или D-G05, или D-H08, или AT1636-Y за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно TMTСЗ.

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела C-H01, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSNAW, IKSKIDGGTI и TPGVGANDPYFDR.

25 Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела C-H01 представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTI, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

35

Последовательность VH антитела С-Н01 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 12. Последовательность VL антитела С-Н01 представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 12, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 12, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела С-Н01, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-Н01 за связывание с О-маннозилированным Е-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками О-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-5 472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом С-Н01 за связывание с клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, 10 положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, 15 которые конкурируют с антителом С-Н01 за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

Еще одно предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению 20 представляет собой антитело АТ1636-УН. Это антитело является предпочтительным, поскольку оно способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, экспрессируемый на опухолевых клетках, в частности, недавно обнаруженную усеченную форму Е-кадгерина массой приблизительно 70 кДа. Особым преимуществом АТ1636-УН является то, что оно связывает эту усеченную форму Е-кадгерина массой 70 25 кДа лучше, чем полноразмерный Е-кадгерин массой приблизительно 120 кДа. Как описано выше в настоящем документе, эта характеристика обычно позволяет увеличить опухолеспецифичность в случаях, когда О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа активирован на опухолевых клетках. Еще одно преимущество того, что АТ1636-УН обладает избирательностью в отношении усеченной 30 формы Е-кадгерина массой 70 кДа, заключается в том, что полноразмерный Е-кадгерин широко экспрессируется. Следовательно, в отсутствие избирательности в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа широко экспрессируемый полноразмерный Е-кадгерин может работать как поглотитель и/или вызывать нежелательные эффекты. Кроме того, уровни экспрессии полноразмерного Е-кадгерина 35 очень высоки и поэтому часто неразличимы между здоровыми и опухолевыми эпителиальными клетками, в то время как избирательность в отношении усеченной

формы E-кадгерина массой 70 кДа обеспечивает более высокую опухолеспецифичность. Кроме того, E-кадгерин выполняет важную барьерную функцию, поэтому желательно избегать значительного вмешательства в здоровую функцию E-кадгерина.

Кроме того, AT1636-YN способно связывать экспрессирующий O-маннозилированный E-кадгерин рак толстой кишки подтипов CMS1, CMS2, CMS3 и CMS4. AT1636-YN связывается с опухолевыми клетками, в частности, с эпителиальными опухолевыми клетками, более конкретно с экспрессирующими O-маннозилированный E-кадгерин раковыми клетками, такими как, например, экспрессирующие O-маннозилированный E-кадгерин клетки рака толстой кишки, клетки рака молочной железы, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака эндометрия, клетки рака легкого и клетки рака пищевода. Таким образом, антитело AT1636-YN является особенно подходящим для лечения и/или диагностики расстройства, связанного с присутствием клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин, таких как экспрессирующие O-маннозилированный E-кадгерин раковые клетки, в частности, раковые клетки, которые экспрессируют недавно открытую усеченную форму E-кадгерина массой приблизительно 70 кДа. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей.

Кроме того, антитело AT1636-YN связывает линию клеток эпидермоидной карциномы A431, линию клеток рака легкого A549 и линию клеток мышинной опухоли CMT93 лучше, чем антитело AT1636 (см. фиг. 6B).

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела AT1636-YN, представленные в таблице 1, представляют собой GFTFSYAW, IKSKIDGGTT и TPGVGANNPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела AT1636-YN представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела AT1636-YN представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 15. Последовательность VL антитела AT1636-YN представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-

5 маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.

Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более

10 предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по

15 меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено

20 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%,

25 предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по

30 меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3

35 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела AT1636-YN, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом АТ1636-YN за связывание с О-маннозилированным Е-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками О-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-5 472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом АТ1636-YN за связывание с клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми 10 клетками, положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, 15 которые конкурируют с антителом АТ1636-YN за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

Еще одно предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению 20 представляет собой антитело АТ1636-IYN. Это антитело является предпочтительным, поскольку оно способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, экспрессируемый на опухолевых клетках, в частности, недавно обнаруженную усеченную форму Е-кадгерина массой приблизительно 70 кДа. Особым преимуществом АТ1636-IYN является то, что оно связывает эту усеченную форму Е-кадгерина массой 25 70 кДа лучше, чем полноразмерный Е-кадгерин массой приблизительно 120 кДа. Как описано выше в настоящем документе, эта характеристика обычно позволяет увеличить опухолеспецифичность в случаях, когда О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа активирован на опухолевых клетках. Еще одно преимущество того, что АТ1636-IYN обладает избирательностью в отношении 30 усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа, заключается в том, что полноразмерный Е-кадгерин широко экспрессируется. Следовательно, в отсутствие избирательности в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа широко экспрессируемый полноразмерный Е-кадгерин может работать как поглотитель и/или вызывать нежелательные эффекты. Кроме того, уровни экспрессии полноразмерного Е-кадгерина 35 очень высоки и поэтому часто неразличимы между здоровыми и опухолевыми эпителиальными клетками, в то время как избирательность в отношении усеченной

формы E-кадгерина массой 70 кДа обеспечивает более высокую опухолеспецифичность. Кроме того, E-кадгерин выполняет важную барьерную функцию, поэтому желательно избегать значительного вмешательства в здоровую функцию E-кадгерина.

Кроме того, AT1636-IYN способно связывать экспрессирующий O-маннозилированный E-кадгерин рак толстой кишки подтипов CMS1, CMS2, CMS3 и CMS4. AT1636-IYN связывается с опухолевыми клетками, в частности, с эпителиальными опухолевыми клетками, более конкретно с экспрессирующими O-маннозилированный E-кадгерин раковыми клетками, такими как, например, экспрессирующие O-маннозилированный E-кадгерин клетки рака толстой кишки, клетки рака молочной железы, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака эндометрия, клетки рака легкого и клетки рака пищевода. Таким образом, антитело AT1636-IYN является особенно подходящим для лечения и/или диагностики расстройства, связанного с присутствием клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин, таких как экспрессирующие O-маннозилированный E-кадгерин раковые клетки, в частности, раковые клетки, которые экспрессируют недавно открытую усеченную форму E-кадгерина массой приблизительно 70 кДа. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей.

Кроме того, антитело AT1636-IYN связывает линию клеток рака толстой кишки DLD1, линию клеток эпителиального рака молочной железы MCF10a, линию клеток эпидермоидной карциномы A431, линию клеток рака легкого A549 и линию клеток мышинной опухоли CMT93 лучше, чем антитело AT1636 (см. фиг. 6A и 6B).

Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела AT1636-IYN, представленные в таблице 1, представляют собой GFIFSYAW, IKSKIDGGTT и TPGVGANNPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела AT1636-IYN представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела AT1636-IYN представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 16. Последовательность VL антитела AT1636-IYN представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления

5 предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.

Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по

10 меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по

15 меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами

20 участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%,

25 предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по

30 меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3

35 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела AT1636-IYN, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом АТ1636-IYN за связывание с О-маннозилированным Е-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более остатками О-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом АТ1636-IYN за связывание с клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин на своей поверхности.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом АТ1636-IYN за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

Еще одно предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело АТ1636-IYEN. Это антитело является предпочтительным, поскольку оно способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, экспрессируемый на опухолевых клетках, в частности, недавно обнаруженную усеченную форму Е-кадгерина массой приблизительно 70 кДа. Особым преимуществом АТ1636-IYEN является то, что оно связывает эту усеченную форму Е-кадгерина массой 70 кДа лучше, чем полноразмерный Е-кадгерин массой приблизительно 120 кДа. Как описано выше в настоящем документе, эта характеристика обычно позволяет увеличить опухолеспецифичность в случаях, когда О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа активирован на опухолевых клетках. Еще одно преимущество того, что АТ1636-IYEN обладает избирательностью в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа, заключается в том, что полноразмерный Е-кадгерин широко экспрессируется. Следовательно, в отсутствие избирательности в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа широко экспрессируемый полноразмерный Е-кадгерин может работать как поглотитель и/или вызывать нежелательные эффекты. Кроме того, уровни экспрессии полноразмерного Е-кадгерина очень высоки и поэтому часто неразличимы между здоровыми и опухолевыми

эпителиальными клетками, в то время как избирательность в отношении усеченной формы Е-кадгерина массой 70 кДа обеспечивает более высокую опухолеспецифичность. Кроме того, Е-кадгерин выполняет важную барьерную функцию, поэтому желательно избегать значительного вмешательства в здоровую функцию Е-кадгерина.

5 Кроме того, АТ1636-IYEN способно связывать экспрессирующий О-маннозилированный Е-кадгерин рак толстой кишки подтипов CMS1, CMS2, CMS3 и CMS4. АТ1636-IYEN связывается с опухолевыми клетками, в частности, с эпителиальными опухолевыми клетками, более конкретно с экспрессирующими О-маннозилированный Е-кадгерин раковыми клетками, такими как, например,  
 10 экспрессирующие О-маннозилированный Е-кадгерин клетки рака толстой кишки, клетки рака молочной железы, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака эндометрия, клетки рака легкого и клетки рака пищевода. Таким образом, антитело АТ1636-IYEN является особенно подходящим для лечения и/или диагностики расстройства, связанного с присутствием клеток,  
 15 экспрессирующих О-маннозилированный Е-кадгерин, таких как экспрессирующие О-маннозилированный Е-кадгерин раковые клетки, в частности, раковые клетки, которые экспрессируют недавно открытую усеченную форму Е-кадгерина массой приблизительно 70 кДа. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во  
 20 время терапевтического применения у пациентов-людей.

Кроме того, антитело АТ1636-IYEN связывает линию клеток рака толстой кишки DLD1, линию клеток эпителиального рака молочной железы MCF10a и линию клеток мышинной опухоли CMT93 лучше, чем антитело АТ1636 (см. фиг. 6A).

25 Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела АТ1636-IYEN, представленные в таблице 1, представляют собой GFIFSYAW, IKSKIDGETT и TPGVGANNPYFDR. Последовательности CDR1-3 легкой цепи этого антитела АТ1636-IYEN представляют собой QSVLCRSNNKNC, WAS и QQYSNTPQT. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий  
 30 фрагмент, способные связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий  
 35 последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.

Последовательность VH антитела AT1636-IYEN представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 17. Последовательность VL антитела AT1636-IYEN представлена в таблице 1 как SEQ ID NO: 18. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.

Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR 1-3 легкой цепи антитела AT1636-IYEN, как представлено в таблице 1.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом AT1636-IYEN за связывание с О-маннозилированным Е-кадгерином, предпочтительно за связывание с одним или более  
5 остатками О-маннозилированного треонина, которые присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.

Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом AT1636-IYEN за связывание с клетками,  
10 содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, предпочтительно с опухолевыми клетками, положительными на О-маннозилированный Е-кадгерин. Указанные клетки предпочтительно экспрессируют О-маннозилированный Е-кадгерин на своей поверхности.

15 Кроме того, предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом AT1636-IYEN за связывание с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

20 В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепи описанных выше антител состоят из указанных последовательностей CDR1-3 тяжелой и легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1-3 тяжелой  
25 цепи и легкой цепи антитела AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN или AT1636-IYEN привиты на каркасную последовательность другого антитела. Указанная каркасная последовательность предпочтительно представляет собой  
30 человеческую каркасную последовательность. Последовательности человеческих каркасных областей доступны из общедоступных баз данных ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления для каркасных областей в антителах и антигенсвязывающих фрагментах согласно изобретению используют последовательности зародышевой линии человека. Использование  
35 последовательностей зародышевой линии человека сводит к минимуму риск иммуногенности указанных антител, поскольку эти последовательности зародышевой

линии обычно лишены соматических гипермутаций, которые могут вызывать иммуногенный ответ.

5 В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Присутствие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных действий во время терапевтического применения у пациентов-людей по сравнению с антителами нечеловеческого происхождения.

10 В некоторых вариантах осуществления предложено антитело согласно изобретению, которое представляет собой полноразмерное антитело. Полноразмерные антитела являются предпочтительными из-за их благоприятного периода полувыведения. Антитело по изобретению предпочтительно относится к изотипу IgG. В  
15 частности, предпочтение отдается IgG1 из-за его длительного периода полувыведения из кровотока у людей. Кроме того, антитела IgG1 легко производить в промышленном масштабе, и их Fc-хвост позволяет осуществлять эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC),  
20 комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Для предотвращения иммуногенности у человека предпочтительно, чтобы антитело согласно изобретению представляло собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

25 Как описано выше в настоящем документе, антитело AT1636 относится к изотипу IgG3. Поскольку антитела изотипа IgG3 сложно производить в промышленном масштабе, поскольку они склонны к агрегации, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело изотипа IgG1, которое содержит последовательности CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи антитела AT1636. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело IgG1, которое содержит последовательности  
30 CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из антитела AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело IgG1, которое содержит последовательность VH и последовательность VL антитела, выбранного из  
35 группы, состоящей из антитела AT1636, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или последовательности, идентичные им по

5 меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более  
 предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на  
 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по  
 10 меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более  
 предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на  
 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по  
 меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более  
 предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на  
 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по  
 10 меньшей мере на 99%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей  
 указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR.

Полноразмерные антитела IgG согласно изобретению охватывают антитела, в  
 которых присутствуют мутации, обеспечивающие желаемые характеристики. Такие  
 15 мутации не должны представлять собой делеции значительных частей любой из  
 областей антитела. Однако, как описано выше в настоящем документе, антитела, в  
 которых один или более аминокислотных остатков удалены без существенного  
 изменения характеристик связывания полученного антитела, охватываются термином  
 «полноразмерное антитело». Например, антитело IgG может иметь 1-20 вставок,  
 20 делеций аминокислотных остатков или их комбинацию в константной области.  
 Например, можно снизить гликозилирование и изменить ADCC- или CDC-активность,  
 как описано ниже в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий  
 25 фрагмент согласно изобретению обладает одной или более, и предпочтительно каждой  
 из следующих характеристик:

- связывается с внеклеточным (EC)3 доменом O-маннозилированного E-кадгерина;
- связывает O-маннозилированный усеченный E-кадгерин массой 70 кДа лучше,  
 предпочтительно по меньшей мере в 2 раза лучше, более предпочтительно по меньшей  
 30 мере в 3 раза лучше, более предпочтительно по меньшей мере в 4 раза лучше, более  
 предпочтительно по меньшей мере в 5 раз лучше, чем O-маннозилированный  
 полноразмерный E-кадгерин;
- связывает опухолевые клетки, коэкспрессирующие E-кадгерин и O-  
 маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно обладает по меньшей мере одной из следующих характеристик:

- связывает подтипы рака толстой кишки CMS1, CMS2, CMS3 и CMS4;
- 5 - связывает линию клеток карциномы толстой кишки SW948 лучше, чем здоровые медуллярные эпителиальные клетки тимуса, или дендритные клетки, или клетки Лангерганса.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложено антитело  
10 и антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, обладающие каждой из характеристик, перечисленных выше. Такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты имеют широкую противоопухолевую применимость ввиду их способности связывать разные типы рака и разные подтипы рака толстой кишки. Более того, как  
15 подробно объяснялось выше в настоящем документе, ввиду их избирательности в отношении усеченного E-кадгерина массой 70 кДа по сравнению с полноразмерным E-кадгерином, такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты подходят для увеличения опухолеспецифичности в случаях, когда усеченная форма E-кадгерина массой 70 кДа значительно активирована на опухолевых клетках.

20 Как показано в примерах, предложены антитела, которые специфично связывают один или более остатков O-маннозилированного треонина и/или серина E-кадгерина, где указанные один или более остатков O-маннозилированного треонина и/или серина присутствуют в положениях аминокислот 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на фиг. 1А. Теперь, когда это стало известно, стало  
25 возможным получать или генерировать дополнительные антитела, которые конкурируют за один и тот же эпитоп O-маннозилированного E-кадгерина. Это может быть сделано, например, путем иммунизации животного, отличного от человека, пептидом O-маннозилированного E-кадгерина, содержащим вышеупомянутые аминокислотные остатки 467-472 последовательности E-кадгерина, как показано на  
30 фиг. 1А, или иммуногенным соединением, содержащим такой пептид, или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей такой пептид, предпочтительно с последующим одним или несколькими бустерными введениями. В качестве альтернативы, животные, отличные от человека, могут быть иммунизированы клетками, экспрессирующими ТМТС3 и E-кадгерин, для экспрессии O-маннозилированного E-кадгерина на  
35 поверхности клеток. Кроме того, животные, отличные от человека, могут быть иммунизированы нуклеиновыми кислотами, такими как, например, кДНК,

экспрессирующими как ТМТСЗ, так и E-кадгерин, с помощью так называемых технологий ДНК-иммунизации.

Затем антитела и/или В-клетки, специфичные в отношении указанных эпитопов или пептидов, могут быть получены от указанного животного, отличного от человека. В  
5 некоторых вариантах осуществления полученные антитела гуманизируют, чтобы оптимизировать их для терапии человека. В некоторых вариантах осуществления полученные антитела или В-клетки тестируют на предмет конкуренции с антителом, выбранным из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-  
10 G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или его антигенсвязывающим фрагментом, за связывание с указанным пептидом, или с O-маннозилированным E-кадгерином, или с его усеченной формой массой 70 кДа.

Протоколы иммунизации животных, включая подходящие методики введения и  
15 адъюванты, методики получения и очистки антител и/или иммунных клеток от таких иммунизированных животных, эксперименты по конкурированию и методики гуманизации антител нечеловеческого происхождения хорошо известны в данной области техники. См., например, Hanly et al, 1995.

В качестве альтернативы или дополнительно, указанный пептид или ТМСТЗ–E-  
20 кадгерин-коэкспрессирующую клетку используют для скрининга библиотеки фагового дисплея с целью идентификации и/или выделения O-маннозилированный E-кадгерин-специфичных иммуноглобулинов, обычно Fab-фрагментов. Полученные антитела, В-клетки или Fab-фрагменты обычно будут конкурировать с антителом, выбранным из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-  
25 C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или с его антигенсвязывающим фрагментом, за связывание с указанным пептидом, или с O-маннозилированным E-кадгерином, или с его усеченной формой массой 70 кДа. В некоторых вариантах осуществления проводят конкурентный  
30 анализ.

Также в настоящем документе предложены молекулы нуклеиновых кислот и векторы, которые кодируют по меньшей мере одну последовательность CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Таким образом, в  
35 некоторых вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота или вектор, кодирующие по меньшей мере одну

последовательность CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления кодируются по меньшей мере последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Таким образом, дополнительно предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота или вектор, кодирующие по меньшей мере последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Предпочтительно кодируются по меньшей мере последовательности CDR1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR1-3 легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Таким образом, дополнительно предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота или вектор, кодирующие по меньшей мере последовательности CDR1-3 тяжелой цепи и последовательности CDR1-3 легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Предпочтительно указанные последовательности CDR представляют собой последовательности CDR антитела, как представлено в таблице 1.

В частных вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота кодирует как вариабельную область тяжелой цепи, так и вариабельную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Такие нуклеиновые кислоты особенно подходят для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению в клетках-продуцентах. В некоторых вариантах осуществления указанные нуклеиновые кислоты содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодон-оптимизированные для определенной клетки-продуцента, такой как, например, клетки *E. coli*, яичника китайского хомяка (CHO), NSO (мышинная миелома) или T293, что позволяет эффективно продуцировать антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению в этих клетках-продуцентах. Следует отметить, что продукция антител может быть осуществлена с помощью любой системы продукции рекомбинантных антител; четыре системы клеток-продуцентов, упомянутые выше, являются лишь несколькими примерами многих систем, доступных на сегодняшний день. В контексте настоящего документа термин «кодон» означает триплет нуклеотидов, кодирующий определенный аминокислотный остаток. Термин «кодон-

оптимизированный» означает, что один или более кодонов из исходной, предпочтительно человеческой, последовательности нуклеиновой кислоты заменены одним или более кодонами, которые предпочтительны для определенной клетки-производителя. Эти заменяющие кодоны предпочтительно кодируют тот же аминокислотный остаток, что и исходный кодон, который был заменен. В качестве альтернативы, один или более заменяющих кодонов кодируют другой аминокислотный остаток. Это предпочтительно приводит к консервативной аминокислотной замене, хотя это и не обязательно. В константных областях и каркасных областях обычно допускается одна или более аминокислотных замен. В участках CDR предпочтительно использовать кодоны, которые кодируют тот же аминокислотный остаток, что и исходный кодон, который был заменен, чтобы полученный продукт имел те же аминокислотные последовательности CDR, что и исходное антитело.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности VH и VL предпочтительных антител согласно настоящему изобретению перечислены в таблице 1. Поскольку многие аминокислотные остатки кодируются несколькими разными кодонами нуклеиновой кислоты, для определенного аминокислотного остатка могут быть использованы разные кодоны, например, для оптимизации использования кодонов для определенной клетки-производителя, как объяснялось выше. Кроме того, некоторые вариации последовательностей нуклеиновых кислот, приводящие к отличающимся аминокислотным остаткам, также обычно допустимы, в частности, за пределами последовательностей, кодирующих CDR. Таким образом, в частных вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антитела, представленные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, или кодирующая аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более

предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

- 5 Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH расположены за пределами участков CDR. В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22, или кодирующая аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%.
- 10 Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации
- 15 последовательностей указанных областей VL расположены за пределами участков CDR. В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, и последовательность вариабельной области легкой
- 20 цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22, или кодирующая аминокислотные последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%,
- 25 более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%,
- 30 более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации
- 35

последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR.

В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, по меньшей мере на 80% идентичная последовательности VH или VL, как представлено в таблице 1. Последовательности нуклеиновых кислот VH предпочтительных антител согласно настоящему изобретению перечислены в таблице 1 как SEQ ID NO: 23-39. Последовательности нуклеиновых кислот VL предпочтительных антител согласно настоящему изобретению перечислены в таблице 1 как SEQ ID NO: 40-44. Таким образом, также предложена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-39, и/или содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-44.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержит последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, а также последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи одного и того же антитела, как представлено в таблице 1. Также предложена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-39, и содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-44.

Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR.

В некоторых вариантах осуществления предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, выбранное из группы, состоящей из антител AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN. В некоторых вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке-хозяине, отличной от человеческой.

10

Также предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. В контексте настоящего документа «вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению» также называется «вектором согласно изобретению».

15

Способы конструирования векторов, содержащих одну или более молекул нуклеиновой кислоты согласно изобретению, хорошо известны в данной области техники. Неограничивающими примерами подходящих векторов и платформ для продуцирования являются ретровирусные и лентивирусные векторы, бактериальные или дрожжевые плазмиды, векторы SV40, бакуловирусные векторы, векторы на основе фаговой ДНК, векторы pUC, плазмидные векторы, такие как pBR322, векторы, производимые Lonza, такие как, например, векторы pCon plus, системы для продуцирования производства Rentschler Biopharma, такие как, например, платформа для экспрессии TurboCell™, и платформы для экспрессии от Fujifilm Diosynth, такие как, например, платформа для экспрессии у млекопитающих Apollo™.

20

В некоторых вариантах осуществления вектор согласно изобретению содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности VH и VL антитела, как представлено в таблице 1. Последовательности нуклеиновой кислоты VH этих антител перечислены в таблице 1 как SEQ ID NO: 23-39, а последовательности нуклеиновой кислоты VL этих антител перечислены в таблице 1 как SEQ ID NO: 40-44.

25

Таким образом, также предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-39, и/или содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-44.

30

Предпочтительно вектор согласно изобретению содержит последовательность,

кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, а также последовательность,  
 кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела, как представлено в таблице  
 1. Таким образом, также предложен вектор, содержащий последовательность  
 нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности,  
 5 выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-39, и содержащий  
 последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную  
 последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-44.  
 Предпочтительно указанная идентичность последовательностей составляет по  
 меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более  
 10 предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%,  
 более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере  
 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей  
 мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по  
 меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более  
 15 предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%,  
 более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере  
 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации  
 последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами  
 участков CDR указанных антител.

20

В некоторых вариантах осуществления предложен вектор, содержащий:

- последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 23, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по  
 25 меньшей мере на 80%; или
- последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 23, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательности, идентичные им по  
 меньшей мере на 80%; или
- 30 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 24, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по  
 меньшей мере на 80%;
- последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ  
 35 ID NO: 25, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL,





мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по  
меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более  
предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%,  
более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере  
5 99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации  
последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами  
участков CDR.

В некоторых вариантах осуществления вектор согласно изобретению  
10 представляет собой CAR-T-клеточный вектор, содержащий последовательность  
нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенраспознающий домен и домен активации  
Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления указанный антигенраспознающий  
домен содержит по меньшей мере последовательности CDR1-3 тяжелой цепи антитела  
согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанный  
15 антигенраспознающий домен содержит по меньшей мере последовательности CDR1-3  
легкой цепи антитела согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления  
указанный антигенраспознающий домен содержит последовательности CDR1-3  
тяжелой цепи и последовательности CDR1-3 легкой цепи антитела согласно  
изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанный  
20 антигенраспознающий домен содержит последовательность VH антитела согласно  
изобретению или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%. В  
некоторых вариантах осуществления указанный антигенраспознающий домен  
содержит последовательность VL антитела согласно изобретению или  
последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%. В некоторых вариантах  
25 осуществления указанный антигенраспознающий домен содержит последовательности  
VH и VL антитела согласно изобретению или последовательность, идентичную им по  
меньшей мере на 80%. Предпочтительно указанная идентичность последовательностей  
составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более  
предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%,  
30 более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере  
90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей  
мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по  
меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более  
предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%,  
35 более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере  
99%, более предпочтительно 100%. Предпочтительно указанные вариации

последовательностей указанных областей VH и/или VL расположены за пределами участков CDR.

В некоторых вариантах осуществления указанный антигенраспознающий домен имеет одноцепочечный формат. В некоторых вариантах осуществления указанный CAR-T-клеточный вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен.

Вектор согласно изобретению подходит, например, для *in vitro* продукции антител, или антигенсвязывающих фрагментов, или CAR-T-клеток согласно изобретению. Это осуществляют, например, путем введения такой молекулы нуклеиновой кислоты или вектора в клетку, чтобы механизм трансляции нуклеиновой кислоты указанной клетки продуцировал кодируемые антитела, или антигенсвязывающие фрагменты, или CAR-T-клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты или вектор согласно изобретению экспрессируется в так называемых клетках-продуцентах, таких как, например, клетки *E. coli*, CHO, NSO или T293, некоторые из которых адаптированы для производства антител в промышленном масштабе. Как описано выше в настоящем документе, в таких случаях предпочтительно использовать молекулы нуклеиновых кислот, в которых исходные человеческие последовательности, предложенные в настоящем документе, кодон-оптимизированы для клетки-продуцента. Пролиферация указанных клеток-продуцентов приводит к линии клеток-продуцентов, способной продуцировать антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению. Предпочтительно указанная линия клеток-продуцентов пригодна для продукции антител для применения у людей. Следовательно, указанная линия клеток-продуцентов предпочтительно не содержит патогенных агентов, таких как патогенные микроорганизмы. В некоторых вариантах осуществления антитела, состоящие из человеческих последовательностей, генерируют посредством такой линией клеток-продуцентов.

В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клеточный вектор согласно изобретению вводят в T клетку для получения CAR-T-клетки.

Таким образом, также предложена выделенная или рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая по меньшей мере одно антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или молекулу нуклеиновой кислоты, или вектор согласно изобретению. Такая клетка предпочтительно является клеткой-продуцентом антител, способной к крупномасштабной продукции антител. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего, T-клетку,

бактериальную клетку, растительную клетку, клетку НЕК293Т, клетку CHO, систему для продуцирования производства Lonza, такую как, например, систему для продуцирования рCon plus, систему для продуцирования производства Rentschler Biopharma, как, например, платформа для экспрессии TurboCell™, или платформу для экспрессии от Fujifilm Diosynth, как, например, платформа для экспрессии у млекопитающих Apollo™.

Также предложен способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор согласно изобретению, и предоставление возможности указанной клетке-хозяину транскрибировать указанную нуклеиновую кислоту или вектор, тем самым продуцируя указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Указанный способ согласно изобретению предпочтительно дополнительно включает стадию выделения указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента из указанной клетки-хозяина и/или из культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, как представлено в таблице 1, предпочтительно антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN и их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN и их антигенсвязывающих фрагментов.

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, полученные способом согласно изобретению. Полученные связывающие соединения согласно изобретению подходят, например, для применения в терапии или диагностике человека, необязательно после дополнительных стадий очистки, выделения или обработки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или вектор согласно изобретению вводят животному, отличному от человека, например, для продукции антител *in vivo*. Таким образом, также предложено выделенное или рекомбинантное животное, отличное от человека, содержащее антитело, антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой

кислоты или вектор согласно изобретению. Способы получения трансгенных животных, отличных от человека, известны в данной области техники.

## 5 **Дополнительные модификации антител**

Также предложены антитела согласно изобретению, в которых один или более аминокислотных остатков константной области являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислот в Fc-области модифицированы для снижения гликозилирования. N-гликозилирование является часто встречающейся посттрансляционной модификацией антител и, как известно, происходит в мотивах гликозилирования, содержащих консенсусную последовательность N-X-S или N-X-T, где N представляет собой аспарагин, X представляет собой любой аминокислотный остаток, S представляет собой серин, а T представляет собой треонин. Гликозилирование Fc влияет на структурные характеристики Fc-части антитела, тем самым влияя на эффекторные функции и фармакокинетику. Поскольку гликозилирование Fc может привести к уменьшению периода полувыведения и/или повышению иммуногенности, гликозилирование может быть нежелательным для терапевтического антитела. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислот в области гликозилирования Fc модифицированы по сравнению с исходным родительским антителом, чтобы снизить гликозилирование или избежать его. Например, по меньшей мере один из остатков N, S и T вышеупомянутых мотивов гликозилирования является измененным. В некоторых вариантах осуществления остаток аспарагина в положении 47 (N47) области CH2 является измененным. В некоторых вариантах осуществления треонин в положении 95 (T95) области CH2 является измененным.

В качестве альтернативы или дополнительно, один или более сайтов гликозилирования в вариабельной каркасной области антитела согласно изобретению изменены, чтобы снизить гликозилирование или избежать его.

Константные домены антител играют роль в различных характеристиках антител, таких как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Fc-области опосредуют функцию антител путем связывания с различными рецепторами на иммунных эффекторных клетках, таких как макрофаги, естественные клетки-киллеры, В-клетки и нейтрофилы. Некоторые из этих рецепторов, такие как CD16A (FcγRIIIA) и CD32A (FcγRIIA), активируют иммунные эффекторные

клетки для создания ответа против антигенов. Другие рецепторы, такие как CD32B, ингибируют активацию иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело согласно изобретению сконструировано для повышения ADCC-активности.

Одним из способов повышения ADCC-активности антитела является афукозилирование. Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, которые являются афукозилированными.

Для получения афукозилированных антител могут быть использованы любые способы, известные в данной области техники. Афукозилированные антитела, например, получают с использованием линий клеток-продуцентов со сниженной способностью к фукозилированию, таких как, например, мутант CHO Lec13 (Patnaik & Stanley, 2006). Также возможно нокаутировать ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, в линиях клеток, таких как CHO (технология Potelligent®) (Yamane-Ohnuki et al, 2004).

В качестве альтернативы можно использовать линию клеток, продуцирующую антитела, в которой сверхэкспрессирована N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnT III), что приводит к получению нефукозилированных антител (технология GlycoMAb™).

В качестве альтернативы или дополнительно можно использовать несколько других стратегий для достижения повышения ADCC, например, включая гликоинженерию (Kyowa Hakko/Biowa, GlycArt (Roche) и Eureka Therapeutics) и мутагенез (Xencor и MacroGenics), все из которых направлены на улучшение связывания Fc к низкоаффинному активирующему FcγRIIIa и/или на снижение связывания с низкоаффинным ингибирующим FcγRIIb. Химико-ферментативная модификация также использовалась для модификации Fc-связанных N-гликанов.

Известно, что помимо фукозы в ADCC-активности играют роль другие сахарные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению гипергалактозилированы для повышения ADCC.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота сайта связывания FcγR в Fc-домене антитела согласно изобретению модифицирована для управления взаимодействиями Fc/FcR. В некоторых вариантах осуществления в Fc-домен антитела согласно изобретению вводят аминокислотные мутации S298A, E333A и K334A. Сообщается, что эти мутации повышают ADCC-активность (Shields et

al, 2001). В некоторых вариантах осуществления ADCC-активность антитела согласно изобретению повышают путем введения аминокислотных мутаций S239D и I332E, необязательно в сочетании с аминокислотной мутацией A330L (Lazar et al, 2006). В некоторых вариантах осуществления ADCC-активность антитела согласно изобретению

- 5 повышают путем введения аминокислотных мутаций L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L (Stavenhagen et al, 2007). Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, содержащие аминокислотные мутации, выбранные из следующей группы:
- S298A, E333A, K334A;
  - 10 - S239D, I332E;
  - S239D, I332E, A330L; и
  - L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L.

Существует несколько методов *in vitro* для определения эффективности антител

15 в отношении индукции ADCC. К ним относятся анализы высвобождения хрома-51 [Cr51], анализы высвобождения европия [Eu] и анализы высвобождения серы-35 [S35]. Обычно меченую линию клеток, экспрессирующую определенный антиген, экспонируемый на поверхности, инкубируют с антителом, специфичным к этому антигену. После промывки эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецептор CD16,

20 обычно совместно инкубируют с мечеными антителами клетками-мишенями. Затем лизис клеток-мишеней обычно измеряют по высвобождению внутриклеточной метки, например, с помощью сцинтилляционного счётчика или спектрофотометрии. В качестве альтернативы может быть использован анализ цитотоксичности на основе люциферазы, при котором клетки-мишени, экспрессирующие люциферазу светлячка,

25 инкубируют с антителом, таким как, например, биспецифичное или мультиспецифичное антитело. После промывки добавляют эффекторные клетки и совместно инкубируют. Затем обычно измеряют гибель клеток-мишеней путем лизиса оставшихся клеток-мишеней и измерения люминесценции люциферина с помощью спектрофотометрии.

30 В некоторых вариантах осуществления антитело согласно изобретению сконструировано для повышения CDC-активности. Одним из способов повышения CDC является введение аминокислотной мутации K326W и/или E333S в Fc-домен (Idusogie et al, 2001). В некоторых вариантах осуществления в Fc-домен антитела согласно изобретению вводят аминокислотные мутации S267E, H268F и S324T для повышения

CDC-активности. Поскольку сообщается, что эти мутации снижают ADCC-активность, предпочтительно также вводить аминокислотные замены G236A и I332E для восстановления ADCC-активности (Moore et al, 2010).

5 В некоторых вариантах осуществления в Fc-домен антитела согласно изобретению вводят аминокислотную мутацию E345R для повышения CDC-активности. В некоторых вариантах осуществления в Fc-домен антитела согласно изобретению вводят аминокислотные мутации E345K и/или E430G для повышения CDC- и ADCC-активности (De Jong et al, 2016).

10 Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, содержащие одну или более аминокислотных мутаций, выбранных из следующей группы:

- K326W;
- E333S;
- 15 - K326W, E333S;
- E345R;
- E345K;
- E430G;
- E345K, E430G;
- 20 - S267E, H268F, S324T; и
- S267E, H268F, S324T, G236A, I332E.

В то время как иммунные эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, полезны при многих терапевтических применениях, при других применениях полезно их снизить. Такие применения, например, включают терапевтические подходы, при которых механизм действия, в частности, основаны на Fab-плечах или других фрагментах, слитых с Fc-областью. В таких случаях уменьшение взаимодействий Fc/FcR и/или Fc/C1q может быть полезным для уменьшения повреждения тканей, вызванного иммунными эффекторными функциями. Следовательно, снижение

25 иммунных эффекторных функций может быть предпочтительным в тех случаях, когда применение антител согласно изобретению не требует ADCC или CDC. Эффекторные функции антитела согласно изобретению могут, например, быть ослаблены за счет использования формата IgG2 или IgG4, которые имеют сниженные эффекторные функции по сравнению с IgG1. В некоторых вариантах осуществления эффекторные

30 функции антитела согласно изобретению ослаблены путем введения мутации L235E в Fc-область или путем введения одной или более других мутаций в аминокислотные

35

положения 234-237. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG1 согласно изобретению содержит аминокислотные замены L234A и L235A (мутации LALA) для ослабления эффекторных функций (Lund et al, 1992). В некоторых вариантах осуществления антитело IgG1 согласно изобретению содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (мутации LALA-PG) для ослабления эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG4 согласно изобретению содержит аминокислотные замены S228P и L235E (мутации SPLE). Введение аминокислотной замены P329G также эффективно для ослабления эффекторных функций.

Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, содержащие одну или более аминокислотных мутаций, выбранных из следующей группы:

- L235E;
- L234A, L235A;
- L234A, L235A, P329G;
- S228P, L235E; и
- S228P, L235E, P329G.

### **Биспецифичные или мультиспецифичные связывающие соединения**

Еще один аспект изобретения относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту согласно изобретению, связанным с другим соединением. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению связаны с другим терапевтическим фрагментом, таким как, например, лекарственное средство, химиотерапевтический препарат, токсичный компонент, цитотоксическое средство или радиоактивное соединение, с образованием так называемого «конъюгата антитело-лекарственное средство» (ADC).

В некоторых вариантах осуществления предложен ADC, где ADC содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и модуль цитостатического или цитотоксического лекарственного средства. Модуль лекарственного средства может, например, разрушать цепи ДНК (например, дуокармицины, калихеамицины, пирролобензодиазепины [PBD] и SN-38 [активный метаболит иринотекана]) или микротрубочки (например, майтанзины и ауристатины) или ингибировать топоизомеразу или РНК-полимеразу, что приводит к гибели клеток (Chau et al, 2019). В некоторых вариантах осуществления указанный ADC содержит модуль химического линкера между модулем цитостатического или цитотоксического

лекарственного средства и модулем антитела (Tsuchikama, 2018). В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает модуль лекарственного средства из антитела или антигенсвязывающего фрагмента во внутриклеточной среде. В

5 некоторых вариантах осуществления линкерный модуль не является расщепляемым, и лекарственное средство, например, высвобождается в результате деградации антитела. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется расщепляющим агентом, присутствующим во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, или эндосоме, или кавеоле). Неограничивающие примеры расщепляемых линкеров включают

10 дисульфидсодержащие линкеры, которые расщепляются посредством дисульфидного обмена, кислотно-лабильные линкеры, которые расщепляются при кислотном pH, и линкеры, которые расщепляются гидролазами, эстеразами, пептидазами и глюкоуонидазами.

15 В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с нуклеиновой кислотой, которая может представлять собой цитотоксическую рибонуклеазу, антисмысловую нуклеиновую кислоту, молекулу ингибирующей РНК (например, молекулу миРНК) или иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту (например, иммуностимулирующую молекулу ДНК, содержащую

20 CpG-мотив). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с аптамером или рибозимом вместо ауристатиона, или функциональным аналогом пептида или его производным.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное

25 средство согласно изобретению содержит одну или более аминокислот с радиоактивной меткой, которые можно использовать как для диагностических, так и для терапевтических целей. Способы получения аминокислот с радиоактивной меткой и соответствующих производных пептидов известны в данной области техники (см., например, Junghans et al. 1996, US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990

30 (US RE35,50G), US 5,648,471 и US 5,697,902). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению конъюгированы с радиоизотопом или с радиоизотоп-содержащим хелатом.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, также могут быть конъюгированы с метками, такими как  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,

35  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{234}\text{Th}$  и  $^4\text{K}$ ,  $^{151}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{Tr}$  и  $^{56}\text{Fe}$ .

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, связанный с антителом или антигенсвязывающим фрагментом согласно изобретению, представляет собой иммуномодулирующее соединение. Предпочтительным примером такого  
5 иммуномодулирующего соединения является соединение, связывающееся с Т-клетками, соединение, связывающееся с НК-клетками, соединение, связывающееся с НКТ-клетками, или соединение, связывающееся с гамма-дельта Т-клетками. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанное соединение, связывающееся с Т-клетками, представляет собой CD3-специфичное связывающее  
10 соединение, KLRG1-специфичное связывающее соединение или CD103-специфичное связывающее соединение. При связывании с антителом или антигенсвязывающим фрагментом согласно изобретению такое соединение, связывающееся с Т-клетками, будет нацеливать Т-клетки на клетки, такие как раковые клетки, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, тем самым индуцируя или  
15 усиливая цитотоксический Т-клеточный ответ против указанных (раковых) клеток.

Аналогичным образом соединение, связывающееся с НК-клетками, соединение, связывающееся с НКТ-клетками, или соединение, связывающееся с гамма-дельта Т-клетками, подходит для нацеливания на НК-клетки, НКТ-клетки или гамма-дельта Т-клетки, соответственно, для привлечения их к клеткам, которые экспрессируют Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, и индукции цитотоксичности или другой  
20 иммуноопосредованной активности.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанное соединение, связывающееся с Т-клетками, представляет собой CD3-специфичное связывающее соединение. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления  
25 указанное соединение, связывающееся с Т-клетками, представляет собой KLRG1-специфичное связывающее соединение. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанное соединение, связывающееся с Т-клетками, представляет собой CD103-специфичное связывающее соединение.

30 В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению связаны с TGF $\beta$ -специфичным связывающим соединением. Это особенно эффективно для нацеливания антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению на клетки, предпочтительно  
35 специфические для заболевания клетки, такие как опухолевые клетки, которые содержат О-маннозилированный Е-кадгерин и TGF $\beta$ . Как показано в примерах,

антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению особенно хорошо способны ингибировать рост опухолевых клеток и/или усиливать гибель опухолевых клеток, когда указанная опухоль экспрессирует как O-маннозилированный E-кадгерин, так и TGF $\beta$ .

5

Обзор биспецифичных антител и конструкций на основе антител в онкологии приведен в Suurs et al, 2019.

10 Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и иммуномодулирующую молекулу.

15 В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения, связывающегося с Т-клетками, соединения, связывающегося с НК-клетками, соединения, связывающегося с НКТ-клетками, и соединения, связывающегося с гамма-дельта Т-клетками.

20

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и CD3-специфичное связывающее соединение.

25

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и CD103-специфичное связывающее соединение.

30

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и KLRG1-специфичное связывающее соединение.

35

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и TGF $\beta$ -специфичное связывающее соединение.

5

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, которые связаны с другим опухолесвязывающим соединением. Такие биспецифичные или мультиспецифичные соединения обеспечивают, например, повышенное связывание или более специфичное связывание опухолевых клеток, особенно когда два или более связанных связывающих соединения специфичны к разным эпитопам на опухолевых клетках. Таким образом, такое биспецифичное или мультиспецифичное соединение особенно хорошо подходит для терапевтических или диагностических применений.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связаны с меткой. Это позволяет обнаруживать клетки, содержащие E-кадгерин, такие как, например, E-кадгерин-положительные раковые клетки, с использованием такого меченого связывающего соединения. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связаны с гормоном или ферментом. Это позволяет нацеливать такой гормон или фермент на содержащие E-кадгерин (раковые) клетки. В других вариантах осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, связанные со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

25

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, которые связаны с другим соединением, предпочтительно с соединением, выбранным из группы, состоящей из иммуномодулирующего соединения, соединения, связывающегося с Т-клетками, соединения, связывающегося с НК-клетками, соединения, связывающегося с НКТ-клетками, и соединения, связывающегося с гамма-дельта-Т-клетками, CD3-специфичного связывающего соединения, TGF $\beta$ -специфичного связывающего соединения, цитокина, второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, детектируемой метки, лекарственного средства, химиотерапевтического лекарственного средства, цитотоксического средства, токсичного фрагмента, гормона, фермента и радиоактивного соединения.

35

В некоторых вариантах осуществления указанное второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также специфичны к О-маннозилированному E-кадгерину. Таким образом, предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые также специфичны к О-маннозилированному E-кадгерину. Полученное связывающее соединение является моноспецифичным к E-кадгерину, и каждое Fab-плечо обычно связывает свой собственный эпитоп E-кадгерина. В некоторых вариантах осуществления эпитопы, распознаваемые Fab-фрагментами, отличаются друг от друга. В других вариантах осуществления эпитопы являются одинаковыми. Fab-плечи могут связывать эпитопы с различной аффинностью. В качестве альтернативы, Fab-плечи связывают свои эпитопы с по существу одинаковой аффинностью, что означает, что KD Fab-плечей отличаются друг от друга не более чем на 30%, предпочтительно не более чем на 20% или не более чем на 10%.

В некоторых вариантах осуществления указанное второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению. Таким образом, предложено биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, содержащее по меньшей мере два антитела или антигенсвязывающих фрагмента согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанные по меньшей мере два антитела или антигенсвязывающих фрагмента согласно изобретению связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636 или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636-I или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636-E или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636-N или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636-Y или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит

по меньшей мере два антитела AT1636-YN или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636-IYN или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах

5 осуществления указанное биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение содержит по меньшей мере два антитела AT1636-IYEN или их антигенсвязывающие части.

В некоторых вариантах осуществления предложено связывающее соединение,

10 которое способно связывать O-маннозилированный E-кадгерин, где указанное соединение содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и терапевтическое лекарственное средство, или радиоактивное соединение, или токсичный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению связаны с другим специфичным к E-кадгерину связывающим соединением, таким как, например, известное в настоящее время антитело к E-кадгерину или его антигенсвязывающий фрагмент, для получения биспецифичного или мультиспецифичного соединения. В некоторых вариантах

20 осуществления тяжелая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению спарена с тяжелой цепью другого специфичного к E-кадгерину антитела для получения биспецифичного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Биспецифичные или мультиспецифичные соединения согласно изобретению обеспечивают, например, повышенное связывание с клетками,

25 содержащими E-кадгерин. Таким образом, такое биспецифичное или мультиспецифичное соединение очень подходит для терапевтических или диагностических применений. Также можно применять биспецифичные или мультиспецифичные соединения согласно изобретению в анализах, в которых разные клетки, содержащие E-кадгерин, связываются с одним и тем же биспецифичным или

30 мультиспецифичным связывающим соединением.

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат один Fab-фрагмент антитела согласно настоящему изобретению и один Fab-фрагмент другого антитела. В

35 некоторых вариантах осуществления такое биспецифичное антитело содержит один Fab-фрагмент антитела согласно изобретению и один Fab-фрагмент другого антитела,

предпочтительно специфичного к Т-клетке, НК-клетке, NKT-клетке или гамма-дельта Т-клетке, такой как например, Fab-фрагмент, специфичный к CD3, KLRG1 или CD103.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено

5 биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

- один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и

10 - один Fab-фрагмент другого антитела, предпочтительно специфичного к Т-клетке, НК-клетке, NKT-клетке или гамма-дельта Т-клетке.

Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

15 - один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и

- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к CD3.

20 Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

- один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и

- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к KLRG1.

25

Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

30 - один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и

- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к CD103.

35 Также предложено биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащие:

- один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и

- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к TGF $\beta$ .

5 Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению могут быть связаны с другим фрагментом, таким как, например, лекарственное средство или иммуномодулирующее соединение или метка, через линкер, такой как, например, кислотнo-лабильный гидразоноый линкер, или через пептидный линкер, такой как цитруллин-валин, или через тиоэфирную связь, или посредством трансамидирования, катализируемого сортазой, которое подробно описано в WO 2010/087994.

10 Трансамидирование, катализируемое сортазой, включает создание сайта распознавания сортазой (LPETGG) на тяжелой цепи антитела, предпочтительно на C-концевой части тяжелой цепи, и на фрагменте, который должна быть связан с указанным антителом. Антитело и фрагмент также обычно содержат

15 последовательность GGGGS и метку для целей очистки, такую как HIS-метка. Затем осуществляют трансамидирование, опосредованное сортазой, с последующим связыванием с помощью клик-химии. В трансамидировании, катализируемом сортазой, «связывание с помощью клик-химии» обычно включает химическое связывание, например, алкин-содержащего реагента и, например, азид-содержащего

20 реагента, которые добавляют с помощью сортазы путем добавления глицинов к мотиву сортазы на тяжелой цепи антитела и мотиву сортазы на фрагменте (таком как белок, пептид или антитело), который должен быть связан с антителом. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения предложено антитело согласно изобретению, в котором сайт распознавания сортазой (LPETGG) сконструирован на

25 тяжелой цепи антитела, предпочтительно на C-концевой части тяжелой цепи, причем антитело предпочтительно дополнительно содержит последовательность GGGGS и метку очистки, такую как HIS-метка.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению связаны с другим фрагментом посредством

30 тиоэфирной связи. В таких случаях в антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению предпочтительно включают один или более цистеинов. Цистеины содержат тиольную группу, и, следовательно, включение одного или более цистеинов в антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению или замена одной или более аминокислот одним или более цистеинами обеспечивает

35 связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с другим фрагментом. Указанные один или более цистеинов предпочтительно вводят в

положение, в котором они не оказывают существенного влияния на укладку указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента и по существу не влияют на антигенсвязывающую или эффекторную функцию. Таким образом, изобретение также относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту согласно изобретению, которые содержат последовательность тяжелой цепи антитела, 5 выбранного из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, где по меньшей мере одна аминокислота 10 указанного антитела (отличная от цистеина) была заменена цистеином.

Настоящее изобретение также относится к Т-клеткам с химерным антигенным рецептором (CAR), которые содержат последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления 15 указанные CAR-Т-клетки дополнительно содержат последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела согласно изобретению.

Химерные антигенные рецепторы (CAR, также известные как химерные иммунорецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или искусственные Т-клеточные рецепторы) представляют собой сконструированные рецепторные белки, которые могут 20 придать клеткам способность связывать новую специфическую мишень. CAR сочетают в себе функции связывания антигена и активации клеток в одном рецепторе. CAR обычно имеют модульную структуру, включающую антигенсвязывающий домен и один или более внутриклеточных доменов, прямо или опосредованно связанных, которые передают сигналы активации. В зависимости от количества костимулирующих доменов 25 CAR можно разделить на CAR первого (только CD3z), второго (один костимулирующий домен + CD3z) или третьего поколения (более одного костимулирующего домена + CD3z). Введение генов CAR в Т-клетку успешно перенаправляет Т-клетку с дополнительной антигенной специфичностью и обеспечивает необходимые сигналы для полной активации Т-клетки. В качестве альтернативы гены CAR также могут быть 30 введены в другие иммунные клетки, такие как НК, НКТ или гамма-дельта Т-клетки (Rafiq et al. 2019).

Антигенсвязывающие характеристики CAR предпочтительно определяются внеклеточным scFv. Формат scFv обычно представляет собой два переменных домена, связанных гибкой пептидной последовательностью либо в ориентации VH- 35 линкер-VL, либо в ориентации VL-линкер-VH. Другие форматы, известные в данной

области техники, включают Tandem CAR, Looped Tandem CAR и CAR, которые связывают общие адаптерные молекулы. (Guedan et al. Mol Ther 2019).

Внутриклеточный сигнальный домен CAR обычно содержит домен активации и один или более костимулирующих доменов. В данной области техники подавляющее  
5 большинство CAR активируют CAR-T-клетки посредством CD3 $\zeta$ -производных мотивов активации иммунорецепторов на основе тирозина. Наиболее широко изученные костимулирующие домены получены из костимулирующих молекул из семейства генов CD28 (включая CD28 и ICOS) или семейства генов рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) (включая 4-1BB (CD137), OX40 и CD27). Альтернативные домены включают  
10 домены, полученные из MYD88 или иммуноглобулин-подобного рецептора клеток-киллеров 2DS2 (KIR2DS2; в сочетании с коэкспрессией белка, связывающего протеинтирозинкиназу TYRO, также известного как DAP12). В качестве альтернативы, связывающие домены, используемые для CAR-T-клеток, могут быть слиты с  
внеклеточными N-концами любой из пяти других субъединиц TCR, что приводит к  
15 включению соответствующих слитых конструкций TCR (TRuC) в комплекс TCR. (Bauerle et al, 2019).

Стратегии, используемые в данной области техники для генетической модификации клеток для экспрессии CAR, включают средства генной инженерии на  
20 вирусной и невирусной основе, такие как гамма-ретровирусные и лентивирусные векторы. Другие методы включают, например, системы транспозонов, такие как «Спящая красавица» (SB) и piggyBac, мРНК, неинтегрирующийся лентивирус, ферменты эндонуклеазы (Guedan et al. 2019) и наноносители ДНК для  
программирования клеток *in situ*.

25 CAR-T-клетка согласно изобретению связывает O-маннозилированный E-кадгерин, предпочтительно его усеченную форму массой 70 кДа, и поэтому очень подходит для применения в иммунотерапии, направленной против раковых клеток, положительных на O-маннозилированный E-кадгерин. Таким образом, в некоторых  
30 вариантах осуществления предложена T-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR), которая способна связывать O-маннозилированный E-кадгерин, где указанная CAR-T-клетка содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанная  
CAR-T-клетка содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи  
35 антитела, как представлено в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления указанная CAR-T-клетка также содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3

легкой цепи антитела, как представлено в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления указанная CAR-T-клетка содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04,  
 5 E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN.

В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная или  
 10 рекомбинантная клетка-хозяин или животное, отличное от человека, содержащее биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или CAR-T-клетку согласно изобретению.

### 15 **Терапевтические применения антител к E-кадгерину**

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению подходят для применения против клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин. Далее предоставлены способы лечения субъектов, включая субъектов-людей, нуждающихся в лечении антителами или  
 20 антигенсвязывающими фрагментами, или ADC, или CAR-T-клетками согласно изобретению. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты или вектор согласно изобретению, или клетка, содержащая нуклеиновую кислоту согласно изобретению, для применения в качестве лекарственного средства и/или профилактического средства. При введении (вектора, содержащего) одну или более молекул нуклеиновой  
 25 кислоты согласно изобретению молекула(ы) нуклеиновой кислоты будет транслироваться *in situ* в антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Полученные антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению затем будут противодействовать расстройствам, связанным с клетками, экспрессирующими O-маннозилированный E-кадгерин, таким как, например, E-  
 30 кадгерин-положительные и ТМТСЗ-положительные опухоли, или предотвращать их. Аналогичным образом, введение клетки согласно изобретению нуждающемуся в этом пациенту приведет к образованию *in vivo* терапевтических или профилактических антител или антигенсвязывающих фрагментов к O-маннозилированному E-кадгерину согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в качестве лекарственного средства или профилактического средства. В некоторых вариантах осуществления указанное лекарственное средство или профилактическое средство предназначено для лечения расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими E-кадгерин. В частных вариантах осуществления указанные клетки также экспрессируют O-маннозилтрансферазу, обеспечивающую O-маннозилирование E-кадгерина и его связывание с антителами и их антигенсвязывающими фрагментами, специфичными в отношении O-маннозилированного E-кадгерина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу.

В частных вариантах осуществления указанная O-маннозилтрансфераза представляет собой ТМТСЗ, которая хорошо известна своей O-маннозилирующей активностью в отношении E-кадгерина. Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и ТМТСЗ.

В некоторых вариантах осуществления указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, представляет собой эпителиальный рак. В некоторых вариантах осуществления указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, выбрано из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих

путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходноклеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза. В некоторых вариантах осуществления указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, выбрано из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рак желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

В контексте настоящего документа опухолевая клетка, экспрессирующая Е-кадгерин, также называется «экспрессирующей Е-кадгерин опухолевой клеткой» или «Е-кадгерин-положительной опухолевой клеткой». Опухолевая клетка, которая экспрессирует как Е-кадгерин, так и ТМТС3, также называется в настоящем документе «экспрессирующей Е-кадгерин и экспрессирующей ТМТС3 опухолевой клеткой», или «экспрессирующей Е-кадгерин и ТМТС3 опухолевой клеткой», или «Е-кадгерин-положительной и ТМТС3-положительной опухолевой клеткой», или «Е-кадгерин- и ТМТС3-положительной опухолевой клеткой». Рак, содержащий опухолевые клетки, экспрессирующие Е-кадгерин и ТМТС3, называется в настоящем документе «Е-кадгерин-положительным и ТМТС3-положительным раком».

«Субъект» может представлять собой человека или животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как, например, человек, кошка, собака, кролик, мышь, крыса, корова, коза, лошадь, свинья, обезьяна, человекообразная обезьяна или горилла. В частных вариантах осуществления указанный субъект представляет собой человека.

В контексте настоящего документа термин «заболевание, связанное с клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу» означает любое заболевание, которое связано с наличием специфических для заболевания клеток, экспрессирующих Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу. В некоторых вариантах

осуществления такие клетки являются причинным фактором заболевания, как это часто бывает с опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу. В некоторых вариантах осуществления присутствие таких клеток вызывает неблагоприятные симптомы, такие как, например, воспаление и/или боль.

Термин «лечение или предупреждение расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу» может относиться к противодействию возникновению или прогрессированию указанного расстройства и/или к облегчению симптомов, возникающих в результате указанного расстройства. Например, термин «лечение или предупреждение расстройства, связанного с опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу» может включать предотвращение, противодействие и/или замедление роста указанных опухолевых клеток, и/или облегчение симптомов, возникающих в результате присутствия указанных опухолевых клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака. Преимуществом специфичных к O-маннозилированному E-кадгерину антител и антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению является их специфичность в отношении (опухолевых) клеток, экспрессирующих как E-кадгерин, так и ТМТСЗ, при этом они в значительно меньшей степени связываются с E-кадгерин-положительными клетками, которые не экспрессируют ТМТСЗ. Это позволяет уменьшить неблагоприятные побочные действия, так что пациент может переносить более высокие дозы.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного эпителиального рака.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе

5 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного рака, выбранного из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака

10 молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака

15 шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходно-клеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или

20 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного колоректального рака.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или

25 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного

30 рака толстой кишки.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе

35 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного рака толстой кишки подтипа CMS1.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе  
5 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного рака толстой кишки подтипа CMS2.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота,  
10 или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного рака толстой кишки подтипа CMS3.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или  
15 мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного рака толстой кишки подтипа CMS4.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или  
20 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного рака гортани.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или  
25 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного  
30 рака головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота,  
или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе  
35 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTСЗ-положительного рака молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе  
5 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного рака поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота,  
10 или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного рака пищевода.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или  
15 мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного рака мочевого пузыря.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или  
20 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного  
рака легкого.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или  
25 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе  
лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного  
30 рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота,  
или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе  
35 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и TMTCS3-положительного рака мочевыводящих путей.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе  
5 лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака предстательной железы или рака яичника.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC,  
10 или CAR-T-клетку, или нуклеиновую кислоту, или вектор, или клетку-хозяина согласно изобретению применяют против E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака, который также содержит опухолевые клетки, экспрессирующие трансформирующий фактор роста бета (TGFB), предпочтительно TGFB1. В контексте  
15 настоящего документа рак, который содержит опухолевые клетки, экспрессирующие E-кадгерин, и опухолевые клетки, экспрессирующие ТМТСЗ, и опухолевые клетки, экспрессирующие TGFB, называется «E-кадгерин-положительным и ТМТСЗ-положительным и TGFB-положительным раком». Как показано в примерах, антитело или функциональный фрагмент согласно изобретению особенно хорошо связываются с  
20 опухолевыми клетками, если присутствует TGFB. Комбинация антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению с TGFB особенно подходит для ингибирования роста опухолевых клеток и/или для усиления гибели опухолевых клеток. Таким образом, также предложено антитело или антигенсвязывающий  
фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно  
25 изобретению для применения в способе лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного и TGFB-положительного рака. Преимуществом улучшенного ингибирования роста опухолевых клеток в присутствии TGFB является возможность использования более низкой дозировки.

30 Предпочтительным антителом для применения в любом из перечисленных способов является антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, а также их  
35 антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают такой же специфичностью связывания.

В некоторых вариантах осуществления предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению для изготовления лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу. В частных вариантах осуществления указанные клетки представляют собой опухолевые клетки. В частных вариантах осуществления указанная O-маннозилтрансфераза представляет собой ТМТСЗ. В некоторых вариантах осуществления предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения или предотвращения E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака. В некоторых вариантах осуществления указанный E-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак представляет собой эпителиальный рак. В некоторых вариантах осуществления указанный E-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак выбран из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходного-клеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза. В некоторых вариантах осуществления указанный E-кадгерин-

положительный и ТМТСЗ-положительный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рак желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая биспецифичное антитело, мультиспецифичное антитело, ADC или CAR-T-клетку согласно изобретению. Также предложена композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, а также композиция, содержащая вектор или клетку согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN. В некоторых вариантах осуществления композиция согласно изобретению содержит антитело согласно изобретению и другое специфичное к E-кадгерину антитело. Указанное другое специфичное к E-кадгерину антитело предпочтительно связывает другой эпитоп E-кадгерина по сравнению с антителом согласно изобретению. Такая комбинация разных специфичных к E-кадгерину антител особенно подходит для связывания и/или противодействия E-кадгерин-положительным клеткам, таким как E-кадгерин- и ТМТСЗ-положительные опухолевые клетки.

В некоторых вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию. Такая фармацевтическая композиция предпочтительно также содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество.

Неограничивающие примеры подходящих носителей включают, например, гемоцианин лимфы улитки (KLH), сывороточный альбумин (например, BSA или RSA) и яичный альбумин. В некоторых частных вариантах осуществления указанный подходящий носитель включает раствор, такой как, например, физиологический раствор. Фармацевтическая композиция согласно изобретению предпочтительно подходит для применения у людей.

Изобретение также относится к способу лечения и/или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно, не ограничиваясь перечисленным, опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму 5 терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и/или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению, и/или нуклеиновой кислоты согласно изобретению, и/или вектора или клетки согласно изобретению, и/или композиции или составного набора согласно изобретению. Также 10 предложен способ по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и/или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T- 15 клетки согласно изобретению, и/или нуклеиновой кислоты согласно изобретению, и/или вектора или клетки согласно изобретению, и/или композиции или составного набора согласно изобретению. Указанная композиция предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию согласно изобретению. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или молекулу нуклеиновой кислоты, или вектор, или 20 ADC, или CAR-T-клетку, или фармацевтическую композицию согласно изобретению предпочтительно вводят посредством одной или более инъекций. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или молекулу нуклеиновой кислоты, или вектор, или ADC, или CAR-T-клетку, или фармацевтическую композицию согласно изобретению вводят с помощью 25 внутривенного введения. В качестве альтернативы используют другие способы введения, известные в данной области техники. Неограничивающие примеры вводимых доз связывающего соединения согласно изобретению составляют от 0,1 до 10 мг на кг массы тела.

30 В некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению, которые находятся в комбинации с другим терапевтическим средством, предпочтительно противораковым терапевтическим средством и/или иммуномодулирующим соединением. Например, 35 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению комбинируют с другим средством, эффективным при лечении и/или предупреждении расстройства,

связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О -маннозилтрансферазу, такую как ТМТСЗ. Таким образом, предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе 5 лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О -маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR- 10 Т-клетку, или нуклеиновую кислоту, или вектор, или клетку-хозяина согласно изобретению комбинируют с другим терапевтическим средством, эффективным для лечения и/или предотвращения указанного расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

15 Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для применения в способе лечения или предотвращения Е-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака, где указанное антитело или 20 антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетку, или нуклеиновую кислоту, или вектор, или клетку-хозяина согласно изобретению комбинируют с другим терапевтическим средством для лечения и/или предотвращения указанного рака.

25 В некоторых вариантах осуществления указанное другое терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления указанное другое терапевтическое средство представляет собой цитостатическое или цитотоксическое средство.

30 В некоторых вариантах осуществления указанное другое терапевтическое средство представляет собой терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах указанная нуклеиновая кислота представляет собой цитотоксическую рибонуклеазу, антисмысловую нуклеиновую кислоту, молекулу ингибирующей РНК (например, молекулу миРНК) или иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту (например, иммуностимулирующую молекулу ДНК, содержащую CpG-мотив). В 35 некоторых вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота представляет собой аптамер или рибозим.

В некоторых вариантах осуществления указанное другое терапевтическое средство включает радиоактивно меченые аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления указанное другое терапевтическое средство включает радиоизотоп или радиоизотоп-содержащий хелат.

5

Указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно представляет собой Е-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак. В некоторых вариантах осуществления указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, представляет собой эпителиальный рак. В некоторых вариантах осуществления указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходноклеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза. В некоторых частных вариантах осуществления указанное расстройство, связанное с опухолевыми клетками, экспрессирующими Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рак желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

35 В настоящем документе также предложены композиции и составные наборы, которые содержат комбинацию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или

ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина согласно изобретению, и другого терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления предложен составной набор или композиция, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или

5 мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетку, или молекулу нуклеиновой кислоты, или вектор, или клетку-хозяина согласно изобретению, и другое терапевтическое средство для лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ. В некоторых вариантах

10 осуществления указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Указанное расстройство предпочтительно представляет собой E-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак.

В некоторых вариантах осуществления указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Указанное расстройство предпочтительно представляет собой E-кадгерин-положительный и ТМТСЗ-положительный рак.

15

Составной набор согласно изобретению может включать один или более контейнеров, заполненных композицией, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или

20 мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетку, или молекулу нуклеиновой кислоты, или вектор, или клетку-хозяина согласно изобретению, и композицией, содержащей другое терапевтическое средство. Указанный составной набор или указанные один или более контейнеров дополнительно необязательно

25 содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. С таким составным набором или контейнером(ами) могут быть связаны различные письменные материалы, такие как инструкции по применению или уведомление по форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических продуктов,

30 которое отражает одобрение органом производства, применения или продажи. В некоторых вариантах осуществления составной набор согласно изобретению содержит инструкции по применению.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или

35 предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно

ТМТСЗ, у человека или индивидуума, отличного от человека, где способ включает введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина, или композиции, или составного набора согласно изобретению, в комбинации с дополнительным терапевтическим средством или терапевтической процедурой. Указанное дополнительное терапевтическое средство предпочтительно представляет собой средство, описанное выше в настоящем документе.

10

### **Дополнительные виды применения антител, специфичных к E-кадгерину**

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, ADC и CAR-T-клетки согласно изобретению также особенно эффективны для обнаружения клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин. Например, если у индивидуума, предпочтительно человека, подозревается на наличие расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими O-маннозилированный E-кадгерин, образец от указанного индивидуума может быть проверен на наличие клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-кадгерин (также называемых в настоящем документе O-маннозилированные E-кадгерин-положительными клетками), с применением антител или антигенсвязывающих фрагментов, или ADC, или CAR-T-клеток согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанный образец смешивают с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению, которые будут специфично связывать O-маннозилированный E-кадгерин-положительные клетки, если такие клетки присутствуют в указанном образце. O-маннозилированный E-кадгерин-положительные клетки, такие как, например, O-маннозилированный E-кадгерин-положительные опухолевые клетки, которые связаны с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению, могут быть выделены из образца и/или обнаружены с помощью любого метода, известного в данной области техники, например, не ограничиваясь перечисленным, выделения с использованием магнитных гранул, гранул, покрытых стрептавидином, или выделения с помощью вторичных антител, иммобилизованных на колонке. В качестве альтернативы или дополнительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или ADC, или CAR-T-клетку согласно изобретению метят, чтобы их можно было обнаружить. Такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или ADC, или CAR-T-клетку, например, метят с

помощью флуоресцентной, ферментативной или радиоактивной метки, например, с использованием флуорофоров, таких как хелаты редкоземельных элементов, флуоресцеин или его производные, родамин и его производные, изотиоцианат, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид, флуорескамин,  $^{152}\text{Eu}$ , дансил, умбеллиферон, люциферин, люминальная метка, изолюминальная метка, метка ароматического эфира акридиния, имидазольная метка, метка соли акридиния, метка оксалатного эфира, эквориновая метка, 2,3-дигидрофталазиндионы, биотин/авидин, спиновые метки или стабильные свободные радикалы. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, ADC или CAR T клетку согласно изобретению обнаруживают с использованием меченого вторичного антитела, направленного против указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, ADC или CAR T клетки.

Предложенные в настоящем документе скрининговые анализы могут быть проведены с использованием методов, известных в данной области техники, таких как, например, твердофазные иммуоферментные анализы (ELISA), радиоиммуноанализы (RIA), вестерн-блоттинг и анализы на основе иммуногистохимического окрашивания.

Меченые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению, например, инкубируют с образцом, содержащим клетки индивидуума, таким как, например, образец крови или образец ткани, после чего несвязанные связывающие соединения вымываются. Затем определяют, связаны ли указанные меченые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, или ADC, или CAR T клетки согласно изобретению с O-маннозилированными E-кадгерин-положительными клетками. В некоторых вариантах осуществления немеченые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, или ADC, или CAR T клетки согласно изобретению приводят в контакт с образцом, содержащим клетки. После инкубации предпочтительно проводят одну или более стадий промывки для удаления несвязавшихся связывающих соединений. Затем проверяют, связаны ли антитела или антигенсвязывающие фрагменты, или ADC, или CAR T клетки согласно изобретению с O-маннозилированными E-кадгерин-положительными клетками, например, с использованием детектирующего антитела, специфично направленного против антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению, которое связано с маркером, таким как, например, флуоресцентное соединение или, например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. После дополнительной стадии промывки предпочтительно определяют, связалось ли детектирующее антитело, например, путем измерения оптического излучения или

путем добавления субстрата пероксидазы хрена или щелочной фосфатазы. Эти методы обнаружения хорошо известны в данной области техники.

Если антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или ADC или CAR-T-клетка  
5 согласно изобретению связаны с компонентом образца пациента, это свидетельствует о  
наличии O-маннозилированных E-кадгерин-положительных клеток. Таким образом  
могут быть обнаружены специфические для заболевания клетки, такие как O-  
маннозилированный E-кадгерин-положительные опухолевые клетки. Кроме того,  
наличие специфических для заболевания O-маннозилированных E-кадгерин-  
10 положительных клеток, таких как O-маннозилированный E-кадгерин-положительные  
опухолевые клетки, позволяет предположить, что лечение антителом или  
антигенсвязывающим фрагментом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно  
изобретению будет иметь положительный эффект. Таким образом, в некоторых  
вариантах осуществления предложено применение антитела или  
15 антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или  
мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению для  
определения того, содержит ли образец клетки, экспрессирующие O-  
маннозилированный E-кадгерин. В некоторых вариантах осуществления указанное  
антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или  
20 мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетку согласно изобретению  
применяют для определения того, содержит ли образец опухолевые клетки,  
экспрессирующие O-маннозилированный E-кадгерин.

Также предложен способ определения наличия в образце клеток,  
предпочтительно опухолевых клеток, экспрессирующих O-маннозилированный E-  
25 кадгерин, где способ включает:  
- приведение указанного образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим  
фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом,  
или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению, и  
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или  
30 антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или  
мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки с клетками,  
предпочтительно опухолевыми клетками, экспрессирующими O-маннозилированный  
E-кадгерин, если они присутствуют, и  
- определение того, связаны ли клетки с указанным антителом или  
35 антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или  
мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой, определяя таким

образом, присутствуют ли в указанном образце клетки, предпочтительно опухолевые клетки, экспрессирующие О-маннозилированный Е-кадгерин.

Антитела AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03,  
 5 C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN и их антигенсвязывающие фрагменты особенно подходят для обнаружения О-маннозилированный Е-кадгерин-экспрессирующих клеток, таких как, например, О-маннозилированный Е-кадгерин-положительные опухолевые клетки.

10 Таким образом, также предложено применение антитела, выбранного из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающего фрагмента, для определения того,

15 содержит ли образец О-маннозилированный Е-кадгерин-содержащие клетки. В некоторых вариантах осуществления предложено применение антитела, выбранного из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающего фрагмента, для определения того,

20 содержит ли образец опухолевые клетки, содержащие О-маннозилированный Е-кадгерин, такие как, например, О-маннозилированный Е-кадгерин-экспрессирующие клетки эпителиального рака, или клетки рака, выбранного из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих

25 путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходно-

30 клеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального рака, предпочтительно выбранные из группы, состоящей из клеток колоректального рака,

35

клеток рака толстой кишки, клеток рака толстой кишки подтипа CMS1, клеток рака толстой кишки подтипа CMS2, клеток рака толстой кишки подтипа CMS3, клеток рака толстой кишки подтипа CMS4, клеток рака гортани, рака головы и шеи, клеток рака молочной железы, клеток рака поджелудочной железы, клеток рака пищевода, клеток  
 5 рака мочевого пузыря, клеток рака легкого, клеток рака желудка, клеток рака мочевыводящих путей, клеток рака предстательной железы и клеток рака яичника.

Также предложен способ определения наличия в образце клеток, предпочтительно опухолевых клеток, содержащих O-маннозилированный E-кадгерин, где способ включает:

- 10 - приведение указанного образца в контакт с антителом, выбранным из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающим фрагментом, и
- 15 - обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, определяя таким образом, присутствуют ли в  
 20 указанном образце клетки, предпочтительно опухолевые клетки, содержащие O-маннозилированный E-кадгерин.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ согласно изобретению, где указанный образец включает образец крови или образец костного мозга, или  
 25 биоптат. В некоторых вариантах осуществления указанный биоптат взят из кишечного тракта, предпочтительно для тестирования на рак желудочно-кишечного тракта, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак пищевода или рак желудка. В некоторых вариантах осуществления указанный биоптат взят из ткани поджелудочной железы, или из ткани легкого, или из ткани молочной железы, или из ткани гортани, или из  
 30 ткани плоского эпителия, или из ткани печени, или из ткани яичника, или из ткани предстательной железы, или из ткани мочевыводящих путей, или из ткани мочевого пузыря, или из ткани головного мозга. В некоторых вариантах осуществления указанный образец представляет собой образец крови, который, например, подходит для тестирования на наличие множественной миеломы и/или метастазов любой из  
 35 указанных выше солидных опухолей.

Результаты тестирования способа согласно изобретению пригодны для классифицирования образца. Например, если усматривается, что образец от индивидуума содержит злокачественные O-маннозилированный E-кадгерин-положительные клетки, образец классифицируют как содержащий клетки, связанные с 5 заболеванием. Такое классифицирование впоследствии может быть использовано для диагностики расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими O-маннозилированный E-кадгерин. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно 10 изобретению для применения в качестве диагностического средства. Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или ADC, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин согласно изобретению для 15 применения в диагностике расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин. Указанное расстройство предпочтительно представляет собой эпителиальный рак, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической 20 карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих 25 путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходно-клеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза, более 30 предпочтительно выбранный из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака желудка, рака мочевыводящих 35 путей, рака предстательной железы и рака яичника.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающий фрагмент применяют для вышеупомянутого обнаружения и диагностики. Таким образом, также предложено антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающий фрагмент, для применения в диагностике расстройства, связанного с O-маннозиллированными E-кадгерин-содержащими клетками. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающий фрагмент, для применения в диагностике E-кадгерин-положительного и ТМТСЗ-положительного рака, выбранного из группы, состоящей из эпителиального рака, аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходно-клеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака

поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

Также предложен способ способу определения того, страдает ли индивидуум, являющийся человеком или отличный от человека, раком, содержащим О-маннозилированный Е-кадгерин, где способ включает:

- приведение клеток указанного индивидуума в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению,
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки с опухолевыми клетками, содержащими О-маннозилированный Е-кадгерин, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли опухолевые клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, страдает ли указанный индивидуум раком, содержащим О-маннозилированный Е-кадгерин. В некоторых вариантах осуществления указанный способ представляет собой способ *ex vivo*. В других вариантах осуществления указанный способ представляет собой способ визуализации *in vivo*.

Подходящие методы визуализации включают визуализацию ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) и визуализацию ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Подходящие метки включают, например, иод-123 ( $^{123}\text{I}$ ) и технеций-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), например, в сочетании с визуализацией ОФЭКТ, или  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  или  $^{18}\text{F}$ , например, в сочетании с визуализацией ПЭТ, или индий-111 (см., например, Gordon et al., (2005) International Rev. Neurobiol. 67:385-440).

Неограничивающие примеры О-маннозилированный Е-кадгерин-положительного рака перечислены выше. Предпочтительно для указанного способа используют антитело, выбранное из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающий фрагмент. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложен способ определения того, страдает ли индивидуум,

являющийся человеком или отличный от человека, раком, экспрессирующим O-маннозиллированный E-кадгерин, где способ включает:

- приведение клеток указанного индивидуума в контакт с антителом, выбранным из группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03, C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN и AT1636-IYEN, или их антигенсвязывающим фрагментом,
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с опухолевыми клетками, содержащими O-маннозиллированный E-кадгерин, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли опухолевые клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, определяя таким образом, страдает ли указанный индивидуум раком, содержащим O-маннозиллированный E-кадгерин.

В некоторых вариантах осуществления определяют, страдает ли индивидуум раком, экспрессирующим E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ. Как объясняется выше в настоящем документе, наличие рака, содержащего O-маннозиллированный E-кадгерин, указывает на то, что лечение антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или ADC или CAR-T-клеткой согласно изобретению будет иметь положительный эффект. Таким образом, также предложен способ определения того, страдает ли индивидуум раком, экспрессирующим E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ, включающий:

- приведение образца от указанного индивидуума в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению, и
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или ADC, или CAR-T-клетки с опухолевыми клетками, экспрессирующими E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ, если они присутствуют, и
- определение того, связаны ли опухолевые клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или ADC, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, страдает ли указанный индивидуум раком, экспрессирующим E-кадгерин и O-

маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ. Предпочтительно указанный индивидуум представляет собой человека.

5       Еще один аспект изобретения относится к способу определения того, имеет ли  
лечение больного раком с помощью антитела или антигенсвязывающего фрагмента,  
или ADC, или CAR-T-клетки согласно изобретению повышенную вероятность  
положительного исхода лечения по сравнению со средней популяцией больных раком,  
где способ включает определение того, содержит ли образец указанного больного раком  
10       О-маннозилированный E-кадгерин-положительные опухолевые клетки. Если это так,  
то антитела согласно изобретению, такие как, например, антитело, выбранное из  
группы, состоящей из AT1636, E-C06, D-H04, D-A02, D-E09, E-A04, E-B09, C-A05, C-A03,  
C-B02, C-D04-A, C-D04-B, F-C08, D-G03, D-F10, C-E08, D-B06, D-G05, D-H08, C-H01, D-  
C12, D-C11, E-C10, AT1636-I, AT1636-Y, AT1636-E, AT1636-N, AT1636-YN, AT1636-IYN  
и AT1636-IYEN, или его антигенсвязывающий фрагмент, особенно подходят для  
15       противодействия такому раку. Следовательно, если известно, что раковые клетки  
индивидуума содержат на своей поверхности О-маннозилированный E-кадгерин,  
шансы на успешное лечение увеличиваются. Таким образом, также предложен способ  
скрининга, включающий определение того, содержат ли специфические для  
заболевания клетки, предпочтительно опухолевые клетки, на своей поверхности О-  
20       маннозилированный E-кадгерин. В одном аспекте определяют, экспрессируют ли  
указанные специфические для заболевания клетки E-кадгерин и О-  
маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ. В некоторых аспектах дополнительно  
определяют, экспрессируют ли указанные специфические для заболевания клетки  
TGFB. Если специфические для заболевания клетки, такие как раковые клетки,  
25       экспрессируют E-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ, и  
TGFB, шансы на успешное лечение антителом или антигенсвязывающим фрагментом,  
или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению являются даже еще более  
высокими.

30       Поскольку присутствие О-маннозилированного E-кадгерина обычно является  
результатом экспрессии E-кадгерина и О-маннозилтрансферазы, такой как, например,  
ТМТСЗ, в некоторых вариантах осуществления предложен способ скрининга,  
включающий определение того, экспрессируют ли специфические для заболевания  
клетки индивидуума, предпочтительно опухолевые клетки, E-кадгерин и О-  
35       маннозилтрансферазу, особенно ТМТСЗ. В некоторых вариантах осуществления  
предложен способ скрининга, включающий определение того, экспрессируют ли

специфические для заболевания клетки индивидуума, предпочтительно опухолевые клетки, E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу, в частности, TMTСЗ, и TGFβ.

В некоторых вариантах осуществления такие способы согласно изобретению включают следующие стадии:

- 5 - приведение образца, содержащего специфические для заболевания клетки, от индивидуума в контакт со связывающим соединением, предпочтительно антителом или антигенсвязывающим фрагментом, специфичным в отношении O-маннозилированного E-кадгерина;
- 10 - обеспечение возможности связывания указанного связывающего соединения со специфическими для заболевания клетками в указанном образце, и
- определение того, связано ли указанное связывающее соединение со специфическими для заболевания клетками в указанном образце, где связывание указанного связывающего соединения со специфическими для заболевания клетками в указанном образце свидетельствует о том, что указанный пациент имеет значительную
- 15 вероятность положительного исхода лечения антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или ADC, или CAR-T-клеткой согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления указанные специфические для заболевания клетки представляют собой опухолевые клетки.

- 20 экспрессируют ли указанные специфические для заболевания клетки также TGFβ.

- Хотя текущая заявка может описывать признаки как часть одного и того же варианта осуществления или как части отдельных вариантов осуществления, объем
- 25 настоящего изобретения также включает варианты осуществления, включающие любую комбинацию всех или некоторых признаков, описанных в настоящем документе.

- Изобретение дополнительно поясняется следующими примерами. Эти примеры не ограничивают объем изобретения, а служат только для пояснения изобретения.

Таблица 1 - Аминокислотные последовательности, упомянутые в описании.

Аминокислоты и нуклеотиды, которые отличаются от последовательностей АТ1636, выделены.

5

Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
VH AT1636 / VH E-C10	1	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH E-C06 / VH D-H04	2	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMK <del>SL</del> K <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH D-A02 / VH D-E09 / VH E-A04 / VH E-B09 / VH AT1636-I	3	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH C-A05	4	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDG <del>T</del> TEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDR <del>CG</del> QGV <del>LV</del> TVSS
VH C-A03 / VH C-B02 / VH AT1636-E	5	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDG <del>T</del> TEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH C-D04-A / VH C-D04-B	6	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDG <del>T</del> TEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGAN <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH F-C08	7	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKR <del>V</del> K <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGAN <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH D-G03 / VH AT1636-N	8	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGAN <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH D-F10	9	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVG <del>N</del> <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH C-E08 / VH D-B06 / VH D-G05 / VH AT1636-Y	10	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFS <del>Y</del> AWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH D-H08	11	EVQLVESGG <del>D</del> LV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFS <del>Y</del> AWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH C-H01	12	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGT <del>E</del> Y <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH D-C12	13	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAP <del>PK</del> GLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH D-C11	14	EVQLVESGGD <del>L</del> V <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFSNAWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGANDPYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH AT1636-YN	15	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFS <del>Y</del> AWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGAN <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH AT1636-IYN	16	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFS <del>Y</del> AWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDGGTTEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGAN <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VH AT1636-IYEN	17	EVQLVESGGGLV <del>PK</del> PGGSLRLSCAASGFTFS <del>Y</del> AWMN <del>WVR</del> QAPGKGLEWVGR <del>IKS</del> KIDG <del>T</del> TEY <del>TT</del> TPVKGRFTISRDDS KDTVYLHMKRLK <del>T</del> EDTAVYYCTPGVGAN <del>N</del> PYYFDRWGQGV <del>LV</del> TVSS
VL AT1636 / VL E-C06 / VL D-H04 / VL D-A02 / VL D-E09 / VL E-A04 / VL E-B09 / VL C-A03 / VL C-B02 /	18	DI <del>V</del> MTQSPD <del>S</del> LAVSLGERATINCRSSQSVLCRSNNK <del>N</del> CLAWYQ <del>Q</del> RP <del>G</del> QPPKLLIY <del>W</del> ASIRESGV <del>P</del> DRFSGSG <del>S</del> GTDF TLTIS <del>S</del> LQ <del>A</del> EDVAVYYCQ <del>Q</del> YSNTP <del>Q</del> T <del>F</del> GG <del>Q</del> TK <del>V</del> EIKR

VL F-C08 / VL D-G03 / VL D-F10 / VL C-E08 / VL D-B06 / VL D-H08 / VL C-H01 / VL D-C12 / VL D-C11 / VL C-D04-A / VL AT1636-I / VL AT1636-Y / VL AT1636-E / VL AT1636-N / VL AT1636-YN / VL AT1636-IYN / VL AT1636-IYEN		
VL C-A05	19	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRSSQSVLCRSNNKNCLAWYQQRPGQPPKLLIYWASIRESGVPRDRFSGSGSSTDF TLTISSLQAEADVAVYYCQYSNTPQTFGQGTKEIKR
VL C-D04-B	20	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRSSQSVLCRSNNKNCLAWYQQRPGQPPKLLIYWAIRESGVPRDRFSGSGSSTDF TLTISSLQAEADVAVYYCQYSNTPQTFGQGTKEIKR
VL D-G05	21	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRSSQSVLCRSNNKNCLAWYQQRPGQPPKLLIYWASIRESGVPRDRFSGSGSSTDF TLTISSLQAEADVAVYYCQYSNTPQTFGQGTKEIKR
VL E-C10	22	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRSSQSVLCRSNNKNCLAWYQQRPGQPPKLLIYWASIRESGVPRDRFSGSGSSTDF TLTISSLQAEADVAVYYCQYSNTPQTFGQGTKEIKR

### Последовательности нуклеиновых кислот, упомянутые в описании

Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
VH AT1636 / VH E-C10	23	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH E-C06 / VH D-H04	24	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH D-E09 / VH D-A02 / VH E-A04 / VH E-B09 / VH AT1636-I	25	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH C-A05	26	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH C-A03 / VH C-B02 / VH AT1636-E	27	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH C-D04-A / VH C-D04-B	28	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH F-C08	29	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccaggaagggtggagtggtcgccggtatta aaagcaaaattgatggtgggacaacagagtacaccacacccgtgaaaggcagattcccatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtaccccggggtggg agctaataatgatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca

VH D-G03 / VH AT1636-N	30	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH D-F10	31	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg aactaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH C-E08 / VH D-B06 / VH D-G05 / VH AT1636-Y	32	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagttatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH D-H08	33	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagttatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH C-H01	34	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH D-C12	35	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH D-C11	36	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagtaaatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH AT1636-YN	37	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagttatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH AT1636-IYN	38	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagttatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VH AT1636-IYEN	39	gagggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtaaagcctggggggtcccttagactctcctgtgcagcctctgg tttcaactttcagttatgcctggatgaactgggtccgccaggctccagggaaaggggctggagtgggtcggccgtatta aaagcaaaattgatgggggacacagagtacaccacaccogtgaaggcagattccacatctcaagagatgattca aaagacacagtgtaacctgcacatgaaaaggctgaaaaccgaggacacagccgtctattactgtacccccgggggtggg agctaataatccgtaactattttgaccgctggggccaggaggctcctggtaaccgtctcctca
VL AT1636 / VL E-C06 / VL D-H04 / VL D-A02 / VL D-E09 / VL E-A04 / VL E-B09 / VL C-A03 / VL C-B02 / VL F-C08 / VL D-G03 / VL D-F10 / VL C-E08 / VL D-B06 / VL D-H08 / VL C-H01 / VL D-C12 / VL D-C11 / VH AT1636-I / VH AT1636-Y /	40	gacatcgtgatgacccagctccagactccctggctgtgtctctggggcagagggccaccatcaactgcaggtccag ccagagtgtttatgtcgggtcccaacaataaagaactgcttagcttggtaccagcagagaccaggacagcctcctaacc tgctcatttatgggcatctattcgggaatccgggggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagattc actctccatcagcagcctgcagctgaaagtgtggcagtttattactgtcagcaatattctaataactcctcagac gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacga

VH AT1636-E / VH AT1636-N / VL C-D04-A / VL AT1636-YN / VL AT1636-IYN / VL AT1636-IYEN		
VL C-A05	41	gacatcgtgatgaccagctctccagactcctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgcaggtccagccagagtgtttatgtcgggtccaacaataagaactgcttagcttggtagaccagcagagaccaggacagcctcctaacc tgctcatttattgggcatctattcgggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttc actctcccatcaacagcctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattctaataactcctcagac gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacga
VL C-D04-B	42	gacatcgtgatgaccagctctccagactcctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgcaggtccagccagagtgtttatgtcgggtccaacaataagaactgcttagcttggtagaccagcagagaccaggacagcctcctaacc tgctcatttattgggcatctattcgggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttc actctcccatcagcagcctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattctaataactcctcagac gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacga
VL D-G05	43	gacatcgtgatgaccagctctccagactcctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgcaggtccagccagagtgtttatgtcgggtccaacaataagaactgcttagcttggtagaccagcagagaccaggacagcctcctaacc tgctcatttattgggcatctattcgggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttc actctcccatcagcagcctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattctaataactcctcagac gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacga
VL E-C10	44	gacatcgtgatgaccagctctccagactcctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgcaggtccagccagagtgtttatgtcgggtccaacaataagaactgcttagcttggtagaccagcagagaccaggacagcctcctaacc tgctcatttattgggcatctattcgggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttc actctcccatcagcagcctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattctaataactcctcagac gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacga

5 Таблица 2 - Классы аминокислот применительно к консервативным аминокислотным заменам.

Замены аминокислотных остатков в пределах одного класса аминокислот являются неограничивающими примерами консервативных аминокислотных замен.

<u>Класс аминокислот</u>	<u>Аминокислотные остатки в классе</u>
Алифатические	глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин
Кислые	аспартат, глутамат
Основные	гистидин, лизин, аргинин
Неполярные незаряженные	пролин, цистеин, метионин
Гидрофильные незаряженные	серин, треонин, аспарагин, глутамин
Ароматические	фенилаланин, тирозин, триптофан

Таблица 3. Связывание АТ1636 с различными типами (раковых) клеток, определенное с помощью проточной цитометрии. Данные по экспрессии мРНК E-кадгерина\* и ТМТСЗ\* (Affy) взяты из Энциклопедии линий раковых клеток (Cancer cell line Encyclopedia) от Института Брода (Broad Institute) (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>). Относительные единицы <6 оцениваются как отрицательные, 6-7 оцениваются как +/- и >7 оцениваются как положительные.

	Связывание АТ1636	E-кадгерин*	ТМТСЗ*	Примечания (тип клеток, ткань, заболевание)
<b>Рак толстой кишки</b>				
DLD-1	+	+	+	CMS1, эпителиальная, толстая кишка, колоректальная аденокарцинома
HCT 116	+	+	+	CMS1, эпителиальная, толстая кишка, колоректальная карцинома
SW480	+/-	+/-	+	CMS2, эпителиальная, толстая кишка, колоректальная аденокарцинома
Caco-2	+	+	+	CMS2, эпителиальная, толстая кишка, колоректальная аденокарцинома
HT-29	+	+	+	CMS4, эпителиальная, толстая кишка, колоректальная аденокарцинома
HT55	+	+	+	CMS2, эпителиальная, карцинома толстой кишки
KM12	+	+	+	CMS1, карцинома толстой кишки
LS-513	+	+	+	CMS3, эпителиальная, слепая кишка, колоректальная карцинома
SW948	+	+	+	CMS1, эпителиальная, толстая кишка, колоректальная аденокарцинома
LoVo	+	+	+	Эпителиальная, толстая кишка; происходит из очага метастазирования: левая надключичная область, колоректальная аденокарцинома
<b>Рак молочной железы</b>				
MCF7	+	+	+	Эпителиальная, молочная железа, грудь; происходит из очага метастазирования: плевральный выпот, аденокарцинома
T-47D	+	+	+	Эпителиальная, молочная железа; происходит из очага метастазирования: плевральный выпот, протоковая карцинома
ZR-75-1	+	+	+	Эпителиальная, молочная железа; груд/проток; происходит из очага метастазирования: асцит, протоковая карцинома
BT-20	+/-	+	+/-	Трижды негативный. Эпителиальная, молочная железа/грудь, карцинома
BT-549	-	-	+/-	Трижды негативный. Эпителиальная, молочная железа; грудь, протоковая карцинома
MCF 10A	+	Нет данных	Нет данных	Линия клеток, выстилающих протоки. Эпителиальная, молочная железа; грудь, фиброкистоз
SK-BR-3	-	-	+	Эпителиальная, молочная железа/грудь; происходит из очага метастазирования: плевральный выпот, аденокарцинома
<b>Рак поджелудочной железы</b>				
Sarpan-2	+	+	+	Полигональные, поджелудочная железа, аденокарцинома
PANC 08.13	+	+	+	Эпителиальная, поджелудочная железа, аденокарцинома

PDX-53	+	Нет данных	Нет данных	Ксенотрансплантат, полученный от пациента
PDX-67	+	Нет данных	Нет данных	Ксенотрансплантат, полученный от пациента
PDX-193	-	Нет данных	Нет данных	Ксенотрансплантат, полученный от пациента
<b>Рак мочевого пузыря</b>				
5637	+	+	+	Эпителиальная, мочевого пузыря, карцинома II стадии
T24	-	-	+	(Е-кадгерин отрицательные), эпителиальная, мочевого пузыря, переходно-клеточная карцинома
UM-UC-3	-	-	+	(Е-кадгерин отрицательные), эпителиальная, мочевого пузыря, переходно-клеточная карцинома
SW 780	+	+	+	Эпителиальная, мочевого пузыря, переходно-клеточная карцинома
RT4	+	+	+	Эпителиальная, мочевого пузыря, переходно-клеточная папиллома
HT-1376	+	+	+	Эпителиальная, мочевого пузыря, карцинома 3 стадии
<b>Рак желудка</b>				
SNU-1	-	-	+	(Е-кадгерин-отрицательные), эпителиальная, желудок, карцинома желудка
SNU-5	-	-	+	(Е-кадгерин-отрицательные), эпителиальная, желудок, происходит из очага метастазирования: асцит, карцинома желудка
AGS	-	-	+	(Е-кадгерин-отрицательные), эпителиальная, желудок, аденокарцинома желудка
NCI-N87	+	+	+	Эпителиальная, желудок, происходит из очага метастазирования: печень, карцинома желудка
<b>Фибробласты</b>				
FRC	-	Нет данных	Нет данных	Первичные фибробластные ретикулярные клетки (культивированные, пассаж 8)
BJ	-	Нет данных	Нет данных	Фибробласт, кожа; крайняя плоть, нормальная
MRC-5	-	Нет данных	Нет данных	Фибробласт, легкое, нормальная
Первичные n=3	-	Нет данных	Нет данных	Фибробласт, кожа
<b>Опухоль системы крови</b>				
SH-2	-	Нет данных	Нет данных	Острый миелоидный лейкоз
K562	-	-	+/-	Лимфобласт, костный мозг, хронический миелоидный лейкоз
BV-173	-	-	+/-	В-клеточный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ)
MUTZ-5	-	Нет данных	Нет данных	Лейкоз из В-клеточных предшественников, острый лимфобластный лейкоз из В-клеточных предшественников (BCP-ALL)
MHN-CALL-2	-	-	+/-	Лейкоз из В-клеточных предшественников, острый лимфобластный лейкоз (CALL)
SUP-B15	-	-	+/-	В-лимфобласт, костный мозг, острый лимфобластный лейкоз
Jurkat	-	-	+/-	Т-лимфоциты, периферическая кровь, острый Т-клеточный лейкоз
<b>Рак кожи</b>				
A431	+	Нет данных	Нет данных	Эпителиальная, кожа/эпидермис, эпидермоидная карцинома
<b>Рак эндометрия</b>				

HEC-1-A	+	+	+	Эпителиальная, матка; эндометрий, аденокарцинома
KLE	+	+	+	матка; эндометрий, аденокарцинома
<b>Рак легкого</b>				
NCI-H661	-	-	+	Эпителиальная, легкое; происходит из очага метастазирования: лимфатический узел, карцинома; крупноклеточный рак легкого
NCI-H1299	-	-	+	Эпителиальная, легкое; происходит из очага метастазирования: лимфатический узел, карцинома; мелкоклеточный рак легкого
NCI-H1975	+	+	+	Эпителиальная, легкое, аденокарцинома; мелкоклеточный рак легкого
NCI-H1563	-	-	+	Легкое, аденокарцинома; мелкоклеточный рак легкого
NCI-H1573	+	+	+	Легкое, происходит из очага метастазирования: мягкие ткани, аденокарцинома (4 стадия)
NCI-H1437	+	+	+	легкое; происходит из очага метастазирования: плевральный выпот, аденокарцинома; мелкоклеточный рак легкого (1 стадия)
<b>Рак пищевода</b>				
OE19	+	+	+/-	Эпителиальная, аденокарцинома кардии желудка/гастроэзофагеального соединения
OE33	+	+	+	Эпителиальная, аденокарцинома нижнего отдела пищевода (метаплазия Барретта)
<b>Эндотелий</b>				
HAEC	-	Нет данных	Нет данных	Клетки эндотелия аорты человека, первичные клетки (культивированные ex vivo)
HMEC-1	-	Нет данных	Нет данных	Эндотелий кожных микрососудов
<b>Лейкоциты</b>				
Эозинофилы	-	Нет данных	Нет данных	Из крови
Гранулоциты	-	Нет данных	Нет данных	Из крови
NK-клетки	-	Нет данных	Нет данных	Из крови
B-клетки	-	Нет данных	Нет данных	Из миндалин и крови
T-клетки	-	Нет данных	Нет данных	Из миндалин и крови
Моноциты	-	Нет данных	Нет данных	Из миндалин и крови
Дендритные клетки	-	Нет данных	Нет данных	Из моноцитов, из МНПК, дифференцированные in vitro
Клетки Лангерганса	-	Нет данных	Нет данных	Из моноцитов, из МНПК, дифференцированные in vitro
<b>Мышиный / собачий</b>				
СМТ-93	+/-	Нет данных	Нет данных	Мышиная, эпителиальная, прямая кишка, полиповидная карцинома
СТ26	-	Нет данных	Нет данных	Мышиная, фибробласт, толстая кишка, карцинома
MDCK	+	Нет данных	Нет данных	Собачья, эпителиальная, почка

Таблица 4 - Расчет кратности увеличения связывания вариантов АТ1636 по сравнению с исходным антителом дикого типа АТ1636 с полноразмерным Е-кадгерином, Е-кадгерином р70 и мутантным белком Е-кадгерина D3. Соотношения рассчитывали путем деления значений ЕС<sub>50</sub>, полученных из результатов ELISA, показанных на фиг.

5 7с. Значения ЕС<sub>50</sub> определяли с использованием программного обеспечения Prism.

Кратность увеличения связывания по сравнению с антителом АТ1636 дикого типа							
	Вариант АТ1636						
Вариант Е-кадгерина:	T19I	N36Y	G63E	D112N	YN	IYN	IYEN
70 кДа	2,0	6,6	0,2	4,5	56,5	67,1	28,6
Полноразмерный	2,6	6,5	0,5	6,0	28,4	64,3	34,3

## ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ

- 5 Aiello, NM, Maddipati, R, Norgard, RJ, Balli, D, Li, J, Yuan, S, Yamazoe, T, et al. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Developmental Cell* 2018; 45: 681–695.e4.
- 10 Atwell, S, Ridgway, JB, Wells, JA, Carter, P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *Journal of Molecular Biology* 1997; 270: 26–35.
- Baeuerle, P.A. et al. *Nature Communications* (2019)10: 2087
- 15 Barretina, J, Caponigro, G, Stransky, N, Venkatesan, K, Margolin, AA, Kim, S, Wilson, CJ, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012; 483: 603–607.
- Bartels MF, et al. (2016) Protein O-mannosylation in the murine brain: Occurrence of mono-O-mannosyl glycans and identification of new substrates. *PLoS One* 11:e0166119.
- 20 Bartels, L, de Jong, G, Gillissen, MA, Yasuda, E, Kattler, V, Bru, C, Fatmawati, C, et al. A Chemo-enzymatically Linked Bispecific Antibody Retargets T Cells to a Sialylated Epitope on CD43 in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Research* 2019; 79: 3372–3382.
- Bartels, L. et al. A Chemo-enzymatically Linked Bispecific Antibody Retargets T Cells to a Sialylated Epitope on CD43 in Acute Myeloid Leukemia. *Methods* 2019, accepted for publication
- 25
- Carvalho S, et al. (2016) O-mannosylation and N-glycosylation: Two coordinated mechanisms regulating the tumour suppressor functions of E-cadherin in cancer. *Oncotarget* 7:65231–65246.
- 30
- Chau C. et al. *Lancet* 2019; 394: 793-804
- Chen, Y et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881
- 35
- Gauthier L. et al. (2019) *Cell* 177, 1701-1713

- De Groot, A.S. et al. (2005) *Dev. Biol.* 122: 171-194
- Guedan, S. et al. (2019) *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*. Vol 12: 145-156
- 5 Hanly et al. (1995) *ILAR Journal*. 37(3): 93-118
- Idusogie, EE et al. (2001) *J. Immunol.* 166: 2571-2575
- Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and  
10 Longo, eds., Lippincott Raven (1996))
- Kwakkenbos, M.J. et al. Genetic manipulation of B cells for the isolation of rare therapeutic antibodies from the human repertoire. *Methods* 2013; 1–6
- Larsen, ISB, Narimatsu, Y, Joshi, HJ, Siukstaite, L, Harrison, OJ, Brasch, J, Goodman,  
15 KM, et al. Discovery of an O-mannosylation pathway selectively serving cadherins and protocadherins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 11163–11168.
- Lazar, GA et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4005-4010
- 20 Lommel M, et al. (2013) Protein O-mannosylation is crucial for E-cadherin-mediated cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:21024–21029.
- Lund, J et al (1992) *Mol. Immunol.* 29: 53-59
- 25 Merchant, AM, Zhu, Z, Yuan, JQ, Goddard, A, Adams, CW, Presta, LG, Carter, P. An efficient route to human bispecific IgG. *Nature Biotechnology*, Published online: 01 August 2008; | doi:10.1038/nbt0808-886 1998; 16: 677–681.
- Moore, GL et al. (2010) *MAbs* 2(2): 181-189
- 30 Padmanaban, V, Krol, I, Suhail, Y, Szczerba, BM, Aceto, N, Bader, JS, Ewald, AJ. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature* 2019; 1–31.
- Patnaik & Stanley (2006) *Methods Enzymol.* 416: 159-182

Racapé, M, Duong Van Huyen, J-P, Danger, R, Giral, M, Bleicher, F, Foucher, Y, Pallier, A, et al. The Involvement of SMILE/TMTC3 in Endoplasmic Reticulum Stress Response. PLoS ONE 2011; 6: e19321.

5

Rafiq et al. 17 december 2019, nature reviews, clinical oncology

Shields, RL et al. (2001) J. Biol Chem 276: 6591-6604

Stavenhagen, JB et al. (2007) Cancer Res. 67: 8882-8890

10

Sunryd, JC, Cheon, B, Graham, JB, Giorda, KM, Fissore, RA, Hebert, DN. TMTC1 and TMTC2 are novel endoplasmic reticulum tetratricopeptide repeat-containing adapter proteins involved in calcium homeostasis. Journal of Biological Chemistry 2014; 289: 16085–16099.

15

Suurs F.V. et al (2019) Pharmacology & Therapeutics 201: 103-119

Tauriello, DVF, Palomo-Ponce, S, Stork, D, Berenguer-Llargo, A, Badia-Ramentol, J, Iglesias, M, Sevillano, M, et al. TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. Nature 2018; 554: 538–543

20

Tsuchikama K. et al. (2018). Protein Cell 9(1):33-46

Vester-Christensen, MB, Halim, A, Joshi, HJ, Steentoft, C, Bennett, EP, Lavery, SB,

25 Vakhrushev, SY, et al. Mining the O-mannose glycoproteome reveals cadherins as major O-mannosylated glycoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110: 21018–21023.

Yamane-Ohnuki, N et al. (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614-622

30 US 4,681,581

US 4,735,210

US 5,101,827

US 5,102,990 (US RE35,50G)

US 5,648,471

US 5,697,902

US9534058 (B2)

5 WO 2010/087994

WO 2013/081463

WO 2015/093949

10

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1. Открытие антитела AT1636****Материалы от пациентов и здоровых людей**

- 5 Протоколы исследования были одобрены Комитетом по медицинской этике Академического медицинского центра, Амстердам, Нидерланды. Все участники подписали информированное согласие. Суммарные мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) выделяли из свежей крови после центрифугирования в градиенте Ficoll и замораживали до использования.
- 10 **Создание специфичного для рака толстой кишки клона AT1636**
- Следуя процедурам, описанным в WO 2015/093949 и Kwakkenbos et al., Nat Med (2010), выделяли наивные клетки и IgG-антителообразующие В-клетки памяти от пациента, страдающего синдромом Линча, который является носителем варианта патогенного гена в гене MSH6 и у которого был диагностирован колоректальный рак (CRC) IV
- 15 стадии и метастазы в печень, успешно вылеченного авастинном, капецитабином и оксалиплатином. В-клетки были выделены из периферической крови, полученной от этого пациента через 9 лет после последнего лечения. Наивные клетки и IgG-антителообразующие В-клетки памяти были immortalized ретровирусной трансдукцией генов Vcl6 и Vcl-xL и репортерного гена GFP. Затем immortalized
- 20 В-клетки высевали в концентрации 5, 10 или 20 клеток на лунку (далее называемые микрокультурами) и размножали с использованием IL-21 и CD40L. Затем супернатанты размноженных микрокультур В-клеток подвергали скринингу на связывание специфичного антитела со смесью линий клеток толстой кишки: клеток COLO-205, CACO-2 и DLD1 (ATCC). Связанные антитела обнаруживали с
- 25 использованием античеловеческого IgG-PE (Southern Biotech) в качестве вторичного антитела с помощью проточной цитометрии (BD).
- Нерелевантное контрольное антитело (AT1002), которое специфично связывает антиген HA вируса гриппа (описано в WO 2013/081463), включали в эксперименты в качестве отрицательного контроля.
- 30 Микрокультуры, для которых супернатанты продемонстрировали специфическое связывание с линиями клеток толстой кишки, отбирали и высевали в концентрации 1 клетка/лунку для получения клональных культур. После размножения супернатанты

клональных культур снова тестировали на наличие антител, специфично связывающихся с линиями клеток толстой кишки, с использованием проточной цитометрии, как описано выше. Один из полученных клонов В-клеток, специфичных к толстой кишке, названный 7G02, продуцировал антитело IgG3, которое связывало две  
5 из трех линий клеток толстой кишки.

### **Клонирование антитела AT1636, специфичного к карциноме толстой кишки**

Для идентификации антитела, продуцируемого 7G02, выделяли тотальную мРНК с использованием метода TriPure/хлороформ (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. Далее генерировали кДНК с помощью обратной транскриптазы  
10 (SuperScript III, Invitrogen) и случайных гексамеров (Promega). Вариабельные домены тяжелых и легких цепей IgG амплифицировали с помощью ПЦР (FastStart Taq DNA Polymerase, Roche) в соответствии с процедурой производителя с применением лидер-специфических праймеров в сочетании со специфическими праймерами CH1 (тяжелая цепь) и Скарра (легкая цепь). Ампликоны использовали для  
15 дидезоксифлуоресцентного секвенирования по Сэнгеру (BDT, Invitrogen) с использованием праймеров, родственных использованным для амплификации. Чтобы исключить мутацию, индуцированную обратной транскриптазой или ДНК-полимеразой, секвенировали не менее 5 клонов.

Затем синтетические кодон-оптимизированные фрагменты ДНК (GeneArt),  
20 кодирующие полные области тяжелой и легкой цепи 7G02, субклонировали в векторы экспрессии на основе Double Gene рХС (Lonza). Конструкции проверяли на целостность с помощью секвенирования ДНК. Далее рекомбинантное человеческое антитело IgG1/каппа 7G02 обозначено как AT1636.

Затем вектор рХС Double Gene стабильно трансфицировали в клетки CHO-GS для  
25 создания стабильного пула (платформа GS Xceed, Lonza). Стабильный пул размножали и использовали для получения культуры клеток IgG в смешительных колбах с подпиткой в течение 7 дней. Очищенный от клеток супернатант, содержащий рекомбинантное антитело AT1636, собирали и очищали с помощью хроматографии с белком А с использованием системы очистки АКТА (General Electric Lifesciences).  
30 Антитела элюировали буфером из 0,1 М цитрата, 150 мМ NaCl, рН 3,5, затем нейтрализовали в 1 М Трис-НСl, рН 9,0, а затем снова буферизовали в TBS-TS с помощью эксклюзионной хроматографии. Концентрацию устанавливали с помощью спектрофотометра NanoDrop (OD280, ThermoFisher). Содержание мономеров

очищенного антитела было подтверждено на уровне >90% с помощью эксклюзионной хроматографии. Целостность очищенных белков устанавливали с помощью SDS-PAGE.

### **Связывающие свойства AT1636 методом проточной цитометрии**

5 Рекомбинантное антитело AT1636 тестировали на связывание с панелью линий клеток и первичным клеточным материалом с использованием проточной цитометрии. Вкратце, клетки инкубировали с раствором антитела в течение 30-60 минут при 4 °C, а затем дважды промывали 150 мкл PBS с 1% BSA. Связывание антител определяли с помощью античеловеческого IgG-RPE (Southern Biotech) или поликлонального антитела BCR, конъюгированного с Alexa Fluor 647 (Invitrogen), и анализировали на 10 FACSCanto II или LSRFortessa (Becton, Dickinson and Company). AT1636 демонстрирует связывание (см. таблицу 3) с линиями эпителиальных клеток, которые коэкспрессируют E-кадгерин и TMCT3 (согласно энциклопедии линий раковых клеток (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>)).

### 15 **Пример 2. Идентификация мишени AT1636**

#### **Иммунопреципитация**

Для идентификации мишени антитела AT1636 проводили иммунопреципитацию (IP) мишени с использованием линии клеток рака толстой кишки DLD1 (ATCC CCL-221) и клеток Т-клеточной линии Jurkat (отрицательный контроль). Клетки лизировали с 20 использованием буфера для лизиса (0,5% Triton X114 (Sigma), 0,5% DOC; 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCL pH 7,4, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) с добавлением ингибиторов протеазы и фосфатазы (Roche). После лизиса нерастворимую фракцию удаляли центрифугированием. Затем лизаты предварительно очищали нерелевантным антителом (антитело RSV паливизумаб), связанным с Dynabeads с белком G 25 (Invitrogen) и гранулами со стрептавидином (Invitrogen) для удаления неспецифически связывающих белков. Предварительно очищенные лизаты затем инкубировали с 50 мкг антитела AT1636, связанного с Dynabeads с белком G, или со связанным с гранулами антителом AT1002, специфичным к вирусу гриппа, в качестве отрицательного контроля в течение 3 часов при 4 °C. Гранулы, инкубированные с 30 антителами, трижды промывали буфером для лизиса, и связанные белки элюировали с гранул буфером для образца 1x SDS-PAGE (BioRad) + 0,1 M DTT. Образцы разделяли на геле SDS-PAGE. 85% образцов IP подвергали препаративному SDS-PAGE, а

иммунопреципитированные белки визуализировали с помощью окраски белков Imperial (Pierce). Были вырезаны дифференциально иммунопреципитированные белки между иммунопреципитатами AT1636 и AT1002 (отрицательный контроль) из DLD1 по сравнению с Т-клетками Jurkat (как отрицательный контроль): 70 кДа и 85 кДа, см. 5  
фиг. 2а. Полосы подвергали масс-спектрометрическому анализу. Белки подвергали восстановлению дитиотреитолом, алкилированию иодацетамидом и расщеплению трипсином в геле с использованием робота для расщепления Proteineer DP (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Триптические пептиды анализировали методом on-line C18 нано-ВЭЖХ МС/МС с системой, состоящей из градиентной системы ВЭЖХ Easy nLC 1000 (Thermo, Бремен, Германия) и масс-спектрометра LUMOS (Thermo). Затем 10  
белки идентифицировали путем поиска масс-спектрометрических данных в базе данных Uniprot человека с использованием алгоритма Mascot (Mascot v2.2.04, Matrix Science). Использовали допуск МС 10 ppm и допуск МС/МС 0,02 Да. Трипсин был выбран в качестве выбранного фермента, и допускалось наличие до 2 пропущенных 15  
сайтов расщепления. В качестве фиксированной модификации был выбран карбамидометилцистеин, а в качестве переменной модификации - окисление метионина и N-концевое ацетилирование. Результаты поиска в базе данных были проанализированы и визуализированы с помощью Scaffold ([www.proteomesoftware.com](http://www.proteomesoftware.com)). Было обнаружено, что Е-кадгерин был О-маннозилирован. Для 20  
идентификации О-маннозилирования в качестве переменной модификации была выбрана модификация серина и треонина гексозой. Полутрипсин использовали в качестве специфичности фермента для идентификации нетриптических N-концов.

Масс-спектрометрический анализ показал, что белки, которые иммунопреципитируются с помощью AT1636, представляют собой усеченную форму Е-кадгерина массой 70 кДа (CDH1, усеченная форма обозначается в настоящем 25  
документе р70) с 24% покрытием последовательности Е-кадгерина в вырезанной полосе 70 кДа, в то время как бета-катенин находится в полосе 85 кДа (покрытие белка 76%). Пептиды, соответствующие самым внешним С-концевым доменам Е-кадгерина, не были обнаружены, что свидетельствует об усеченном белке (см. рисунок 30  
полноразмерного и усеченного Е-кадгерина на фиг. 3). Дальнейшие эксперименты по N-концевому ацетилированию показали, что N-концевой остаток представляет собой глутаминовую кислоту 463 (нумерация согласно записи Uniprot P12830).

### Вестерн-блоттинг

Специфическое связывание AT1636 с E-кадгерином p70 подтверждали вестерн-блоттингом. Реакционную способность AT1636 сравнивали с коммерчески доступным EP700Y (Abscam, кроличье антитело) и мышиным антителом, специфичным к цитоплазматическому домену E-кадгерина (клон 36/E, BD Biosciences). Было показано, что EP700Y связывается с доменом EC5 человеческого E-кадгерина и, таким образом, будет связываться как с полноразмерным E-кадгерином, так и с p70, что также справедливо для антитела к внутриклеточному C-хвосту. Иммунопреципитацию антител к E-кадгерину проводили из клеток DLD1 с использованием равных количеств лизата (10 мг) и антител (2,5 мкг). Исходные (40 мкг) и IP-образцы (все) анализировали на SDS-PAGE и переносили на мембрану из PVDF (Bio-Rad) для иммуноблоттинга. Используя антитело, связывающее внутриклеточный домен E-кадгерина, а также антитело EP700Y, полноразмерный (120 кДа) E-кадгерин, а также белок массой 70 кДа были иммунопреципитированы, в то время как AT1636 в основном иммунопреципитировало белок массой 70 кДа (фиг. 2b). Таким образом, AT1636 избирательно связывает p70 по сравнению с полноразмерным E-кадгерином, о чем свидетельствует обогащение по p70 по сравнению с полноразмерным E-кадгерином. После денситометрического количественного определения сигналов авторы обнаружили 7-кратное обогащение p70 по всей длине IP AT1636 по сравнению с IP EP700Y.

На фиг. 3 схематично показано усечение, обнаруженное в p70, при котором удаляются EC1, EC2 и большая часть домена EC3 полноразмерного E-кадгерина и остается короткий пептид домена D3 плюс домены EC4. и EC5. Также изображены связывающие области нескольких антител и домен, взаимодействующий с  $\beta$ -катенином.

### **Протеолитическое расщепление мишени AT1636**

Чтобы исследовать, подвергается ли E-кадгерин протеолитическому расщеплению с образованием p70, авторы ингибировали фурин и родственные конвертазы с помощью ингибитора фурина/конвертазы, добавленного к клеткам DLD1 (Decanoyl-RVKKR-СМК (Tocris)). Клетки культивировали в течение 48 часов в отсутствие или в присутствии ингибитора в указанных концентрациях и однократно обновляли. Клетки собирали и подвергали проточной цитометрии с указанными антителами (фиг. 4). Инкубирование клеток DLD1 с СМК снижало, но не полностью устраняло связывание AT1636 с клетками DLD1 (фиг. 4), что указывает на то, что расщепление p70 частично опосредуется фурином и другими родственными конвертазами.

Помимо уникального расщепления E-кадгерина в домене EC3 известно, что E-кадгерин может быть O-маннозилирован (I.S.B. Larsen, PNAS (2017), M.B. Vester-Christensen, PNAS (2013), M. Lommel, PNAS (2013) и S. Carvalho S, Oncotarget (2016)). Рядом с сайтом расщепления и возможным связывающим доменом AT1636 находятся по меньшей мере два O-маннозилированных треонина (остатки Thr 472 и 474) и, возможно, один в положении 470. Для изучения зависимости связывания AT1636 от O-маннозилирования р70 был проведен эксперимент, аналогичный эксперименту с СМК, с ингибитором маннозилтрансферазы (Mann, оксо-2-тиоксо-3-тиазолидинилуксусная кислота, Sigma). В двух правых столбцах на фиг. 4 показано снижение связывания AT1636 с клетками DLD1, обработанными Mann, что свидетельствует о том, что для связывания требуется O-маннозилирование р70 в связывающей области AT1636.

### **Пример 3. Создание высокоаффинных вариантов AT1636**

#### **Получение рекомбинантного растворимого белка E-кадгерина р70**

кДНК полноразмерного E-кадгерина и кДНК E-кадгерина р70 (фиг. 1), соответствующие доменам EC5 и EC4, и часть EC3 до N-конца в положении 463, за исключением внутриклеточного и трансмембранного (TM) доменов, были получены от GeneArt и затем клонированы в векторы pCMV3, pсDNA3 и рXC19, содержащие FLAG-метку на мышином Fc-хвосте, снабженном сортазой и HIS-меткой, или белок был получен только с C-меткой. Векторы временно трансфицировали в клетки Expi293 или СНО, и очищали рекомбинантные белки с помощью аффинной матрицы C-Tag или сефарозы с белком А. Элюированные белки повторно буферизовали в TBS-TS методом эксклюзионной хроматографии. Концентрацию устанавливали с помощью спектрофотометра NanoDrop (OD280, ThermoFisher). Содержание мономеров очищенного антитела было подтверждено на уровне >90% с помощью эксклюзионной хроматографии. Целостность очищенных белков устанавливали с помощью SDS-PAGE.

#### **Получение В-клеток 7G02 с высокой экспрессией GFP**

Помимо генов Vcl6 и Vcl-xL, ретровирус, использованный для трансдукции В-клеток 7G02, также содержал ген GFP в качестве репортера для успешной трансдукции В-клеток. В-клетки 7G02 подвергали второму циклу ретровирусной трансдукции с использованием ретровируса, содержащего гены Vcl6, Vcl-xL и GFP. Это привело к получению В-клеток 7G02 с более высокой экспрессией GFP, чем исходные В-клетки

7G02. В-клетки 7G02 с высокой экспрессией GFP подвергали сортировке клеток с использованием FACS Aria III (BD Biosciences) для создания гомогенной популяции В-клеток 7G02, стабильно экспрессирующих высокие уровни GFP. Последовательность 5  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30

вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антител клеток 7G02-GFP-высокий определяли путем выделения тотальной РНК с использованием TriPure/хлороформа (Roche/Merck) в соответствии с протоколом производителя. Затем с помощью обратной транскриптазы (Invitrogen) генерировали кДНК. кДНК, кодирующие вариабельные домены тяжелой и легкой цепей антитела, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров VH и VL и подвергали секвенированию ДНК. Последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антител в В-клетках 7G02-GFP-высокий были идентичны таковым в В-клетках 7G02-GFP-низкий.

### **Выделение клонов В-клеток 7G02 с повышенным связыванием с мишенью**

Растворимые белки Е-кадгерина использовали для отбора субклонов с повышенным связыванием антигена по сравнению с исходным клоном В-клеток 7G02 методом 15  
 AIMProve, как описано Kwakkenbos et al. (M.J. Kwakkenbos, Methods (2013)). Вкратце, клон 7G02 В-клеток с высоким уровнем GFP размножали, и пролиферированные клетки инкубировали с рекомбинантными растворимыми слитыми белками Е-кадгерина и мышиного Fc (см. выше). Затем клетки промывали и инкубировали 20  
 совместно с конъюгированным с Alexa Fluor 647 поликлональным антителом (Invitrogen), которое специфично связывает тяжелую и легкую цепь В-клеточного рецептора (BCR), для оценки уровней экспрессии BCR, и с мечеными R-фиикоэритрином. поликлональными антителами против мышиного Fc (Jackson ImmunoResearch) для визуализации связанного белка Е-кадгерина. Клетки 25  
 анализировали с помощью проточной цитометрии, и клетки, которые продемонстрировали более высокое связывание рекомбинантного белка Е-кадгерина по сравнению с их экспрессией BCR, по сравнению со средней популяцией В-клеток 7G02, были отсортированы по одной клетке с использованием FACS Aria III (BD Biosciences) (фиг. 5а). Отобранные клоны культивировали в течение 2-3 недель, чтобы обеспечить 30  
 размножение, а затем тестировали в методе антигенной конкуренции (см. ниже) на повышенное связывание антигена по сравнению с исходным клоном 7G02-GFP-низкий.

### **Метод антигенной конкуренции**

В-клетки 7G02 (7G02, GFP низкий) собирали и высевали по 10000 клеток на лунку в 96-луночные микролуночные планшеты с круглым дном. Затем в эти лунки добавляли

10-50 мкл отсортированных субклонов (GFP высокий). Все клетки дважды промывали и инкубировали с белком E-кадгерин-мышинный-Fc в течение 1-3 часов на льду. Затем клетки дважды промывали и инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 поликлональными антителами BCR и мечеными R-фикоэритрином поликлональными антителами против мышинного Fc (Jackson ImmunoResearch) в течение приблизительно 1 часа. Затем клетки промывали и определяли связанные антитела с помощью проточной цитометрии с использованием FACS Canto (BD Biosciences). Количество рекомбинантного белка E-кадгерина, связывающегося с родительскими клетками 7G02-GFP-низкий, сравнивали с количеством рекомбинантного белка E-кадгерина, связанного с субклонами (GFP высокий). Более высокое связывание рекомбинантного E-кадгерина с субклоном (GFP-высокий) по сравнению с родительским клоном (GFP-низкий) по отношению к их уровню экспрессии BCR свидетельствует о BCR с более высокой связывающей способностью. На фиг. 5b представлены графики для субклонов 7G02-GFP-высокий, которые демонстрируют повышенное связывание с белком E-кадгерина по сравнению с родительскими B-клетками 7G02-GFP-низкий относительно их экспрессии BCR.

### **Клонирование и анализ последовательности выбранных субклональных антител AT1636**

Выбирали панель субклонов на основе усиленного связывания рекомбинантного антигена E-кадгерина по сравнению с родительским клоном 7G02. Из этих субклонов выделяли тотальную РНК с использованием метода TriPure/хлороформ (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. Затем генерировали кДНК с помощью обратной транскриптазы (SuperScript III, Invitrogen) и случайных гексамеров (Promega). Вариабельные домены тяжелых и легких цепей IgG амплифицировали с помощью ПЦР (FastStart Taq DNA Polymerase, Roche) в соответствии с процедурой производителя с применением лидер-специфических праймеров в сочетании со специфическими праймерами CH1 (тяжелая цепь) и Скарра (легкая цепь). Ампликоны использовали для дидезоксифлуоресцентного секвенирования по Сэнгеру (BDT, Invitrogen) с использованием праймеров, родственных использованным для амплификации. В таблице 1 представлены последовательности ДНК и аминокислотные последовательности субклонов, которые показали повышенное связывание антигена, относительно количества BCR на поверхности субклонов В-клеток. На основании этих данных о последовательности были рекомбинантно получены рекомбинантные антитела AT1636-I (VH SEQ ID NO: 3, VL SEQ ID NO: 18), AT1636-Y (VH SEQ ID NO: 10, VL SEQ ID NO: 18), AT1636-E (VH SEQ ID NO: 5, VL SEQ

ID NO: 18), AT1636-N (VH SEQ ID NO: 8, VL SEQ ID NO: 18), AT1636-YN (VH SEQ ID NO: 15, VL SEQ ID NO: 18), AT1636-IYN (VH SEQ ID NO: 16, VL SEQ ID NO: 18) и AT1636-IYEN (VH SEQ ID NO: 17, VL SEQ ID NO: 18).

Для получения рекомбинантных антител на основе последовательностей субклонов  
5 7G02 переменные области тяжелой и легкой цепи клонировали в рамке с  
человеческим IgG1 и константными областями каппа в векторы экспрессии на основе  
Double Gene рХС (Lonza). Конструкции проверяли на целостность с помощью  
секвенирования ДНК и трансфицировали в клетки ExpiCHO-S (платформа GS Xseed,  
Lonza). Клетки размножали и использовали для получения культуры клеток IgG в  
10 смесительных колбах с подпиткой в течение 7 дней. Очищенные от клеток  
супернатанты, содержащие рекомбинантные антитела AT1636, собирали и очищали с  
помощью хроматографии с белком А с использованием системы очистки АКТА (General  
Electric Lifesciences). Антитела элюировали буфером из 0,1 М цитрата, 150 мМ NaCl,  
рН 3,5, затем нейтрализовали в 1 М Трис-НСl, рН 9,0, а затем снова буферизовали в  
15 TBS-TS с помощью эксклюзионной хроматографии. Концентрацию устанавливали с  
помощью спектрофотометра NanoDrop (OD280, ThermoFisher). Содержание мономеров  
очищенного антитела было подтверждено на уровне >90% с помощью эксклюзионной  
хроматографии. Целостность очищенных белков устанавливали с помощью SDS-PAGE.

Затем рекомбинантные антитела сравнивали методом проточной цитометрии на  
20 предмет связывания с различными линиями клеток, включая DLD1 толстой кишки,  
СМТ93 мыши, МСF10а молочной железы, А431 кожи и А547 легкого (фиг. 6а и 6b). Из  
этих экспериментов авторы могли сделать вывод, что антитело AT1636-IYN, которое  
сочетает в себе 3 мутации (VH SEQ ID NO: 16, VL SEQ ID NO: 18), связывало эти  
клетки более эффективно по сравнению с AT1636 и другими вариантами AT1636.

#### **Пример 4. Анализ высокоаффинных вариантов AT1636**

##### **Связывание высокоаффинных вариантов AT1636 с использованием SPR**

Рекомбинантное антитело AT1636 и AT1636-YN (также называемое в настоящем документе -NY; VH SEQ ID:15 и VL SEQ ID:18) и AT1636-IYN (также называемое в  
 5 настоящем документе -IYN; VH SEQ ID:16 и VL SEQ ID:18) тестировали на связывание с рекомбинантным E-кадгерином p70 и сравнивали с антителом к E-кадгерину EP700Y с использованием IBIS Mx96 (IBIS Technologies) и CFM Spotter (Wasatch Microfluidics). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Sprint (версия 11.0.24, IBIS). Кривые связывания аппроксимировали с использованием  
 10 программного обеспечения Scrubber2 (программное обеспечение Biologic).

Чип SensEye G-STREP (Ssens BV, Энсхеде, Нидерланды) покрывали серией концентраций (0,2-2,0 мкг/мл) белка человеческого E-кадгерин p70-мышинный Fc-биотин (см. пример 3). Связывание оценивали при скорости потока 2 мкл/мин (во время ассоциации + диссоциации), 8 мкл/мин (стадии регенерации) при температуре 25 °C.  
 15 Затем антикроличий IgG (козий антикроличий H+L, Jackson), антимышиный IgG (козий антимышиный H+L, Jackson), EP700Y (Abcam), AT1636 и варианты -IYN и -NY вводили в серии концентраций 0,5 - 20 мкг/мл, в двух повторностях. Связывание устанавливали с помощью мультиплексной SPR-визуализации IBIS.

Как показано на фиг.7а, было продемонстрировано связывание AT1636 и вариантов -  
 20 YN и -IYN с растворимым E-кадгерином p70. AT1636 NY демонстрирует значительно улучшенное связывание по сравнению с AT1636 и демонстрирует примерно равное связывание по сравнению с AT1636 IYN. В случае антител AT1636 особенно увеличивается скорость ассоциации, а скорость диссоциации остается неизменной.

##### **Устойчивое связывание вариантов AT1636 с помощью ELISA**

Рекомбинантные белки mFc E-кадгерина захватывали на 96-луночных планшетах (Costar) с использованием козьих антител против мышинового Fcy IgG (Jackson). После блокирования TBS/5% BSA/0,05% Tween 20, двукратной промывки PBS/0,05% Tween, захвата и двукратной промывки PBS/0,05% Tween, добавляли аффинные варианты AT1636 и AT1636 (при 4 степени) и детектировали связывание этих антител после 2  
 30 промывок PBS/0,05% Tween с использованием козьего антитела против человеческого IgG H+L-HRP (Jackson). Связанные антитела визуализировали с использованием субстрата TMB (Sigma), реакцию останавливали с помощью H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) и

количественно определяли путем измерения OD450 с использованием планшет-ридера Envision (Perkin Elmer). Как показано на фиг. 7b (две левые панели), схожее повышенное связывание вариантов антител AT1636 -YN и -IYN по сравнению с антителом AT1636 наблюдалось с помощью ELISA с полноразмерным E-кадгерином и р70. И снова вариант IYN AT1636 демонстрировал более сильное связывание, чем -YN и антитело AT1636. Здесь SC10.17, гуманизированное антитело к E-кадгерину, специфичное к домену EC1, связывает полноразмерный E-кадгерин, но не усеченный вариант р70. Следует отметить, что все протестированные варианты антител AT1636, а также AT1636 дикого типа связывают усеченную форму E-кадгерина массой 70 кДа лучше, чем полноразмерный E-кадгерин.

В другом ELISA авторы тестировали связывание AT1636 и его вариантов с белком D3-мышинный Fc, содержащим аланиновые замены остатка Thr470. Поскольку связывание AT1636 зависит от O-маннозилированного р70, о чем свидетельствует ингибирование маннозилтрансферазы с использованием оксо-2-тиоксо-3-тиазолидинилуксусной кислоты в примере 2, фиг. 4, авторы сделали замену, которая устранила бы O-маннозилирование. Остаток 470 расположен в центре эпитопа AT1636 и, вероятно, маннозилирован. Действительно, авторы смогли показать, что AT1636 почти полностью потерял связывание с этим вариантом Thr470Ala D3 (фиг. 7b, правая панель). Варианты AT1636, несмотря на их повышенную способность связывания с р70 по сравнению с AT1636-wt, все еще зависели от надлежащего O-маннозилирования в их эпитопе связывания.

Чтобы оценить избирательность связывания р70 по сравнению с полноразмерным E-кадгерином, авторы протестировали широкий диапазон концентраций AT1636 и его вариантов на связывание с полноразмерным E-кадгерином, р70 и с белком D3-мышинный Fc, содержащим аланиновую замену остатка Thr470 - вариант, с которым связывание AT1636 сильно снижено (показано на фиг. 7b).

Как показано на фиг. 7c и в таблице 4, увеличение связывания по сравнению с AT1636 дикого типа наиболее выражено для вариантов -IYN и -YN. Важно отметить, что они сохраняют избирательное связывание с формой р70 E-кадгерина по сравнению с полноразмерным E-кадгерином (56,5-кратное для YN и 67,1-кратное для IYN) и (28,4-кратное для YN и 64,3-кратное для IYN), соответственно.

#### **Пример 5. Картирование эпитопа**

**Связывание E-кадгерина p70 с AT1636 зависит от маннозы**

Клетки DLD1 (ATCC CCL-221) лизировали с использованием буфера для лизиса (0,5% Triton X114 (Sigma), 0,5% DOC; 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCL pH 7,4, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) с добавлением ингибиторов протеазы и фосфатазы (Roche)) в течение 3 ч при 4 °C. После лизиса нерастворимую фракцию удаляли центрифугированием. Затем лизаты предварительно очищали нерелевантным антителом (антитело RSV паливизумаб), связанным с Dynabeads с белком G (Invitrogen) и гранулами со стрептавидином (Invitrogen) для удаления неспецифически связывающих белков. Затем предварительно очищенные лизаты инкубировали с антителом AT1636, связанным с гранулами Dynabeads с белком-G (Invitrogen) в течение 3 часов при 4 °C, трижды промывали буфером для лизиса, и связанные белки элюировали с гранул 450 mM метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида (Sigma). Элюаты анализировали с помощью геля SDS-PAGE в 1x буфере для образцов SDS-PAGE (BioRad) + 0,1M DTT с последующим вестерн-блоттингом на мембранах из PVDF. После блокирования мембран TBST/5% BSA мембраны инкубировали с кроличьим антителом к E-кадгерину (EP700Y, Abcam) для обнаружения белка E-кадгерина. Как показано на фиг. 8а, E-кадгерин p70 элюировался из AT1636 путем добавления большого количества маннозы, что указывает на то, что одна или несколько маннозных групп образуют характеристическую часть эпитопа связывания AT1636. Зависимость связывания AT1636 с E-кадгерином от маннозы была подтверждена с помощью ELISA. Рекомбинантные белки E-кадгерина захватывали на 96-луночных планшетах (Costar) с использованием козьих антител к мышинному IgG Fcy (Jackson). Были захвачены полноразмерный E-кадгерин (Sino Biologics), полученный из клеток HEK, и полноразмерный E-кадгерин, полученный из *E. coli* (LSbio). После захвата и двукратной промывки TBS/0,05% Tween добавляли AT1636 и EP700Y (Abcam) и AT1002 в качестве отрицательного контроля в дозированной концентрации. Связывание этих антител детектировали после двух промывок TBS/0,05% Tween с использованием козьего антитела к человеческому IgG Fc(y)-HRP (Jackson) или антитела к кроличьему IgG-HRP (Dako). Связанные антитела визуализировали с использованием субстрата TMB (Sigma), реакцию останавливали с помощью H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) и количественно определяли путем измерения OD450 с использованием планшет-ридера Envision (Perkin Elmer). В то время как EP700Y, кроличье антитело против домена EC5 E-кадгерина, связывает оба рекомбинантных белка E-кадгерина, AT1636 не связывает E-кадгерин, полученный из *E. coli* (не несущий посттрансляционные модификации), хотя связывает рекомбинантный продуцированный в HEK E-кадгерин (см. фиг. 8В).

Сообщалось, что несколько остатков Ser/Thr маннозилированы; пять в домене EC2, четыре в EC3, четыре в EC4 и один в EC5 E-кадгерина (Larsen, PNAS (2017), Vester-Christensen, PNAS (2013) и Lommel, PNAS (2015)). На фиг. 3 предполагаемые O-маннозилированные сайты на E-кадгерине обозначены черным цветом. При масс-спектрометрическом анализе иммунопреципитированного AT1636 белка E-кадгерина р70 было обнаружено, что остатки Ser/Thr являются одиночными O-маннозилированными.

### Связывание AT1636 с мутантным по аланину доменом EC3 E-кадгерина

Для определения точного эпитопа связывания антитела AT1636 в усеченном домене р70 E-кадгерина были созданы множественные мутации аланина в усеченном рекомбинантном внеклеточном домене 3 (D3). Сначала был создан усеченный внеклеточный домен, содержащий только домен D3, состоящий из аминокислотных остатков EVSLTTSTATVTVDVLDVNEAPIF (фиг. 3). Кроме того, были сконструированы одиночные аланиновые мутации каждого остатка. кДНК, кодирующие D3 и его аланиновые мутанты, клонировали в вектор pсDNA3, слитый с FLAG-меткой и мышинным Fc-хвостом, снабженным сортазой и HIS-меткой. Векторы временно трансфицировали в клетки Eхрi293 или CHO, и супернатанты, содержащие рекомбинантные белки, собирали через 7 дней. Рекомбинантный белок D3 или его аланиновые мутанты захватывали посредством мышинового Fc-домена на покрытых антителами к мышинному IgG H+L (5 мкг/мл, Jackson) 384-луночных спектральных планшетах HB (Perkin Elmer). После инкубации и двукратной промывки TBS/0,05% Tween добавляли AT1636-YN или контрольное Ab AT1002, и связывание этих антител определяли после двух промывок TBS/0,05% Tween с использованием вторичного козьего антитела против человеческого IgG Fc(γ)-HRP (Джексон). Связанные антитела визуализировали с помощью субстрата ТМВ и останавливали реакцию с помощью H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Количественное определение связанных антител осуществляли путем измерения OD450 на планшет-ридере Envision (Perkin Elmer).

Замены аланином приводили к частичному нивелированию связывания AT1636-YN по сравнению с E-кадгеринном дикого типа: E463A, S465A, T467A, S469A, T472A и V477A. Замены T468A и T470A/G/N/D полностью устраняли связывание AT1636-YN. Важность остатка 470 также проиллюстрирована в примере 4, фиг. 7b, правая панель, где AT1636 и его варианты не были способны связываться с вариантом белка D3, имеющим

мутацию аланина в положении 470. В целом, особенно 4 центральных треонина (467, 468, 470 и 472 в меньшей степени), по-видимому, регулируют связывание АТ1636 с Е-кадгерином и Е-кадгерином р70 (см. фиг. 9).

### 5 **Пример 6. Связывание АТ1636 соответствует коэкспрессии ТМТС3 и Е-кадгерина**

Larsen и его коллеги сообщили, что маннозилерование Е-кадгерина зависит от присутствия белков, содержащих тетраатрикопептидные повторы (TPR) (ТМТС1–4) (M. Rascaré M, PLoS One (2011), Bartels MF, PLoS One (2016), J.C. Sunryd, J Biol Chem (2014) и I.S.B. Larsen, PNAS (2017)). Используя экспрессию мРНК полноразмерного Е-кадгерина и ТМТС3 в > 1100 линиях клеток, полученных из базы данных мРНК Энциклопедии линий раковых клеток Института Брода (https://portals.broadinstitute.org/ccle), установили сильную корреляцию между коэкспрессией Е-кадгерина и ТМТС3, в то время как ни для одного из других ТМТС1, 2 и 4 такую корреляцию установить не удалось. Кроме того, можно было установить корреляцию между Е-кадгерином, ТМТС3 и связыванием АТ1636 (таблица 3). Используя пороговое значение 7 для экспрессии мРНК для ТМТС3 и Е-кадгерина, все линии клеток, которые демонстрируют  $\geq 7$  экспрессии мРНК ТМТС3 и Е-кадгерина, были спрогнозированы как положительные в отношении связывания АТ1636. Процент клеточных линий клеток, полученных из различных типов опухолей, для которых было спрогнозировано положительное связывание с АТ1636, показан на фиг. 10. Несколько солидных опухолей экспрессируют оба гена на высоком уровне, что позволяет предположить, что большой процент линий опухолевых клеток, включая опухоли верхние отделы желудочно-кишечного тракта (и дыхательных путей), пищевода, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, мочевыводящих путей, яичника и легкого, связывают АТ1636 или высокоаффинные варианты АТ1636.

### **Экспрессия полноразмерного Е-кадгерина в Е-кадгерин-отрицательной линии клеток, экспрессирующей ТМТС3**

30 Полная кодирующая последовательность Е-кадгерина была получена от Genart и субклонирована в лентивирусный вектор рHEF, содержащий IRES-GFP. Лентивирусные частицы получали с оболочкой VSV-G, а клетки-мишени SK-MEL-5 (АТСС НТВ-70) трансдуцировали вирусом и сортировали по экспрессии GFP после

размножения в течение по меньшей мере недели с использованием FACS Aria (BD). Выделенные клетки подвергали проточной цитометрии с антителом AT1002 в качестве отрицательного контроля, антителами AT1636 и EP700Y к E-кадгерину с использованием козьего античеловеческого антитела с Alexa647 (Invitrogen) и козьего антикроличьего антитела с Alexa647 (Jackson) в качестве реагента для обнаружения (фиг. 11). Сверхэкспрессия полноразмерного E-кадгерина в экспрессирующих ТМТС3, но обычно отрицательных по E-кадгерину клетках SK-MEL-5 приводит к связыванию антитела AT1636.

### **Связывание AT1636 зависит от ТМТС3**

10 Несколько кшРНК были разработаны для нацеливания на мРНК ТМТС3 (эталонная последовательность NM\_181783.4). В конечном итоге выбранная кшТМТС3 нацелена на последний кодирующий экзон (14):

22\_mer: AGGAGACATTCTGATGAATCAA. Выбранную кшРНК субклонировали в вектор pTRIPZ (Thermo Scientific) и генерировали лентивирусные частицы с оболочкой VSV-G

15 в соответствии с инструкциями производителя. Трансдуцировали клетки DLD1 (ATCC CCL-221) и индуцировали экспрессию кшРНК добавлением 1 мкг/мл доксицилина (Sigma). Через 4-7 дней в культуре клетки подвергали анализу с помощью проточной цитометрии на связывание антител AT1636 и AT1002 с использованием козьего античеловеческого антитела с Alexa647 (Invitrogen) для обнаружения связанных

20 антител. Параллельно выделяли РНК с использованием реагента для выделения Tripure (Roche), и получали кДНК с помощью набора SuperscriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen) с праймерами Oligo-dT. Количественную ПЦР проводили на ICycler (BioRAD) с IQ Sybrgreen supermix (BioRad) для обнаружения мРНК ТМТС3 с использованием прямого праймера ТМТС3 для кПЦР 5'-

25 GGTGTGGTTACTGCCTGCTAT-3' и обратного праймера 5'-GGACGGTAAGACTTGTGGCT-3' и с использованием контроля GAPDH для количественного определения транскриптов мРНК.

Как показано на фиг. 12, после нокадауна кшРНК ТМТС3 связывание AT1636 с клетками DLD1 сильно снижается.

30

**Пример 7. Рекрутер Т-клеток, нацеленный на E-кадгерин p70, индуцирует цитотоксичность в отношении линий опухолевых клеток.**

## Получение антител, рекрутирующих Т-клетки

Антитела, рекрутирующие Т-клетки (ТСЕ), были получены в формате ТСЕ, двухвалентном для связывания р70 и одновалентном для связывания CD3ε (mТСЕ) (фиг. 13а; S. Atwell, *Journal of Molecular Biology* (1997) и А.М. Merchant, *Nature Biotechnology* (1998)). Для получения антител, которые могут быть снабжены одним анти-CD3-фрагментом только на одном С-конце тяжелой цепи, использовали последовательности AT1636 и AT1636-IYN, кодирующие мутации S354C и T366W (SEQ ID) в одной Fc-области тяжелой цепи и мутации «впадины» Y349C, T366S, L368A, Y407V (SEQ ID) в другой Fc-области тяжелой цепи. Кроме того, в последовательности тяжелой цепи, содержащей мутации «выступа», С-концевые остатки лизина были заменены С-концевой ST-меткой (аминокислотная последовательность: GGGGSLPETGGNNNNNN). Антитела экспрессировали в клетках CHO при временной трансфекции тремя различными векторами, кодирующими а) легкую цепь, б) тяжелую цепь, содержащую ST-метку с мутацией «выступ», и с) тяжелую цепь с мутацией «впадины». mТСЕ были созданы и очищены в соответствии с методами, описанными L. Bartels et al. *Cancer Res* (2019) и L. Bartels et al. *Methods* (2019). Через 7 дней культивирования рекомбинантные антитела собирали и очищали из культурального супернатанта с помощью хроматографии с белком А с использованием системы очистки АКТА (General Electric Lifesciences). Антитела элюировали буфером из 0,1 М цитрата, 150 мМ NaCl, pH 3,5, затем нейтрализовали в 1 М Трис-HCl, pH 9,0, а затем снова буферизовали в TBS-TS с помощью эксклюзионной хроматографии. Концентрацию устанавливали с помощью спектрофотометра NanoDrop (OD280, ThermoFisher). Содержание мономеров очищенного антитела было подтверждено на уровне >90% с помощью эксклюзионной хроматографии. Целостность очищенных белков устанавливали с помощью SDS-PAGE.

Затем С-концы тяжелой цепи, модифицированные ST-меткой, были снабжены метилтетразиновыми фрагментами для клик-реакции с использованием транспептидазии, катализируемой сортазой, и конъюгированы с одноцепочечным переменным фрагментом анти-CD3 на основе антитела UCNT1, которое было модифицировано транспептидацией, катализируемой сортазой, аналогично полноразмерным антителам, но с дополнительным транс-циклооктеновым фрагментом для клик-реакции.

Аналогично готовили контрольные mТСЕ на основе антител AT1002 (специфичных к гемагглютининовым белкам вирусов гриппа 2 группы).

Эндотоксины, потенциально оставшиеся в препаратах mTCE, удаляли с помощью спин-колонок для удаления эндотоксинов высокой емкости Pierce (ThermoFisher), а окончательные уровни эндотоксинов подтверждали с помощью наборов для анализа EndoZyme (Hyglos).

5

В другом эксперименте авторы создали моновалентный рекрутер Т-клеток как для E-кадгерина, так и для CD3ε. Варианты AT1636 были переформатированы в биспецифичный формат выступ-во-впадину (KiH), состоящий из одной тяжелой и легкой цепи AT1636, AT1636-IYN или AT1002 и одноцепочечного анти-CD3ε-фрагмента, слитого с Fc-хвостом (фиг. 13с). Антитела экспрессировали в клетках CHO, временно трансфицированных тремя различными векторами, кодирующими а) легкую цепь AT1636, AT1636-IYN или AT1002, б) тяжелую цепь с мутацией по типу «выступ», несущую мутации S354C и T366W AT1636, AT1636-IYN или AT1002, и с) тяжелую цепь, несущую мутации по типу «впадина» Y349C, T366S, L368A и Y407V, в которых область VH-CH1 была заменена одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) UCHT1. Биспецифичные антитела KiH очищали с использованием колонок HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare), как и другие антитела (описано выше).

**Рекрутер CD3 Т-клеток AT1636 и -IYN индуцировал клеточную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток** Варианты mTCE AT1636 и AT1636-IYN оценивали в анализе цитотоксичности на основе люциферазы. Сначала DLD1, HCT116 и HT29 (все линии клеток CRC (колоректальный рак)) трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим люциферазу светлячка, а затем флуоресцентным белком ZsGreen, контролируемым промотором pHIV или pHCMV (Addgene). Зеленые флуоресцентные клетки сортировали с использованием системы FACS ARIA (BD). Трансфицированные и выделенные клетки предварительно инкубировали на планшетах для культивирования тканей с плоским дном в течение ночи с различными концентрациями mTCE и мононуклеарными клетками периферической крови в качестве эффекторных клеток при отношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням приблизительно 10:1. После инкубации анализа в течение 40-44 часов клетки лизировали с использованием ONE-Glo - лизирующего раствора, содержащего люциферин (Promega). Люминесценцию измеряли с помощью планшетного ридера EnVision (Perkin Elmer).

В анализе рекрутинга Т-клеток AT1636-IYN mTCE индуцировал цитотоксичность в отношении клеток-мишеней DLD1, HT29 и HCT116 со значениями EC<sub>50</sub> 139 пМ, 476 пМ и 926 пМ соответственно (фиг. 13b). Максимальный лизис клеток-мишеней варьировался от 69 до 91%. AT1636 mTCE индуцировал лизис клеток-мишеней при более высоких концентрациях, и после инкубации с отрицательным контролем AT1002 mTCE лизиса не наблюдалось.

AT1636-IYN KiN индуцировал цитотоксичность в отношении клеток-мишеней DLD1, HT29 и A375 со значениями EC<sub>50</sub> 160 пМ, 2500 пМ и 470 пМ соответственно (фиг. 13d). Максимальный лизис клеток-мишеней варьировался от 34 до 96%. AT1636 и AT1002 KiN индуцировали лизис клеток-мишеней только при более высоких концентрациях.

**Пример 8. Сверхэкспрессия E-кадгерина p70 действует как деадгезивная молекула.**

Открытая рамка считывания полноразмерного E-кадгерина и последовательности, кодирующие E-кадгерин p70, были получены от Geneart и субклонированы в лентивирусный вектор pHEF, содержащий IRES-GFP. Лентивирусные частицы получали с оболочкой VSV-G, и клетки-мишени трансдуцировали вирусом. Трансдуцированные клетки отбирали на предмет экспрессии GFP и высевали в равных количествах. Через 48 часов клетки, сверхэкспрессирующие белок E-кадгерин p70, продемонстрировали аберрантную, округлую клеточную морфологию, как показано на фиг. 14, что свидетельствует о менее сильных межклеточных взаимодействиях и большем количестве одиночных клеток, а также об эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) (V. Padmanaban, Nature (2019) и N.M. Aiello, Developmental Cell (2018)).

**Пример 9. Связывание AT1636 с линиями эпителиальных клеток увеличивается в присутствии TGFβ.**

TGFβ является хорошо известным фактором, способствующим эпителиально-мезенхимальному переходу. TGFβ (Prospec, Реховот, Израиль) (V. Padmanaban, Nature (2019), D.V.F. Tauriello, Nature (2018) и N.M. Aiello, Developmental Cell (2018)) добавляли в количестве от 10 до 40 нг/мл к линии клеток CRC человека DLD1, толстой кишки мыши СМТ93, кожи человека А431 и молочной железы человека MCF7, на период от 6 до 7 дней. TGFβ добавляли через день, а на 4-й день культуральную среду обновляли. Клетки культивировали в 24-луночных планшетах при низкой плотности клеток либо на обработанном пластике для культивирования тканей, либо в лунках, покрытых фибронектином. Кроме того, при необходимости добавляли AT1636 или AT1636-IYN (в концентрации от 10 до 50 мкг/мл) в присутствии или в отсутствие TGFβ. Морфологию клеток и плотность клеток контролировали с помощью Operetta (Perkin Elmer), а связывание AT1636 или AT1636-IYN с линиями клеток контролировали с помощью проточной цитометрии (MFI на клетку).

На фиг. 15 показано соотношение связывания AT1636-IYN между линиями клеток, культивируемыми в присутствии или в отсутствие TGFβ. Продолжительное культивирование в присутствии TGFβ в 3-4 раза увеличивало связывание AT1636-IYN с А431 и СМТ93, в то время как для MCF7 была обнаружена меньшая индукция, по данным проточной цитометрии. Наблюдалось небольшое изменение в связывании AT1636 с клетками HT29 в присутствии TGFβ.

Во время совместного культивирования с TGFβ и антителом AT1636-IYN в течение 5-7 дней, как описано выше, для клеток А431 наблюдалось снижение роста клеток и числа клеток, прикрепленных к поверхности лунки (см. фиг. 16а (10-кратное увеличение) и 16b (20-кратное увеличение)). Этот эффект наблюдался в условиях, когда клетки культивировали либо непосредственно на пластике, либо в лунках, покрытых фибронектином.

**Пример 10. Интернализация AT1636 и высокоаффинных вариантов**

8000 клеток DLD1 высевали по 100 мкл на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение ночи. Антитела AT1636, высокоаффинные варианты AT1636, антитела AT1002 и SC10.17 конъюгировали с козьим антителом к человеческому Fc Fab, меченным красителем Zenon pHrodo iFL (Invitrogen), в течение

15 минут инкубации в соответствии с инструкциями производителя. Затем к клеткам DLD1 добавляли антитела и отслеживали интернализацию pHrodo-конъюгированных антител с течением времени путем детекции каждый час в Incucyte (Essenbio) в течение максимум 60 часов.

- 5 На фигуре 17 показана флуоресценция красителя pHrodo, индуцированная кислой средой, свидетельствующая о том, что высокоаффинные варианты AT1636 и AT1636 интернализуются в клетки DLD1. Антитело AT1636-IYN наиболее эффективно интернализуется по сравнению с антителами AT1636-YN, AT1636 или SC10.17. AT1002 в качестве отрицательного контроля, напротив, не интернализуется.

10

**Пример 11. Взаимодействие полноразмерного E-кадгерина и p70 с CD103 на CD8+ Т-клетках.**

- Свежие PBMC получали из крови, собранной в пробирки с литием и гепарином, с использованием центрифугирования в градиенте Ficoll, и CD8+ Т-клетки выделяли с использованием набора для обогащения CD8 Т-клеток человека MagniSort™ (Thermo Fisher), следуя инструкциям производителя. Затем клетки CD8+ культивировали в RPMI с 10% FCS пенициллином/стрептавидином в присутствии 10 мкг/мл PHA, 6000 ЕД/мл IL-2 и 10 нг/мл TGFβ при плотности клеток  $1 \times 10^6$  МНПК в 1 мл. Примерно через 10 дней экспрессию CD103 на клетках CD8 определяли с помощью проточной цитометрии (клон Ver ACT 8, BD, меченый FITC).

- Для анализа взаимодействия CD103 на CD8+ Т-клетках с белками E-кадгерина, связанными с планшетом, полноразмерный E-кадгерин и p70 наносили на ночь в DPBS, содержащем 1 mM Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, и экспрессирующие CD103 CD8+ Т-клетки метили 5 мкМ Celltrace-CFSE (Thermo Fisher) в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки ресуспендировали в культуральной среде с 1 mM Mn<sup>2+</sup> в концентрации  $1 \times 10^5$ /мл и предварительно инкубировали в течение 30 мин с 10 мкг/мл антитела отрицательного контроля AT1002, антитела к CD103 и AT1636 и его варианта -IYN. в течение 30 минут. После добавления 50000 клеток (100 мкл) на 30 минут при 37 °C в каждую лунку, содержащую белки E-кадгерина, лунки опорожняли, переворачивая планшет, промывали DPBS и фиксировали 3,7% формалином в DPBS перед анализом с помощью флуоресцентного микроскопа.

На фигуре 18 показано покрытие лунок мечеными CFSE CD103+ CD8+ Т-клетками. Когда клетки предварительно инкубировали со специфичным к CD103 антителом MCA708, клетки не прикреплялись к полноразмерному E-кадгерину. Когда клетки предварительно инкубировали с AT1636 и вариантом -IYN, клетки по-прежнему могли 5 прикрепляться, что свидетельствует о том, что AT1636 не взаимодействует с белком CD103 на клетках. Кроме того, авторы наблюдали, что CD103+ CD8+ Т-клетки не прикреплялись к белку E-кадгерина p70.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связывают один или более О-маннозилированных остатков треонина Е-кадгерина, где указанные один или более О-маннозилированных остатков треонина присутствуют в 5 положениях аминокислот 467-472 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.
2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с указанным Е-кадгерином 10 зависит от присутствия остатка О-маннозилированного треонина в положении 467, остатка О-маннозилированного треонина в положении 468, остатка О-маннозилированного треонина в положении 470, остатка О-маннозилированного треонина в положении 472, остатка глутаминовой кислоты в положении 463, остатка серина в положении 465, остатка серина в положении 469 и/или остатка валина в 15 положении 477 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.
3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где связывание указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента с указанным Е-кадгерином зависит от присутствия остатка О-маннозилированного треонина в положении 467, 20 и/или остатка О-маннозилированного треонина в положении 468, и/или остатка О-маннозилированного треонина в положении 470 последовательности Е-кадгерина, как показано на фиг. 1А.
4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, 25 отличающиеся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа лучше, чем О-маннозилированный полноразмерный Е-кадгерин.
5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать О- 30 маннозилированный Е-кадгерин, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или более и необязательно каждое из следующего:
  - а. CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $GFX_1FSX_2AW$ , где  $X_1$  представляет собой Т или I и где  $X_2$  35 представляет собой N или Y;

или CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $GFX_1FSX_2AW$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

5 b. CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $IKSKIDG X_1T X_2$ , где  $X_1$  представляет собой G или E, и где  $X_2$  представляет собой T или I;

или CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $IKSKIDG X_1T X_2$

10 1, 2 или 3 консервативными заменами;

c. CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $TPGVGX_1NX_2PYYFDR$ , где  $X_1$  представляет собой A или T и где  $X_2$  представляет собой D или N;

15 или CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $TPGVGX_1NX_2PYYFDR$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

d. CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $QSVLCRSNNKNC$ ;

или CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $QSVLCRSNNKNC$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

25 e. CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $WAX_1$ , где  $X_1$  представляет собой S или C;

или CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $WAX_1$  1, 2 или 3 консервативными заменами;

30

f. CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  $QQYSNTPQT$ ;

или CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от указанной последовательности  $QQYSNTPQT$  1,

35 2 или 3 консервативными заменами.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, содержащие:

- 5 а. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT; или
- 10 б. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий
- 15 последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT; или
- 20 в. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность
- 25 QQYSNTPQT; или
- 30 д. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANDPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность
- 35 QQYSNTPQT; или
- е. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTFSNAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий



- к. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFTF SYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT; или
- 5
1. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGGTT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT; или
- 10
- 15
- м. CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GFIFSYAW, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность IKSKIDGETT, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность TPGVGANNPYYFDR, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность QSVLCRSNNKNC, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность WAS, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQYSNTPQT.
- 20
7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, содержащие:
- 25
- вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VH, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17; и/или
- вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VL, выбранной из группы, состоящей из
- 30
- SEQ ID NO: 18-22.
8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, содержащие:
- последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по
- 35
- меньшей мере на 80%; или



- последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 11, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 5 - последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 12, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 10 - последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по
- 15 меньшей мере на 80%; или
- последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL,
- 20 представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, которые представляют собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

25

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, где указанное антитело относится к изотипу IgG, предпочтительно IgG1.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, которые являются афукозилированными.

30

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с антителом по любому из пп. 1-11 за связывание с O-маннозилированным E-кадгерином, предпочтительно с O-маннозилированным усеченным E-кадгерином

35 массой 70 кДа.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент обладает одной или более, и предпочтительно каждой из следующих характеристик:

- 5 - связывается с внеклеточным (ЕС)3 доменом О-маннозилированного Е-кадгерина;
- связывает О-маннозилированный усеченный Е-кадгерин массой 70 кДа лучше, чем О-маннозилированный полноразмерный Е-кадгерин;
- 10 - связывает опухолевые клетки, коэкспрессирующие Е-кадгерин и О-маннозилтрансферазу, предпочтительно ТМТСЗ.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, которые связаны с другим соединением, предпочтительно с соединением, выбранным из

- 15 группы, состоящей из иммуномодулирующего соединения, соединения, связывающегося с Т-клетками, соединения, связывающегося с естественными клетками-киллерами (НК-клетками), соединения, связывающегося с естественными киллерными Т-клетками (НКТ-клетками), соединения, связывающегося с гамма-дельта Т-клетками, CD3-специфичного связывающего соединения, TGFβ-специфичного связывающего соединения, цитокина, второго антитела или его антигенсвязывающей части, детектируемой метки, лекарственного средства, химиотерапевтического
- 20 препарата, цитотоксического средства, токсического фрагмента, гормона, фермента и радиоактивного соединения.

- 25 15. Биспецифичное или мультиспецифичное связывающее соединение, предпочтительно биспецифичное или мультиспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое способно связывать О-маннозилированный Е-кадгерин, содержащее:

- антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13; и
- 30 - иммуномодулирующее соединение.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13 и терапевтическое соединение.

- 35 17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 14, или биспецифичное или мультиспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, или

конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 16, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13 связаны с CD3-специфичным связывающим соединением или TGF $\beta$ -специфичным связывающим соединением.

- 5 18. Биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие:
- один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-13; и
  - один Fab-фрагмент другого антитела, предпочтительно специфичного к Т-клетке, 10 естественной клетке-киллеру (NK-клетке), естественной киллерной Т-клетке (NKT-клетке) или гамма-дельта Т-клетке, предпочтительно специфичного к CD3.
19. Биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связывать O-маннозилированный E-кадгерин, содержащие:
- 15 - один Fab-фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-13; и
- один Fab-фрагмент другого антитела, специфичного к TGF $\beta$ .
20. Т-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR), которая способна 20 связывать O-маннозилированный E-кадгерин, где указанная CAR-Т-клетка содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела по любому из пп. 1-13.
21. Т-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR) по п. 20, содержащая 25 последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, как указано в п. 5 или п. 6.
22. Выделенная, синтетическая или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, или кодирующая по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи 30 антитела по любому из пп. 1-19, или кодирующая по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела по любому из пп. 1-19, или кодирующая по меньшей мере переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-19.

23. Нуклеиновая кислота по п. 22, содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-39; и/или содержащая последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-44.
24. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 22-23, которая кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке-хозяине, не являющейся клеткой человека.
25. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 22-24.
26. Вектор по п. 25, где указанный вектор представляет собой CAR-T-клеточный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домен, активирующий T-клетки, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенраспознающий домен, где указанный антигенраспознающий домен содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела по любому из пп. 1-19, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела по любому из пп. 1-19.
27. Вектор по п. 25 или п. 26, содержащий:
- последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 23, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
  - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 23, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
  - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 24, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%;
  - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 25, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL,



- представленную в SEQ ID NO: 43, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 5 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 33, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 10 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 34, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 15 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 35, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 20 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 36, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 25 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 37, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 30 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%; или
- 35 - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, представленную в SEQ ID NO: 39, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую VL, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательности, идентичные им по меньшей мере на 80%.
28. Выделенная или рекомбинантная клетка-хозяин или отличное от человека животное, содержащие антитело, антигенсвязывающий фрагмент, биспецифичное антитело, мультиспецифичное антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, CAR-T-клетку, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-27.

29. Клетка-хозяин по п. 28, которая представляет собой клетку млекопитающего, бактериальную клетку, растительную клетку, клетку НЕК293Т или клетку СНО.
30. Композиция, содержащая антитело, антигенсвязывающий фрагмент,  
5 биспецифичное антитело, мультиспецифичное антитело, конъюгат антитело-  
лекарственное средство, CAR-T-клетку, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или  
клетку-хозяина по любому из пп. 1-29.
31. Композиция по п. 30, где указанная композиция представляет собой  
10 фармацевтическую композицию, которая также содержит фармацевтически  
приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.
32. Композиция по п. 30 или п. 31, дополнительно содержащая другое  
15 терапевтическое средство для лечения или предотвращения расстройства, связанного с  
клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими  
O-маннозилированный E-кадгерин.
33. Составной набор, содержащий антитело, антигенсвязывающий фрагмент,  
биспецифичное антитело, мультиспецифичное антитело, конъюгат антитело-  
20 лекарственное средство, CAR-T-клетку, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или  
клетку-хозяина по любому из пп. 1-29, и другое терапевтическое средство для лечения  
или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно  
опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин.
- 25 34. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или  
конъюгата антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетки по любому из пп. 1-21,  
включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор  
по любому из пп. 22-27, и предоставление возможности указанной клетке  
30 транслировать указанную нуклеиновую кислоту или вектор, тем самым продуцируя  
указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-  
лекарственное средство, или CAR-T-клетку по любому из пп. 1-21, где способ  
предпочтительно дополнительно включает выделение указанного антитела или  
антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитело-лекарственное средство,  
или CAR-T-клетки из указанной клетки и/или из культуральной среды.
- 35

35. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин по любому из пп. 1-29 для применения в качестве лекарственного средства, или профилактического средства, или диагностического средства.
36. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин по любому из пп. 1-29 для применения в способе лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин.
37. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин по любому из пп. 1-29 для применения в диагностике расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин.
38. Композиция по п. 32, составной набор по п. 33 или антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин для применения по п. 36 или п. 37, где указанное расстройство выбрано из группы, состоящей из эпителиального рака, аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходного-

клеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза, предпочтительно выбрано из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака  
5 головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

39. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело,  
10 или мультиспецифичное антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетка, или нуклеиновая кислота, или вектор, или клетка-хозяин для применения по любому из пп. 36-38, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичное антитело, или мультиспецифичное антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетку, или нуклеиновую  
15 кислоту, или вектор, или клетку-хозяина комбинируют с другим терапевтическим средством, эффективным для лечения и/или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин.

20 40. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетки по любому из пп. 1-21 для определения того, содержит ли образец клетки, предпочтительно опухолевые клетки, содержащие O-маннозилированный E-кадгерин.

25 41. Способ определения наличия в образце клеток, предпочтительно опухолевых клеток, содержащих O-маннозилированный E-кадгерин, где способ включает:  
- приведение указанного образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом,  
30 или конъюгатом антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клеткой по любому из пп. 1-21, и  
- обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или  
35 CAR-T-клетки с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, если они присутствуют, и

- определение того, связаны ли клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или конъюгатом антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, присутствуют ли в указанном образце  
5 клетки, предпочтительно опухолевые клетки, содержащие O-маннозилированный E-кадгерин.

42. Способ определения того, страдает ли индивидуум, являющийся человеком или отличный от человека, раком, положительным на O-маннозилированный E-кадгерин,  
10 где способ включает:

- приведение опухолевых клеток указанного индивидуума в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или конъюгатом антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клеткой по любому из пп. 1-21,

15 - обеспечение возможности связывания указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетки с опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, если они присутствуют, и

20 - определение того, связаны ли опухолевые клетки с указанным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или биспецифичным антителом, или мультиспецифичным антителом, или конъюгатом антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клеткой, определяя таким образом, страдает ли указанный индивидуум раком, содержащим O-маннозилированный E-кадгерин и O-маннозилтрансферазу,  
25 предпочтительно ТМТСЗ.

43. Способ лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму  
30 терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина, или композиции, или составного набора по любому из пп. 1-33, необязательно совместно с дополнительным терапевтическим  
35 средством или терапевтической процедурой.

44. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина по любому из пп. 1-29 для изготовления лекарственного средства.
45. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифичного антитела, или мультиспецифичного антитела, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетки, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или клетки-хозяина по любому из пп. 1-29 для изготовления лекарственного средства для лечения или предотвращения расстройства, связанного с клетками, предпочтительно опухолевыми клетками, содержащими O-маннозилированный E-кадгерин.
46. Способ по п. 43 или применение по п. 44 или п. 45, где указанное расстройство выбрано из группы, состоящей из эпителиального рака, аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального перехода, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака гортани, карциноидной опухоли, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, внутриэпителиальной карциномы, светлоклеточной карциномы, меланомы, множественной миеломы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, переходноклеточного рака почки, рака маточной трубы и перитонеального карциноматоза, предпочтительно выбрано из группы, состоящей из колоректального рака, рака толстой кишки, рака толстой кишки подтипа CMS1, рака толстой кишки подтипа CMS2, рака толстой кишки подтипа CMS3, рака толстой кишки подтипа CMS4, рака гортани, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака желудка, рака мочевыводящих путей, рака предстательной железы и рака яичника.

47. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или CAR-T-клетка, полученные способом по п. 34.

10	20	30	40	50
MGPWSRSLSA	LLLLLQVSSW	LCQEPEPCHP	GFDAESYTFT	VPRRHLEGR
60	70	80	90	100
VLGRVNFEDC	TGRQRTAYFS	LDTRFKVGTD	GVITVKRPLR	FHNPOIHFLV
110	120	130	140	150
YAWDSTYRKF	STKVTLNTVG	HHHRPPPHQA	SVSGIQAELL	TFPNSSPGLR
160	170	180	190	200
RQQRDWVIPP	ISCPENEKGP	FPKNLVQIKS	NKDKEGKVFY	SITGQGADTP
210	220	230	240	250
PVGVFIIERE	TGWLKVTEPL	DRERATYTL	FSHAVSSNGN	AVEDPMEILI
260	270	280	290	300
TVTDQNDNKP	EFTQEVFKGS	VMEGALPGTS	VMEVTATDAD	DDVNTYNAAI
310	320	330	340	350
AYTILSQDPE	LPDKNMFTIN	RNTGVISVVT	TGLDRESFPT	YTLVVQAADL
360	370	380	390	400
QGEGLSTTAT	AVITVTDND	NPPIFNPTTY	KGQVPENEAN	VVITTLKVD
410	420	430	440	450
ADAPNTPAWE	AVYTILNDDG	GQFVVTTNPV	NNDGILKTAK	GLDFEAKQQY
460	470	480	490	500
ILHVAVTNVV	PFEVSLTTST	ATVTVDVLDV	NEAPIFVPPE	KRVEVSEDFG
510	520	530	540	550
VGQEITSYTA	QEPDTFMEQK	ITYRIWRDTA	NWLEINPDTG	AISTRAELDR
560	570	580	590	600
EDFEHVKNST	YTALIIATDN	GSPVATGTGT	LLLILSDVND	NAPIPEPRTI
610	620	630	640	650
FFCERNPKPQ	VINIIDADLP	PNTSPFTAEL	THGASANWTI	QYNDPTQESI
660	670	680	690	700
ILKPKMALEV	GDYKINLKLM	DNQNKDQVTT	LEVSVCDCG	AAGVCRKAQP
710	720	730	740	750
VEAGLQIPAI	LGILGGILAL	LILILLLLLF	LRRRAVVKEP	LLPPEDDTRD
760	770	780	790	800
NVYYYDEEGG	GEEDQDFDLS	QLHRGLDARP	EVTRNDVAPT	LMSVPRYLPR
810	820	830	840	850
PANPDEIGNF	IDENLKAADT	DPTAPPYDSL	LVFDYEGSGS	EAASLSSLNS
860	870	880		
SESDKDQDYD	YLNEWGNRFK	KLADMYGGGE	DD	

Фиг. 1А

Сигнальный пептид:

MGPWSRSLALLLLLQVSSWLCQEPEP

Последовательность предшественника:

CHPGFDAESYFTVPRRHLEGRVLRVNFEDCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTGVDGVT  
VKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTLNTVGHHRPPPHQASVSGIQAELLT  
FPNSSPGLRRQKR

Домен EC1:

DWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIKSNKDKEGKVFYSITGQGADTPPVGVFIIERETGW  
LKVTEPLDRERIATYTLFSAVSSNGNAVEDPMEILITVTDQNDNKPEF

Домен EC2:

TQEVFKGSVMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYNAAIAYTILSQDPELPDKNMFT  
INRNTGVISVVTTGLDRESFPTYTLVQAADLQGEGLSTTATAVITVTDNDNPPIF

Домен EC3:

NPTTYKGVPEANEANVVITTLKVTDADAPNTPAWEAVYTILNDDGGQFVVTTNPVN  
NDGILKTAKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVPEEVSLTTSTATVTVDVLDVNEAPIF

Домен EC4:

VPPEKRVEVSEDFGVGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEINPDTGAIST  
RAELDREDFEHVKNSTYALIIATDNGSPVATGTGTLILLSDVNDNAPIP

Домен EC5:

EPRTIFFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESIILKPK  
MALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLVSVCDCEGAAGVCRKAQPVEAGL

Домен TM:

QIPAILGILGGILALLLILLLLLLFL

Цитоплазматический домен 1:

RRRAVVKEPLLPEDDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDV  
APTLMSVPRYLPRPA

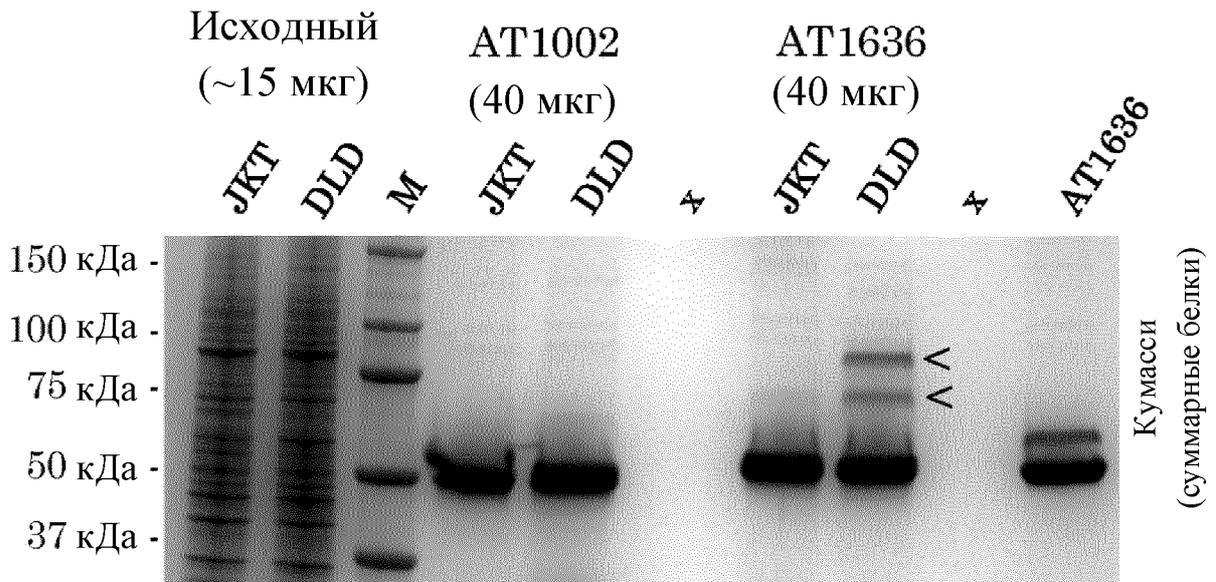
Цитоплазматический домен 2:

NPDEIGNFIDENLKAADTDPTAPPYDSSLVFDYEGSGSEAASLSSLNSSESDDKDQDYD  
YLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD

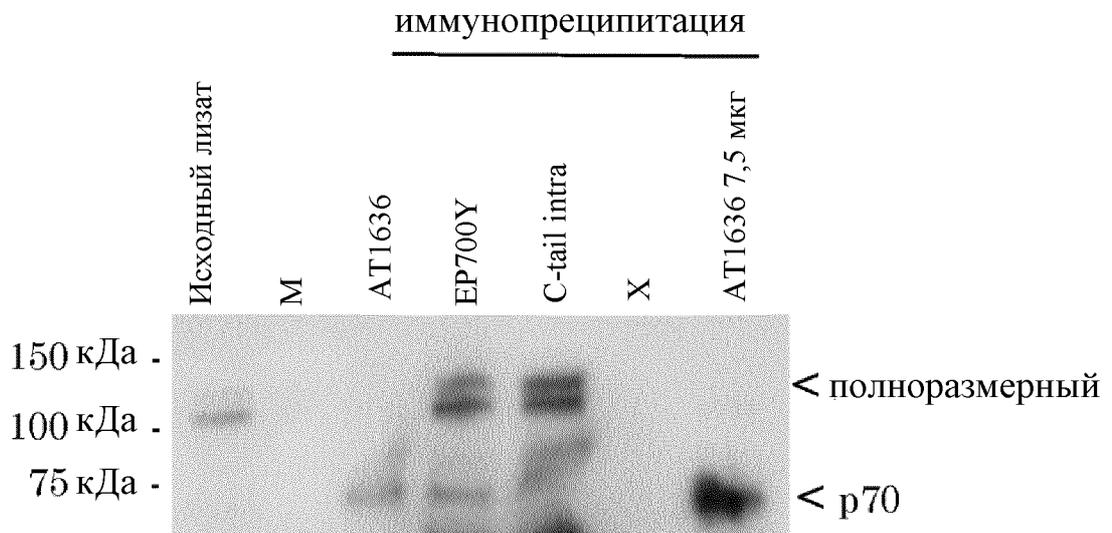
Фиг. 1B

**EVSLTTSTAT**VTVDVLDVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFG  
VGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEIN  
PDTGAISTRAELDREDFEHVKNSTYALIIATDNGSPV  
ATGTGTLILLSDVNDNAPIPEPRTIFFCERNPKPQVIN  
IIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESII  
LKPKMALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVC  
DCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGILALLILILL  
LLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRDNVYYYDEEGGEE  
DQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPRYL  
PRPANPDEIGNFIDENLKAADTDPTAPPYDSLLVFDY  
EGSGSEAASLSSLNSSESDDKDQDYDYLNEWGNRFKK  
LADMYGGGEDD

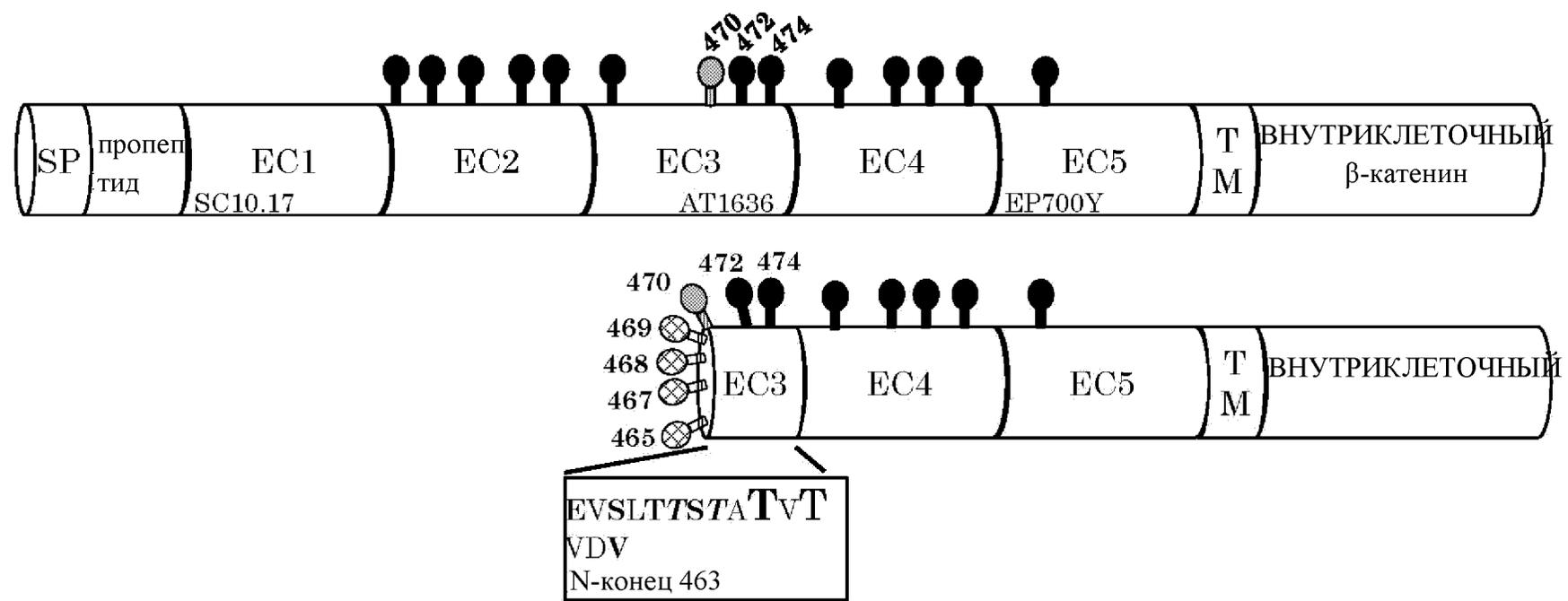
Фиг. 1С



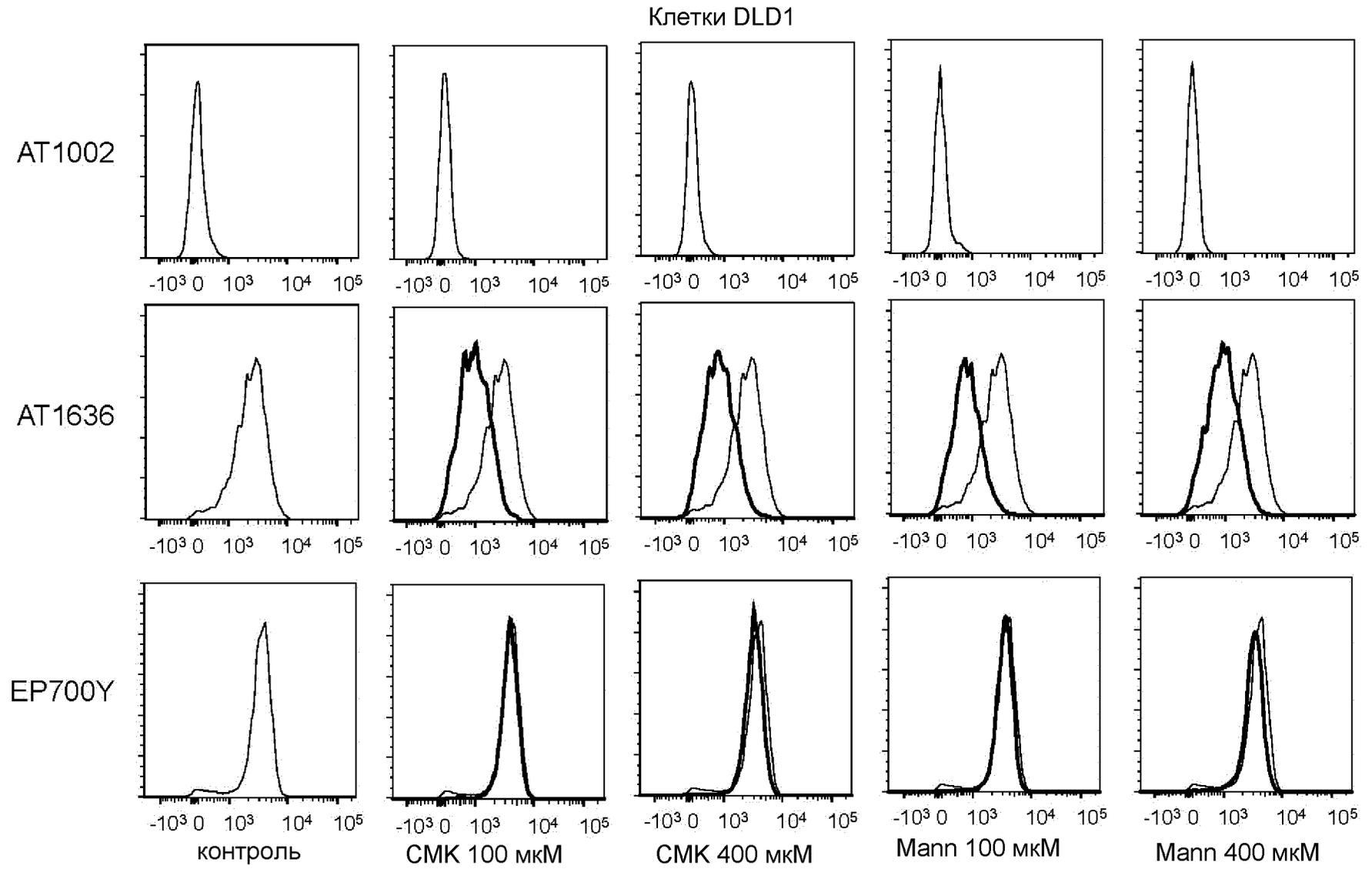
Фиг. 2А



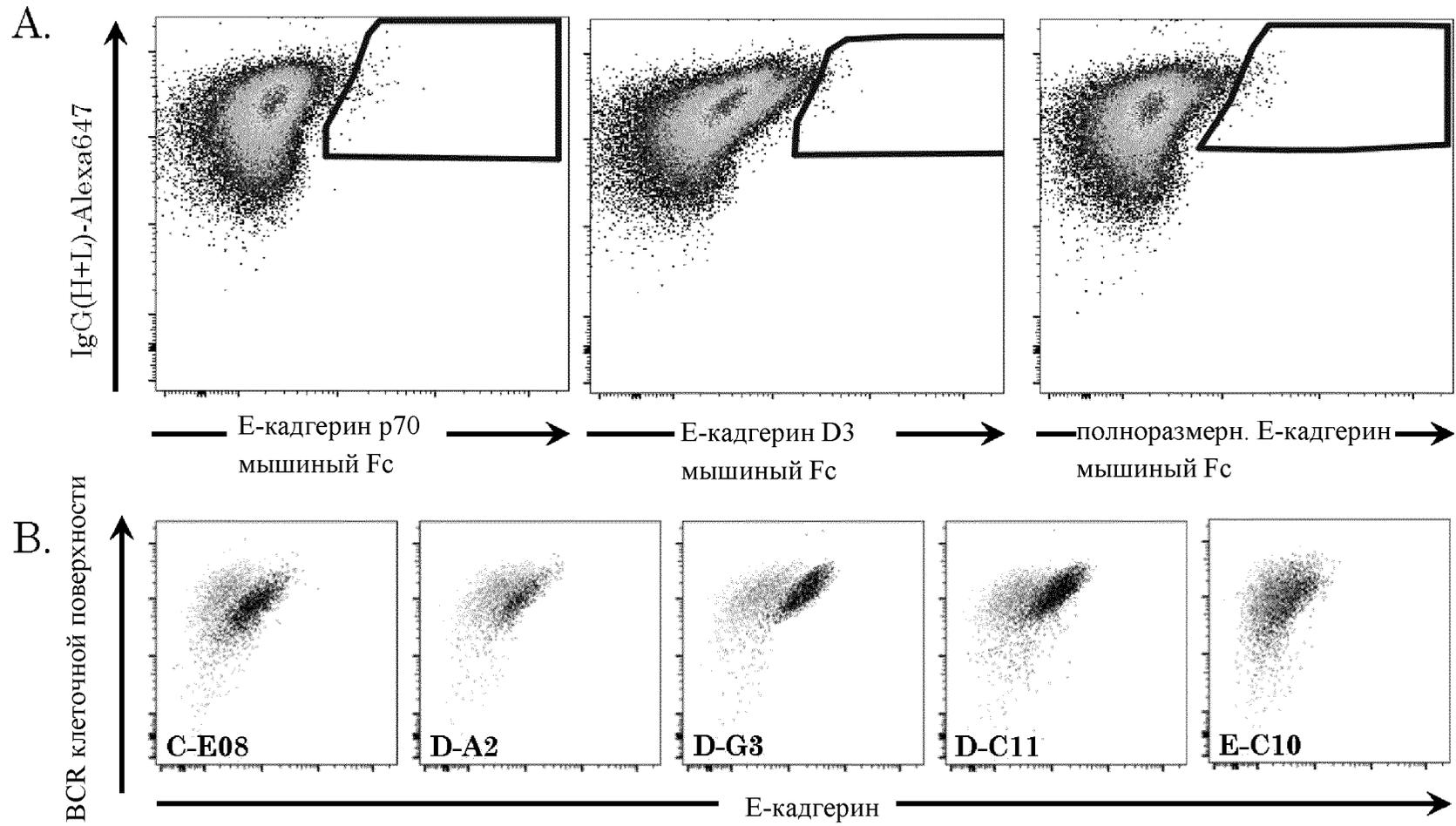
Фиг. 2В



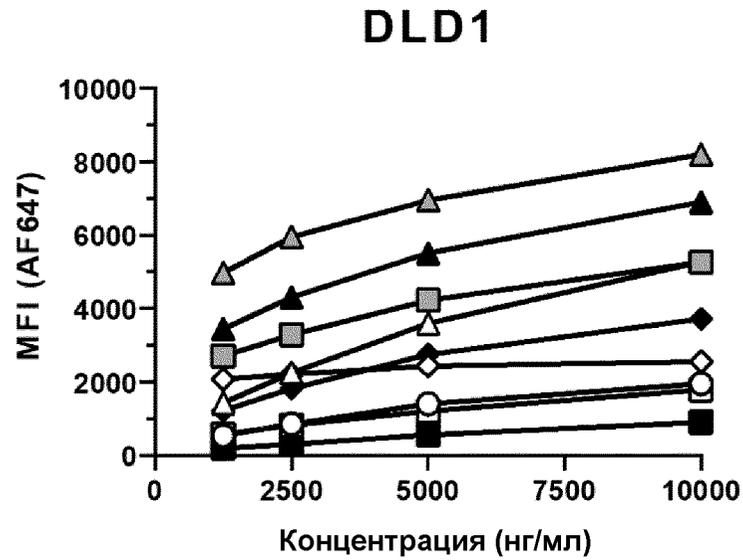
Фиг. 3



Фиг. 4

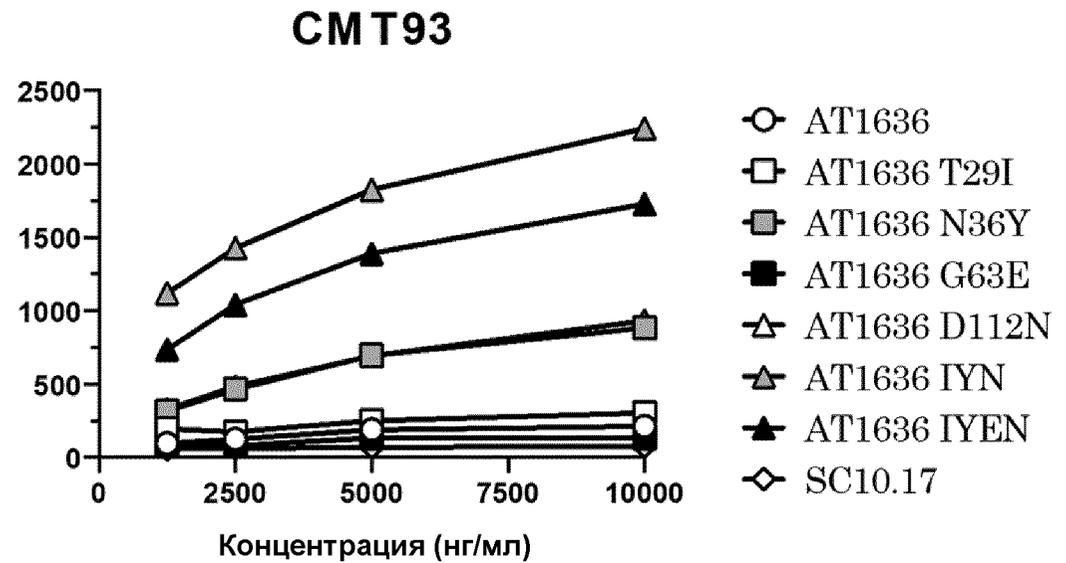
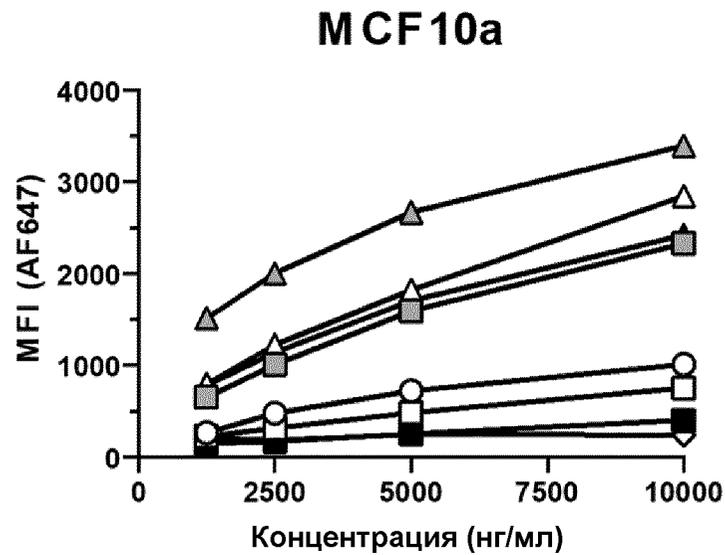


Фиг. 5

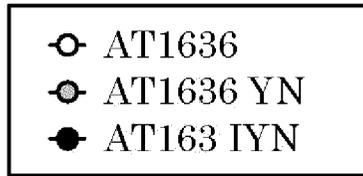


- AT1636
- AT1636 T29I
- AT1636 N36Y
- AT1636 G63E
- △ AT1636 D112N
- △ AT1636 IYN
- ▲ AT1636 IYEN
- ◇ SC10.17
- ◆ EP700Y

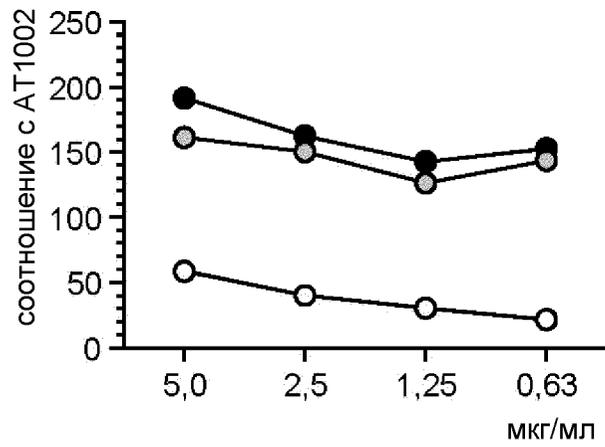
Фиг. 6А



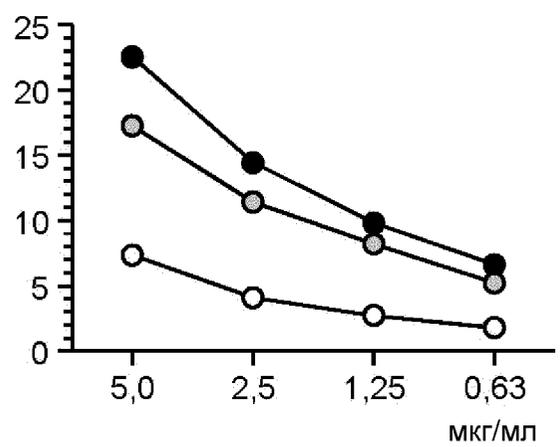
- AT1636
- AT1636 T29I
- AT1636 N36Y
- AT1636 G63E
- △ AT1636 D112N
- △ AT1636 IYN
- ▲ AT1636 IYEN
- ◇ SC10.17



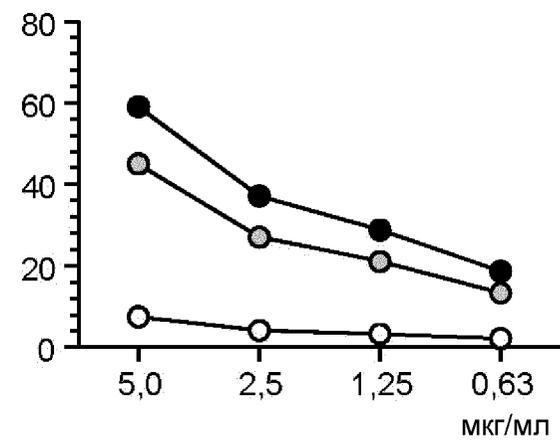
A431



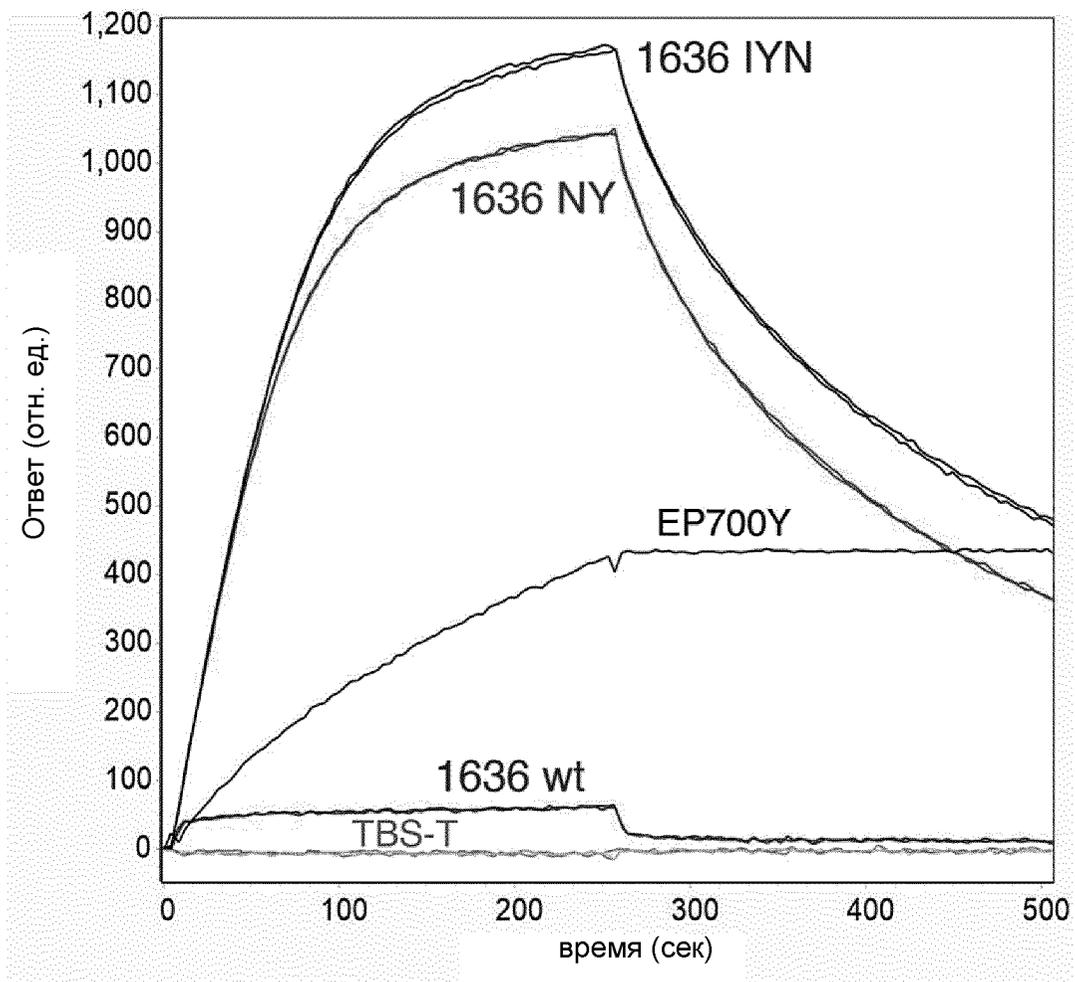
A549



CMT93

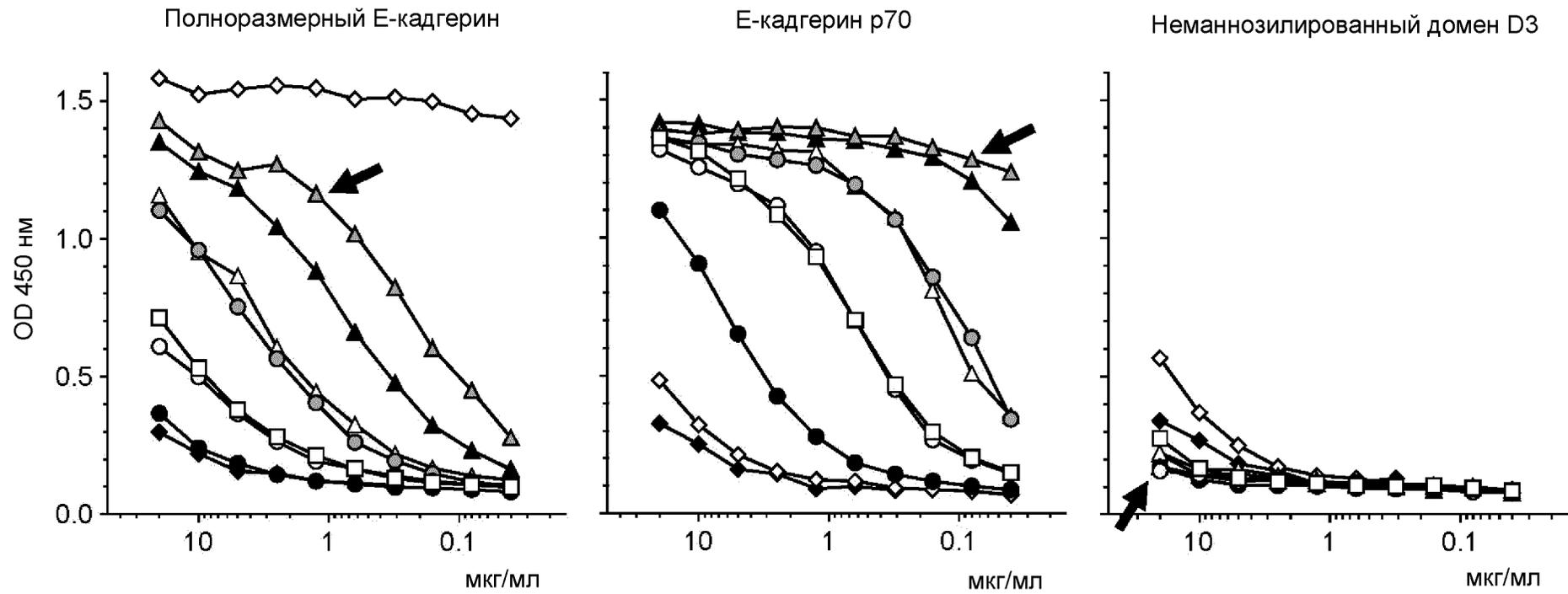


Фиг. 6В

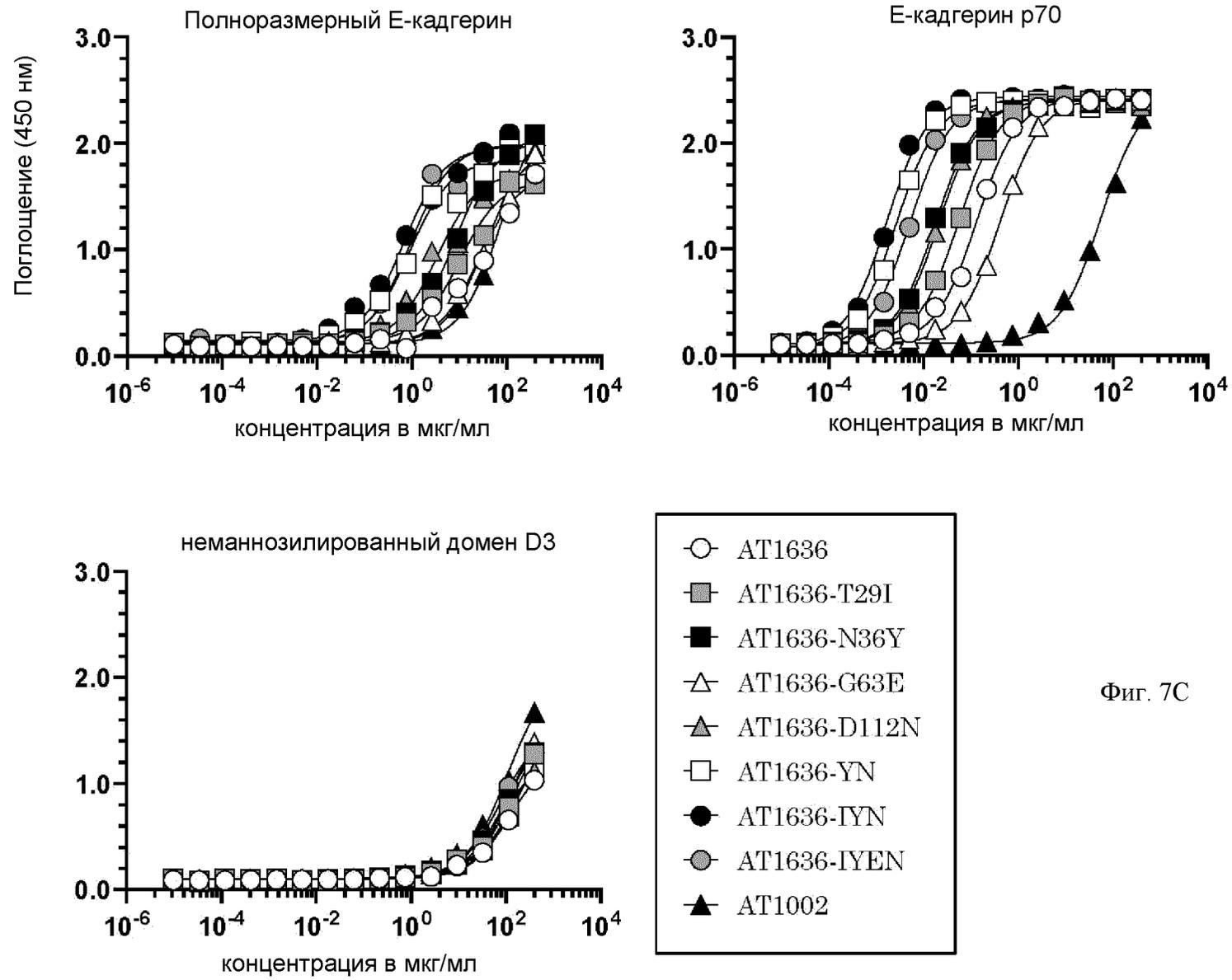


Фиг. 7А

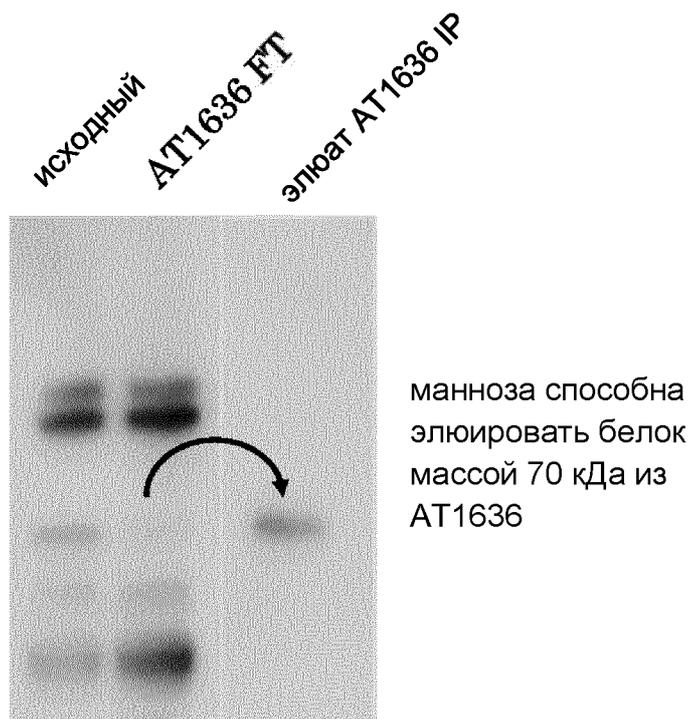
□ AT1636 дикого типа	○ AT1636 T29I	△ AT1636 D112N	◇ SC10.17
	● AT1636 N36Y	▲ AT1636 IYN	◆ AT1002
	● AT1636 G63E	▲ AT1636 IYEN	



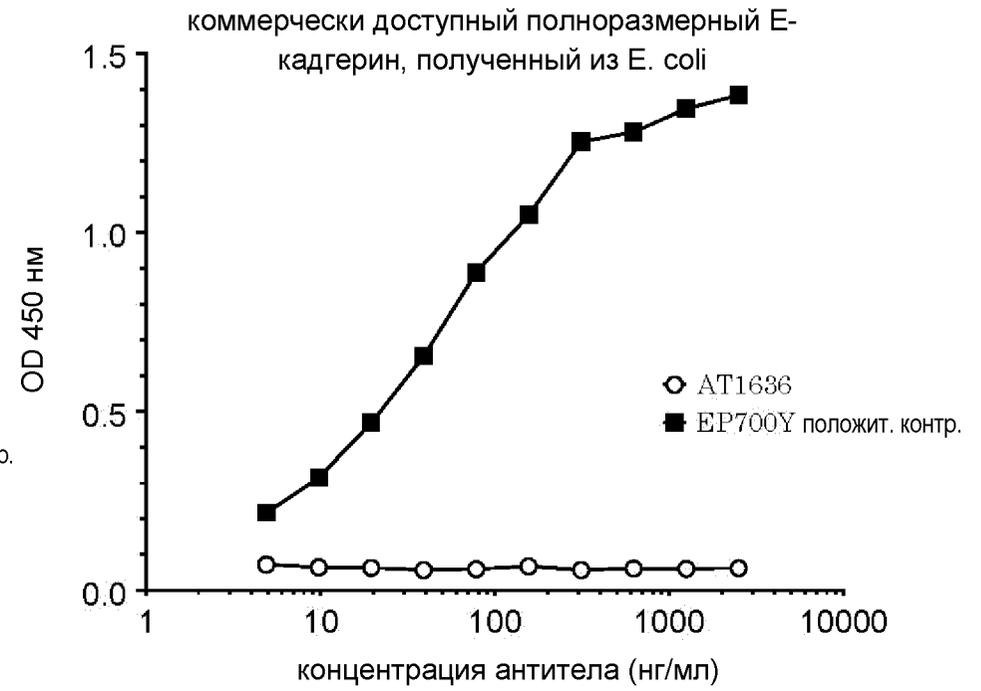
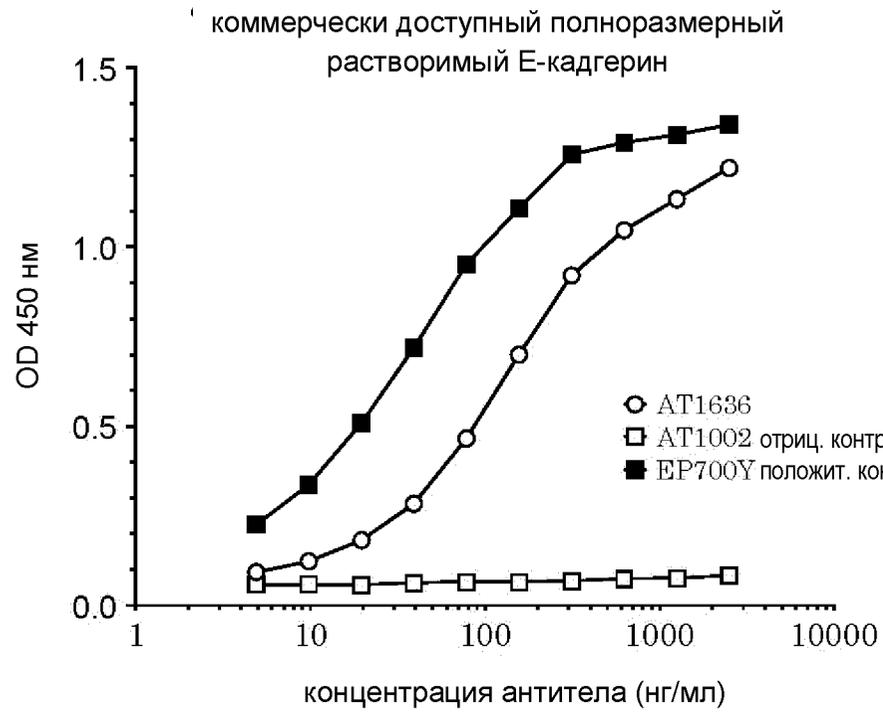
Фиг. 7В



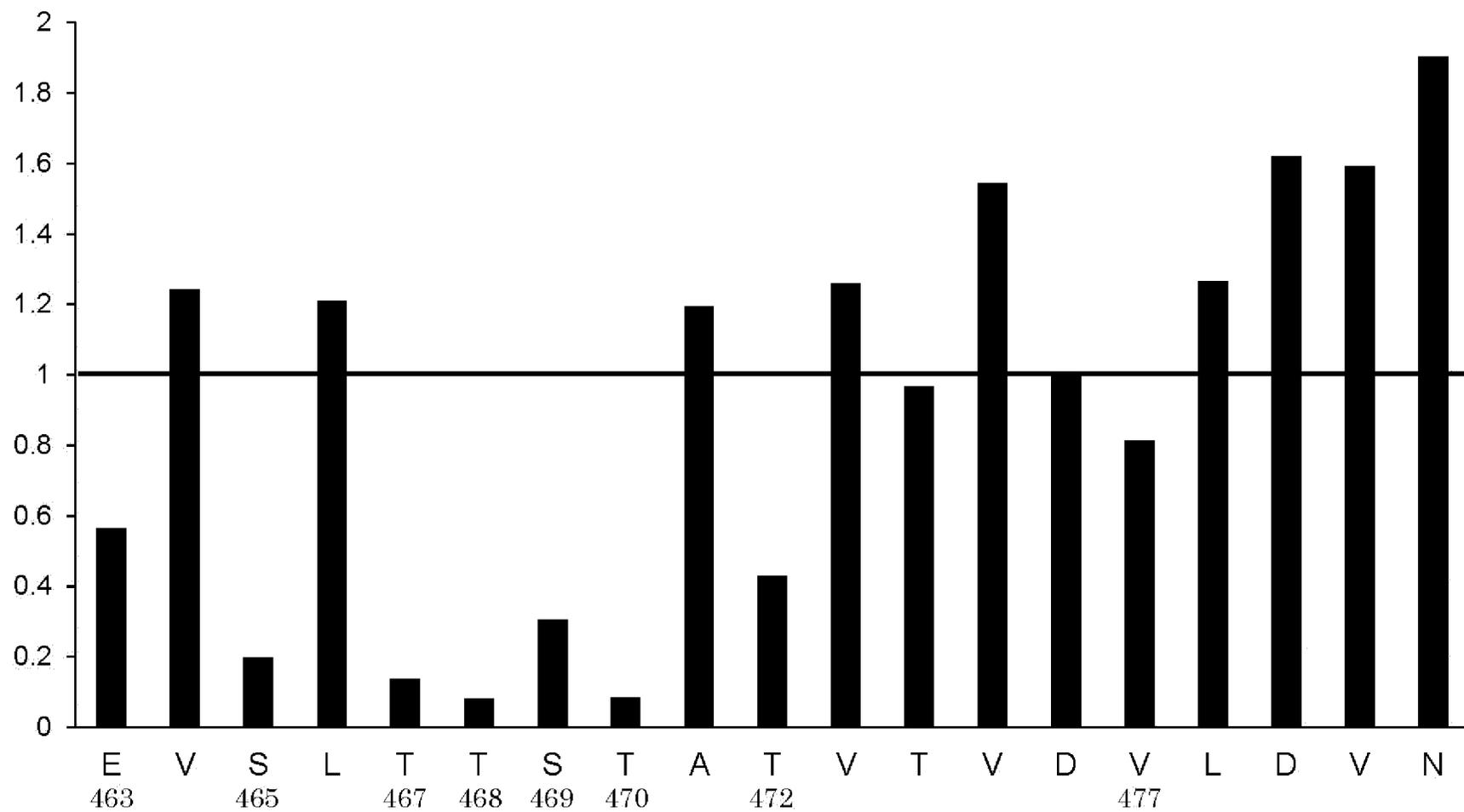
Фиг. 7С



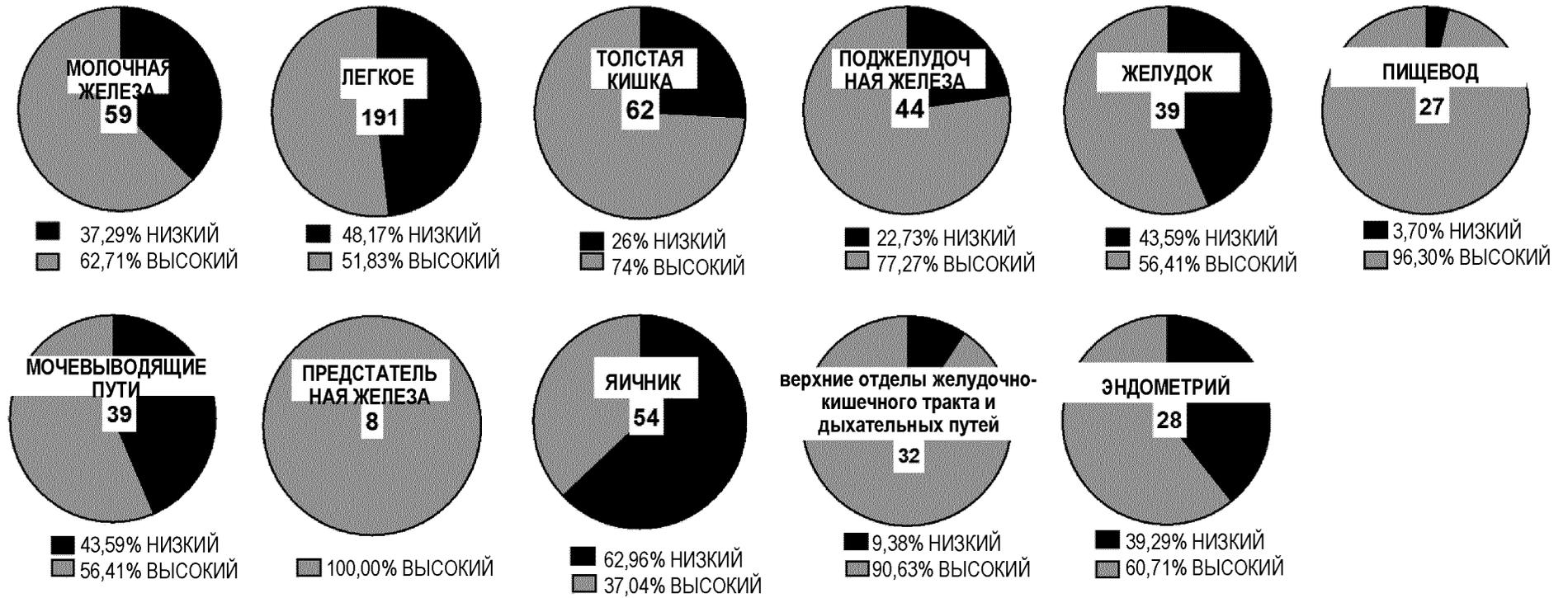
Фиг. 8А



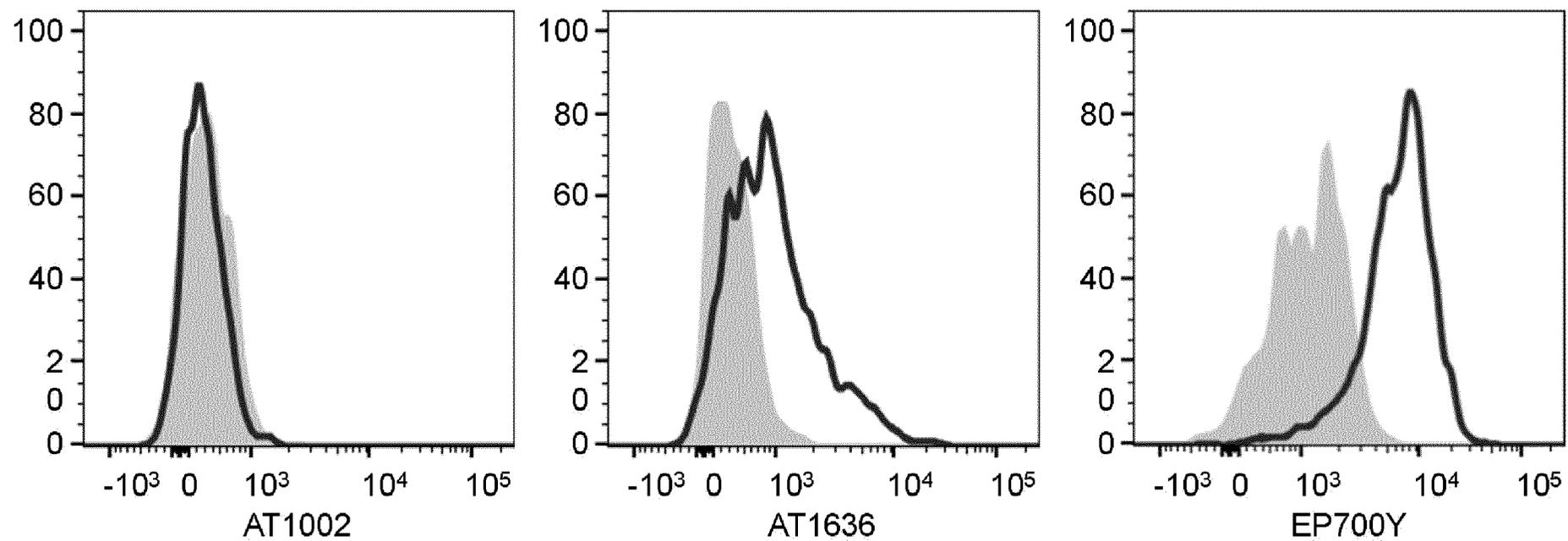
Фиг. 8В



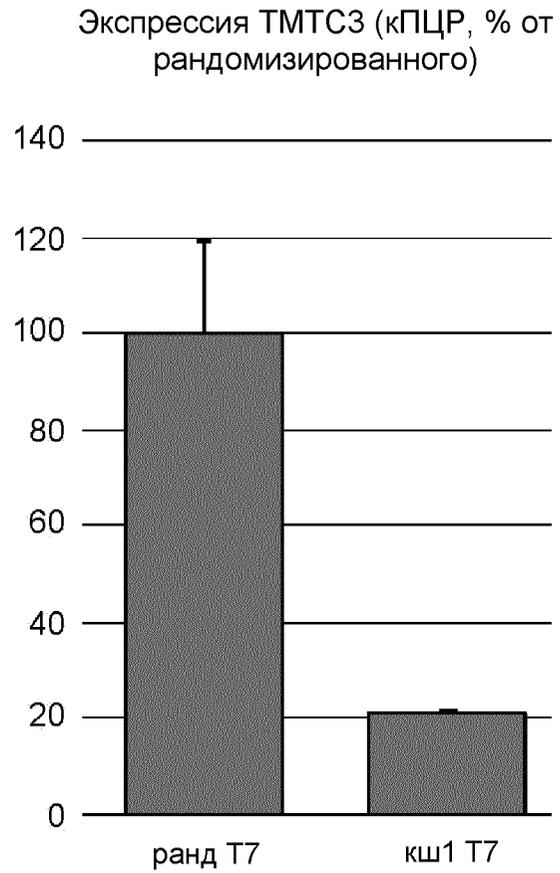
Фиг. 9



Фиг. 10

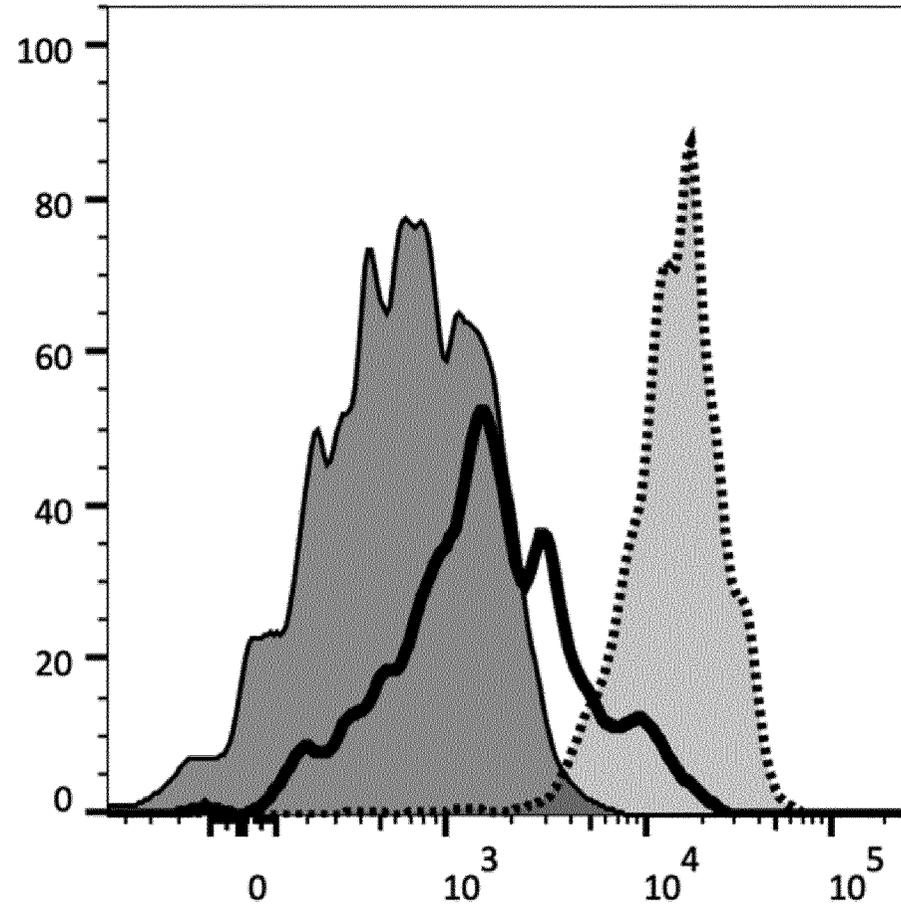


Фиг. 11



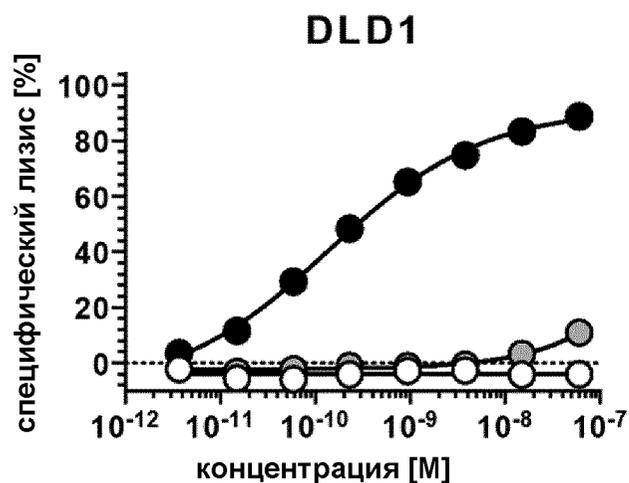
Фиг. 12

	Соединение	Среднее : APC-A
■	рандомизир-я кшРНК; контр моAb	826
▒	рандомизир-я кшРНК; АТ1636	15962
□	вектор кшРНК ТМТС3	2548





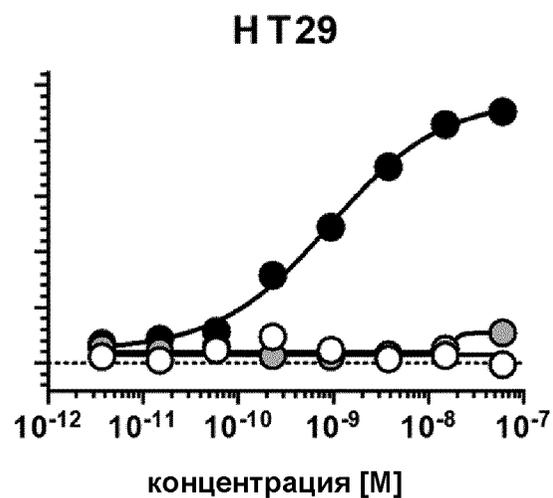
- AT1636 IYN mTCE
- AT1636 wt mTCE
- AT1002 mTCE



AT1636-IYN

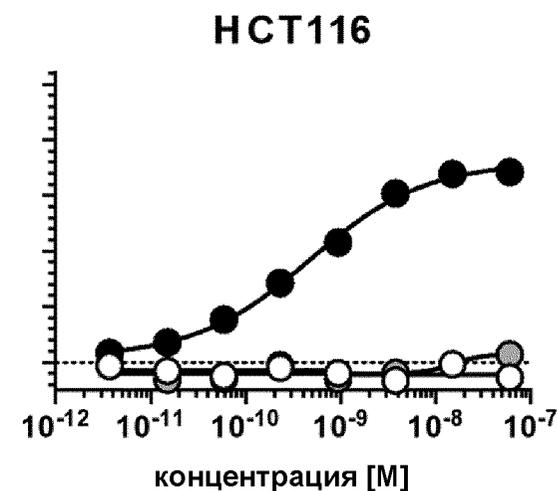
EC<sub>50</sub> 139 пМ

Макс. уничтожение:  
89%



476 пМ

Макс. уничтожение:  
69%

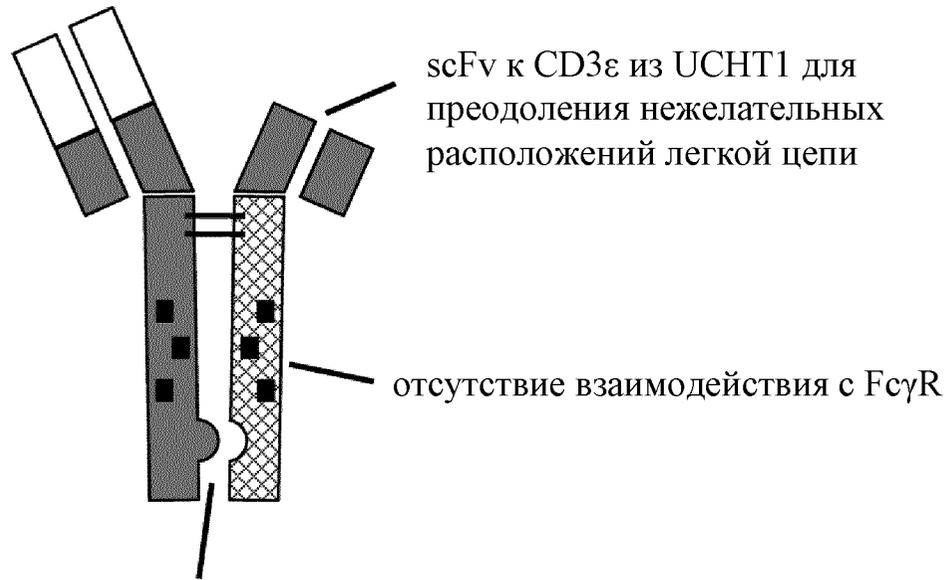


926 пМ

Макс. уничтожение:  
91%

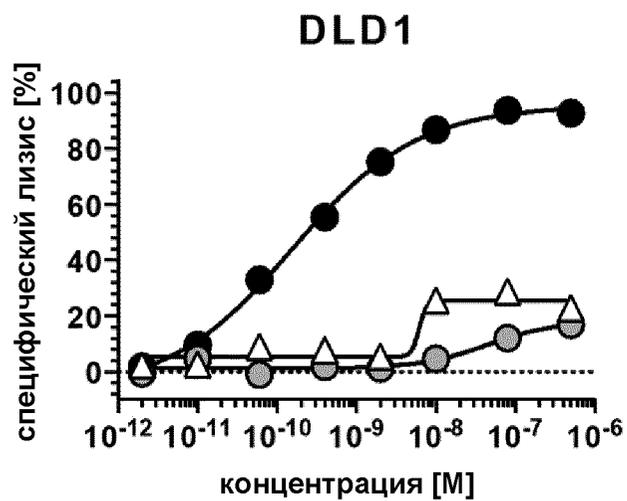
Фиг. 13В

1 + 1  
выступ-во-впадину  
1х одновалентное связывание



Мутация по типу выступ-во-впадину для способствования гетеродимеризации тяжелых цепей

Фиг. 13С

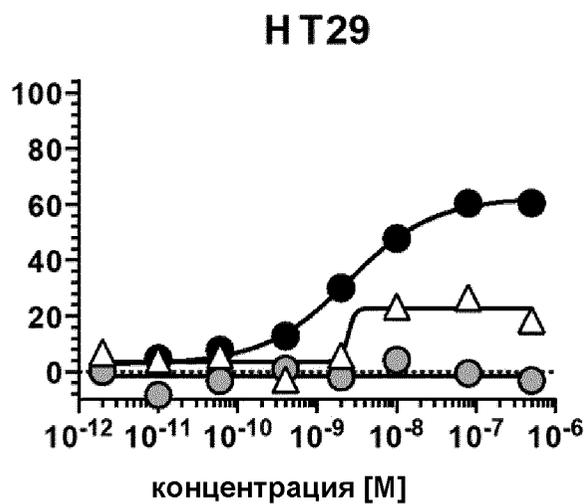


AT1636-IYN

EC<sub>50</sub> 160 пМ

Макс. уничтожение:

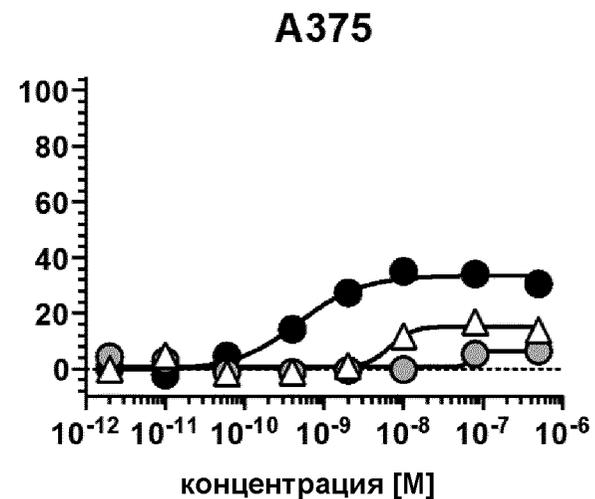
96%



2500 пМ

Макс. уничтожение:

62%

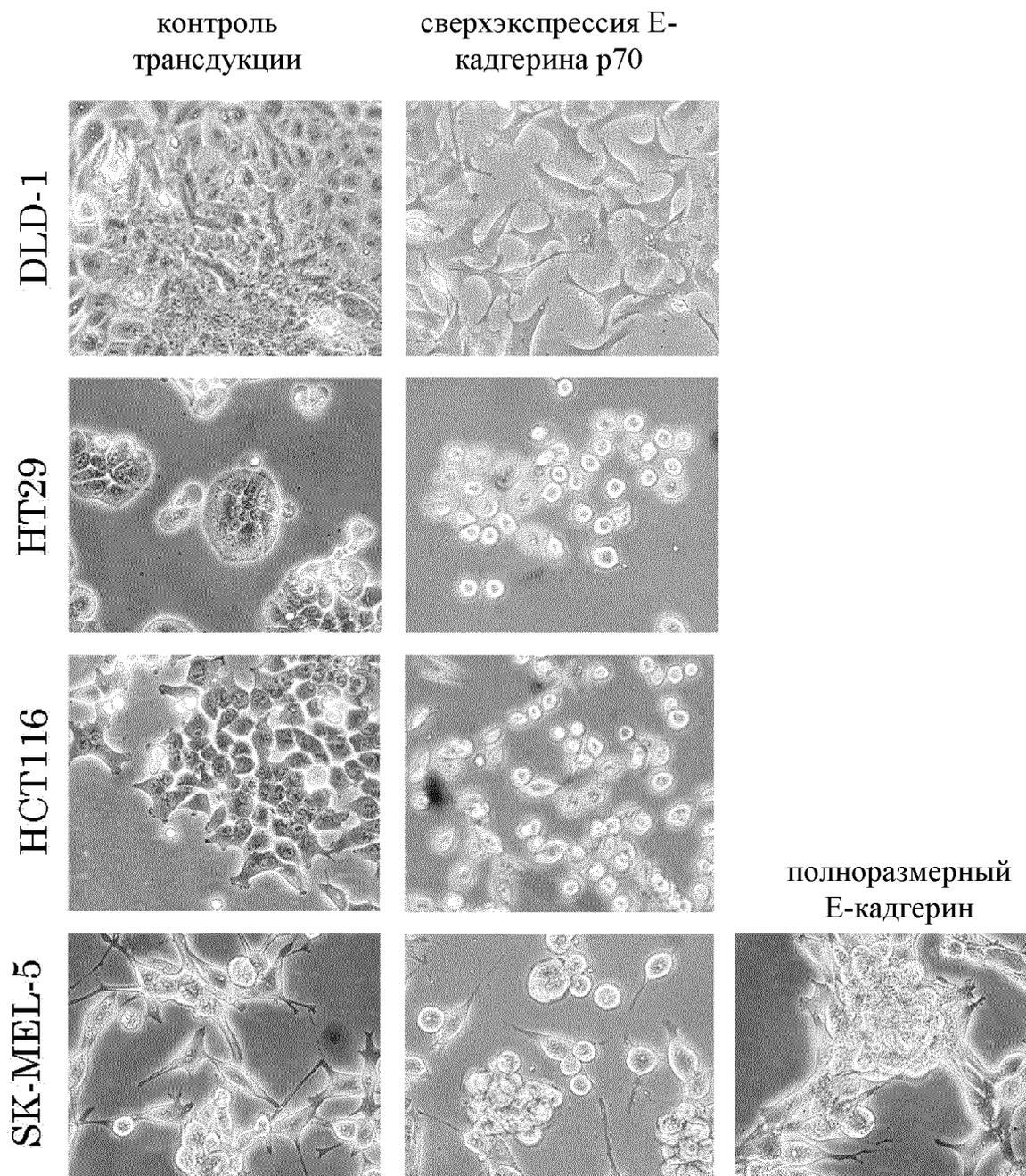


470 пМ

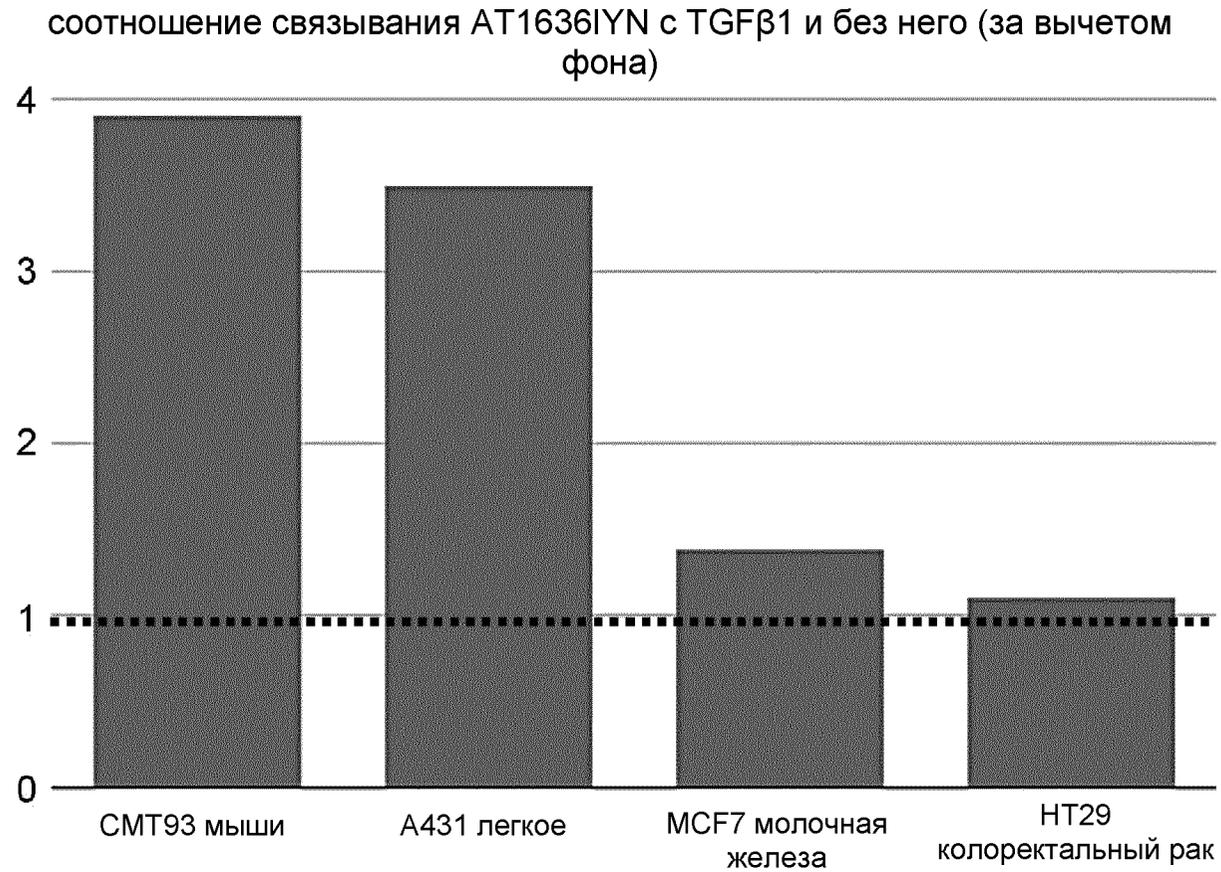
Макс. уничтожение:

34%

Фиг. 13D



Фиг. 14

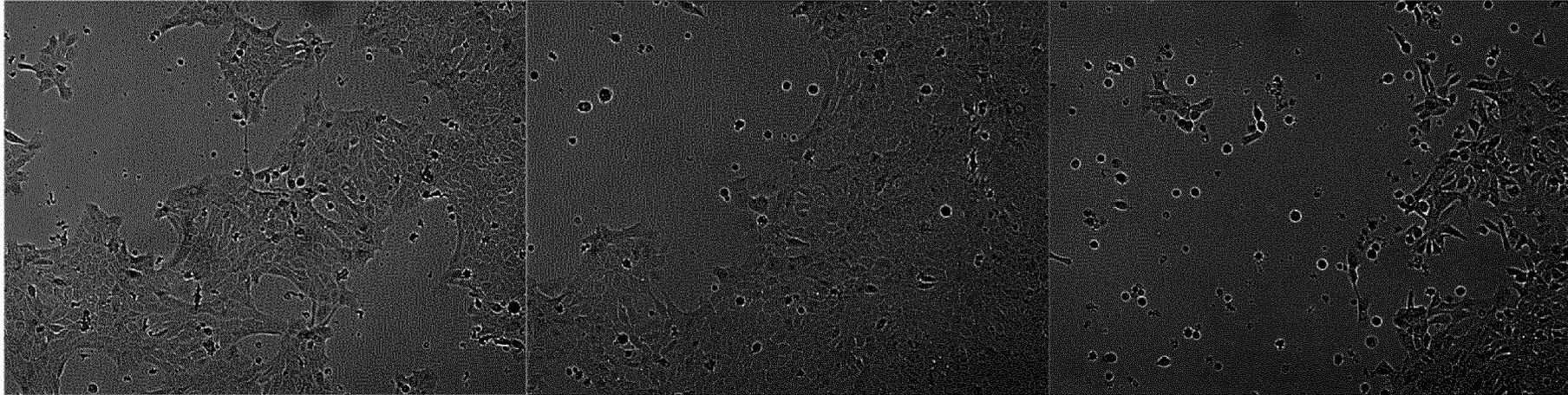


Фиг. 15

A431 d5 пластик (стандартный планшет для культивирования тканей)

A431 d5 пластик TGF $\beta$

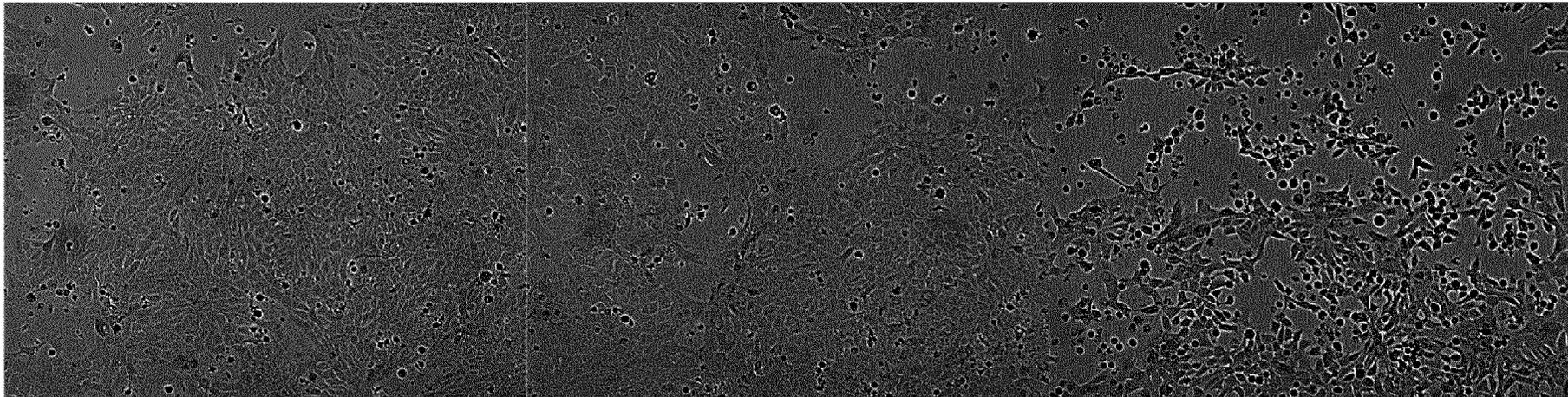
A431 d5 пластик TGF $\beta$  AT1636IYN



A431 d5 (планшет для культивирования тканей, покрытый фибронектином)

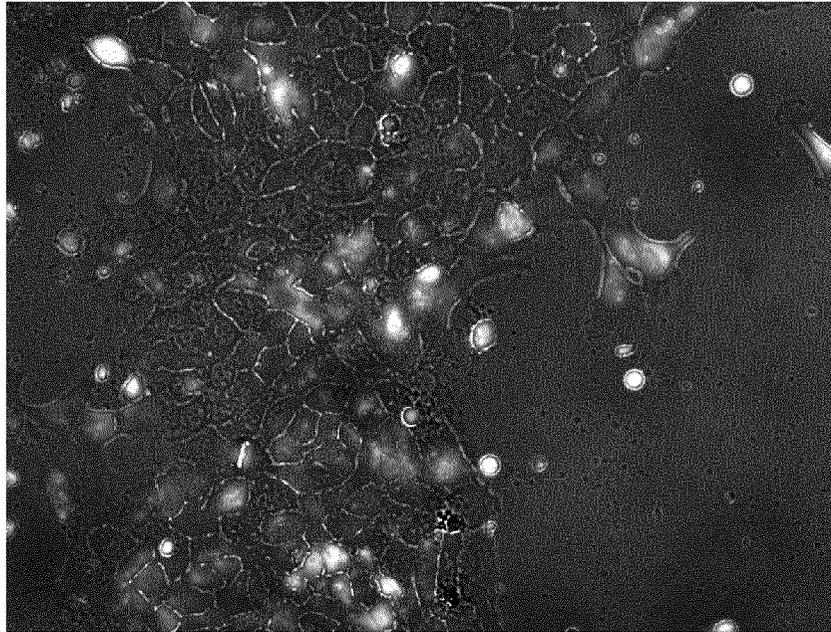
A431 d5 фибро TGF $\beta$

A431 d5 фибро TGF $\beta$  AT1636IYN

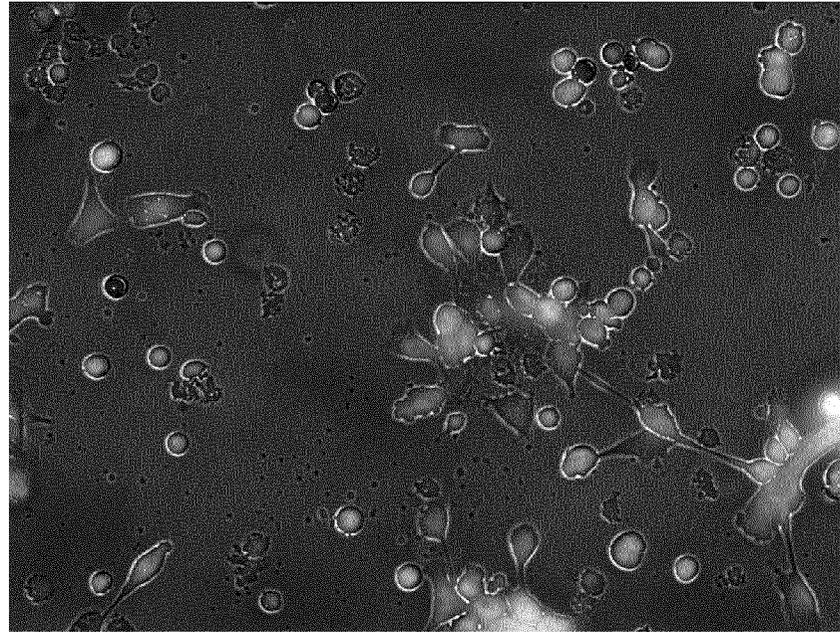


Фиг. 16А

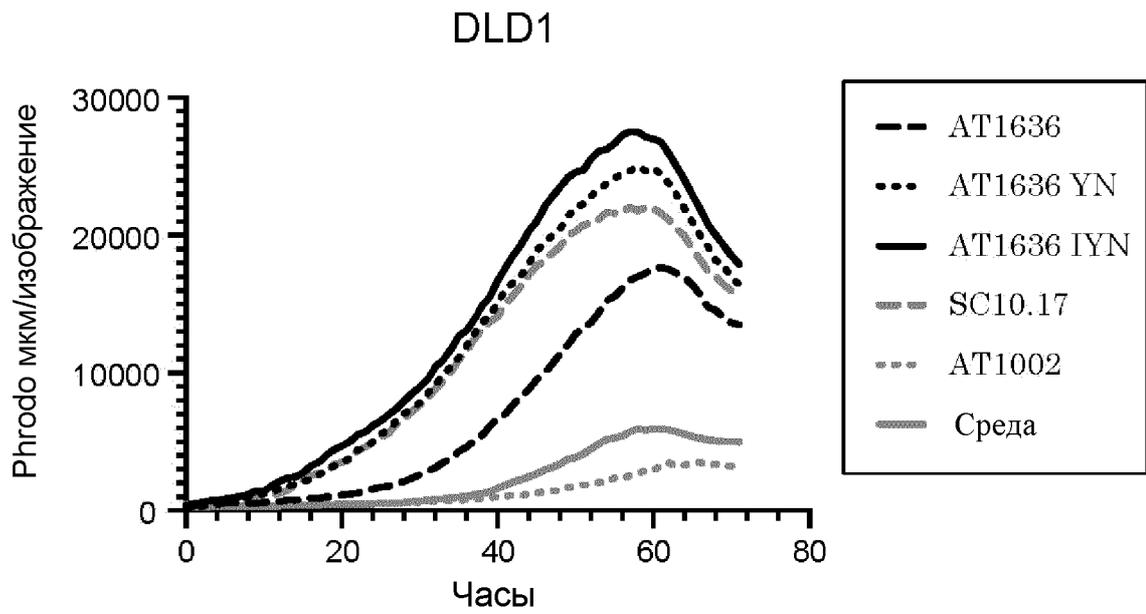
A431 d7 фибро  
TGF $\beta$



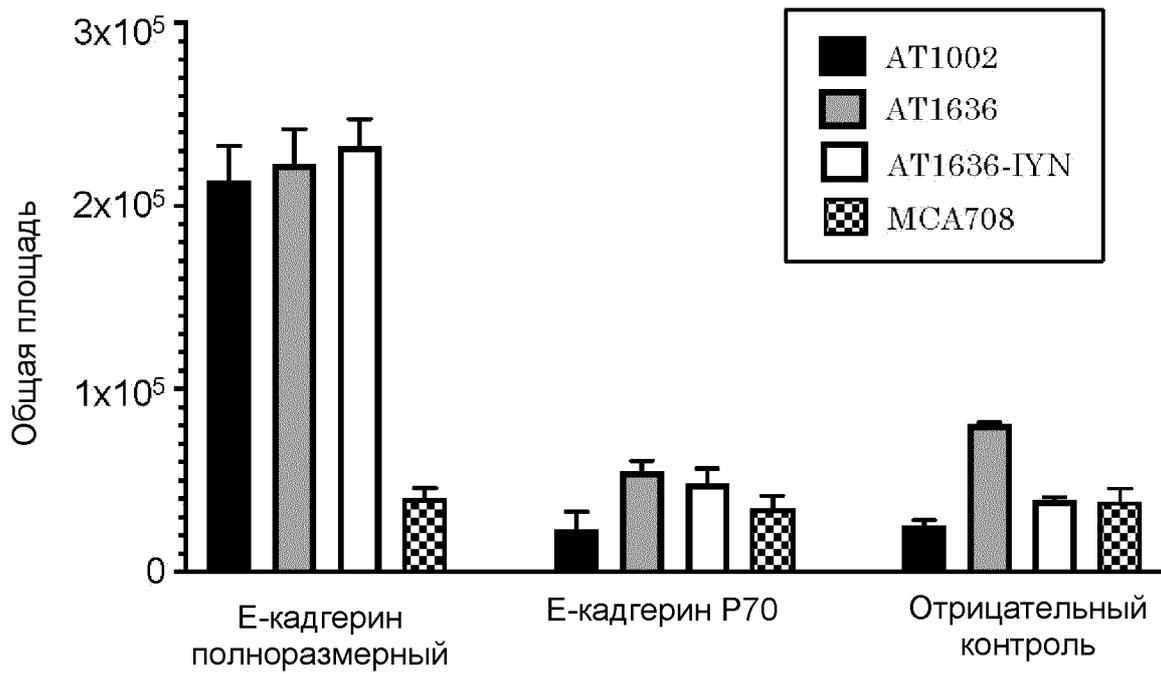
A431 d7 фибро  
TGF $\beta$  AT1636IYN



Фиг. 16В



Фиг. 17



Фиг. 18