

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292274 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.22

(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.05

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ ПРОТИВ ALPPL2 И/ИЛИ ALPP И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 10202001139U

(32) 2020.02.07

(33) SG

(86) PCT/SG2021/050061

(87) WO 2021/158178 2021.08.12

(71) Заявитель:

ЭЙДЖЕНСИ ФОР САЙЕНС,
ТЕКНОЛОДЖИ ЭНД РИСЕРЧ (SG)

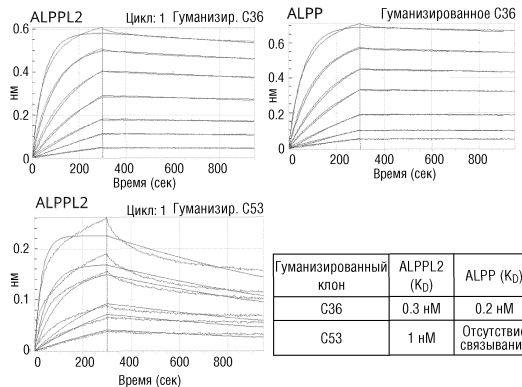
(72) Изобретатель:

Сунь Уилльям, Тань Боон Оой
Патрик, Ван Хуацзин, Яп Тай Леонг,
Хун Шинь Еэ, Ван Чэн-И, Хуан Чин-
Вэнь, Ли Шует Тенг, Вань Ках Фэй,
Нг Цзянь Дуан Джонатан (SG)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение в целом относится к области онкологии. В частности, изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, специфически связывающимся с ALPPL2 и/или ALPP, но не ALPL или ALPI. Изобретение относится к химерным молекулам и фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы, как представлено в настоящем описании. Изобретение также относится к способам снижения экспрессии или активности ALPPL2 в злокачественной клетке и способам лечения злокачественного новообразования у индивидуума.



A1

202292274

202292274

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575198EA/061

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ ПРОТИВ ALPPL2 И/ИЛИ ALPP И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение, в целом, относится к области онкологии. В частности, изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, специфически связывающимся с ALPPL2 и/или ALPP, но не ALPL или ALPI.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антитела являются привлекательными терапевтическими средствами благодаря своей способности связываться с антигенами поверхности клетки и приводить к элиминации злокачественных клеток. Клинически одобренные терапевтические средства на основе антител включают герцептин и ритуксан, являющиеся высоко успешными лекарственными средствами для лечения различных злокачественных новообразований, включая гемобластозы и солидные злокачественные новообразования. Терапевтические средства на основе антител действуют, например, рекрутируя эффекторные клетки (такие как естественные киллеры или Т-клетки) или модулируя пути передачи сигналов злокачественных клеток. Антитела также можно конъюгировать с токсинами или радиоактивными изотопами, чтобы способствовать элиминации злокачественных клеток. Для разработки успешного терапевтического средства на основе антитела необходим таргетинг антигенов поверхности клетки, предпочтительно экспрессирующихся на злокачественных клетках. Это является результатом того, что экспрессия того же поверхностного антигена на нормальных здоровых клетках может приводить к нежелательным побочным эффектам.

В целом, имеет место недостаток подходящих опухолеспецифических антигенов для таргетированной терапии антителами против злокачественных новообразований. Кроме того, это значительное препятствие для разработки эффективного терапевтического средства против таких антигенов для лечения злокачественного новообразования.

Таким образом, как правило, желательно преодолеть или улучшить одно или более из указанных выше затруднений.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, специфически связывающейся с ALPPL2 и/или ALPP, но не ALPL или ALPI, содержащей:

(a) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3; и

(b) переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3; где комбинация аминокислотных последовательностей VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 приведена в любой из строк таблицы 1.

Настоящее изобретение относится к химерной молекуле, содержащей антигенсвязывающую молекулу, как определено в настоящем описании, и гетерологичное вещество.

Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающую молекулу или химерную молекулу, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к конструкции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающую молекулу или химерную молекулу, как определено в настоящем описании, в функциональной связи с одной или более контрольными последовательностями.

Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей конструкцию, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающую молекулу или химерную молекулу, как определено в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится к способу снижения экспрессии или активности ALPPL2 в злокачественной клетке, включающий приведение злокачественной клетки в контакт с антигенсвязывающей молекулой или химерной молекулой, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу снижения или ингибирования пролиферации, выживания и жизнеспособности опухоли у индивидуума, включающему введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле или химерной молекуле, как определено в настоящем описании, для применения в лечении злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающей молекулы или химерной молекулы, как определено в настоящем описании, в производстве лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, ассоциированного с нежелательной экспрессией ALPPL2 у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к набору для детекции злокачественного новообразования, содержащему антигенсвязывающую молекулу или химерную молекулу, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу определения вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 в образце по сравнению с референсом свидетельствует о вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума.

Настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает а) детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 в образце по сравнению с референсом свидетельствует о повышенной вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума; и б) лечение индивидуума, как обнаружено, имеющего повышенную вероятность развития злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение относится к способу идентификации индивидуума, который, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2, включающему детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 свидетельствует о том, что индивидуум, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2.

Настоящее изобретение относится к способу идентификации и лечения индивидуума, который, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2, включающему а) детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 свидетельствует о том, что индивидуум, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2; и б) лечение индивидуума, который, как обнаружено, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2.

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, специфически связывающейся с ALPPL2, но не ALPL или ALPI, включающему:

- а) иммунизацию животного, предпочтительно кролика, с помощью ALPPL2,
- б) выделение из животного В-клетки, специфически связывающейся с ALPPL2, но не ALPL или ALPI, и
- с) определение аминокислотной последовательности антитела, экспрессируемого В-клеткой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны далее исключительно в качестве неограничивающих примеров со ссылкой на сопутствующие чертежи, на которых:

На фигуре 1 показано, что установлен список критериев для выбора генов-кандидатов, кодирующих белки мембраны клетки. Плацентарная щелочная фосфатаза, ALPPL2, оказалась одним из лучших кандидатов для дальнейшей валидации мишени.

На фигуре 2 показано иммуногистохимическое окрашивание линий клеток рака желудка (вверху) и микропанелей опухолей желудка (внизу).

На фигуре 3 показана идентификация ALPPL2/ALPP-специфических клонов, получаемых из супернатанта В-клеток кролика посредством ELISA и FACS (вверху), и измерения аффинности выбранных клонов с помощью интерферометрии биослоя единой концентрации (внизу).

На фигуре 4 показано сравнение между реакционной способностью ALPPL2 и реакционной способностью ALPI полученного авторами настоящего изобретения гуманизованного антитела и сравнимого гуманизованного антитела, описанного на современном уровне техники, что измеряют посредством ELISA (вверху) и поверхностного плазмонного резонанса (снизу).

На фигуре 3 показана окрашивание ИHC фиксированных формалином, погруженных в парафин (FFPE) срезов с помощью C36, C45 и C130 разных линий клеток рака желудка (A). Окрашивание ИHC FFPE-микрочипов опухолей желудка, яичника, колоректальных опухолей, опухолей поджелудочной железы, яичка, мезотелиомы и опухоли эндометрия человека с помощью C36 с разными H-баллами ИHC 1+, ИHC 2+ и ИHC 3+ (B). Окрашивание ИHC FFPE-нормальных тканей с помощью C36. Все нормальные ткани не демонстрируют окрашивания C36 (отрицательные), за исключением тканей плаценты, демонстрирующих положительное ИHC2⁺ окрашивание (C).

На фигуре 6 показана перекрестная реактивность выбранных клонов, полученных из супернатанта В-клеток кролика, относительно ортолога макака-резуса, идентифицированного посредством скрининга FACS (A). Рекомбинантные гуманизованные клоны C4 и C36 связываются с клетками CHO, гиперэкспрессирующими ортолог макака-резуса, но не CHO WT, по результатам анализа FACS (B).

На фигуре 7 показано сохранение высокой аффинности ALPP/ALPPL2 после гуманизации выбранных клонов, измеряемое с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

На фигуре 8 показано индуцирование ADCC гуманизованными клонами. Индуцирование ADCC, измеряемое в совместной культуре высокоэкспрессирующей линии клеток рака желудка MKN1 с CD16A-репортерными клетками Jurkat (верхний ряд, слева), и совместная культура низкоэкспрессирующей линии клеток рака желудка MKN74 с CD16A-репортерными клетками Jurkat (верхний ряд, справа). Потенцирование ADCC посредством C4, измеряемое с помощью анализа CellTiter-Glo, линий клеток рака желудка в совместной культуре с первичными NK-клетками (средний ряд, слева), и совместная культура линий клеток рака яичников и рака поджелудочной железы с CD16A-репортерными клетками Jurkat (средний ряд, справа). Повышение ADCC с помощью Fc-конструирования гуманизованного C4, измеряемое в совместной культуре MKN74 с CD16A-репортерными клетками Jurkat (нижний ряд).

На фигуре 9 показано уничтожение линий клеток рака желудка посредством ADC, измеряемое с помощью анализа CellTiter-Glo. Уничтожение высокоэкспрессирующих линий клеток рака желудка с помощью гуманизованных клонов посредством vc-MMAF,

конъюгированного с вторичным антителом (верхний ряд). Уничтожение линий клеток рака желудка с помощью гуманизированных С4 (средний ряд, слева) и С12 (средний ряд, справа), конъюгированных с *vc*-ММАЕ. Уничтожение линий клеток рака желудка с помощью гуманизированных С4 (нижний ряд, слева) и С12 (нижний ряд, справа) посредством *vc*-ММАЕ, конъюгированного с вторичным антителом.

На фигуре 10 показано мощное уничтожение разных линий злокачественных клеток с помощью рекрутеров Т-клеток, полученных из гуманизированных клонов, что измеряют с помощью клеточного анализа в реальном времени *xCELLigence* злокачественных клеток в совместной культуре с подвергнутыми экспансии Т-клетками человека. С4 в пиколярной концентрации последовательно демонстрировало уничтожение линий клеток рака желудка, рака яичников и рака поджелудочной железы, независимо от уровня экспрессии мишени.

На фигуре 11 показано мощное уничтожение разных линий злокачественных клеток с помощью рекрутеров Т-клеток с разными вариантами антител против CD3 в разных форматах. Гуманизированный Fab-фрагмент подходит для продукции мощных рекрутеров Т-клеток с помощью разных вариантов соединения антител против CD3 и в разных форматах.

На фигуре 12 показана реакционная способность выбранных клонов в отношении ALPPL2, но не ALPP, и мощность уничтожения злокачественных клеток этими клонами после гуманизации. При FACS наблюдали, что химеризованные С53 и С78 связываются ALPPL2, но не ALPP, в то время как С4 кролика связывается с тем, и с другим (А). При ELISA наблюдали, что химеризованные С53 и С78 связываются с ALPPL2, но не ALPP (В). Показано индуцирование ADCC химеризованными клонами, измеряемое с помощью сокультивирования MKN74 с CD16A-репортерными клетками Jurkat (С). При ELISA наблюдали, что химеризованные С53 и С78 перекрестно реагировали с клетками CHO, гиперэкспрессирующими ортолог макака-резуса, определяемый посредством FACS (D). Гуманизированное С53 демонстрировало специфичность к ALPPL2 при ELISA (E), и сокультивирование N87 с CD16A-репортерными клетками Jurkat показало, что индуцирование активности ADCC (F) сохраняется после гуманизации. Гуманизированное С53 демонстрировало аффинность связывания с ALPPL, но не ALPP, в наномлярной концентрации, определяемую посредством интерферометрии биослоя, в то время как гуманизированное С36 демонстрировало схожую аффинность связывания с ALPPL2 и ALPP (G). Гуманизированное С53 демонстрировало мощное уничтожение в клетках N87 под действием рекрутеров Т-клеток, что измеряют с помощью клеточного анализа в реальном времени *xCELLigence* клеток рака желудка N87, сокультивируемых с подвергнутыми экспансии Т-клетками человека (H). Гуманизированный рекрутер Т-клеток С53 демонстрировал уничтожение в пиколярной концентрации, схожее с рекрутером Т-клеток С36.

На фигуре 13 показан профиль связывания гуманизированных С4, С36 и С53 с другой изоформой из семейства щелочных фосфатаз человека, линиями злокачественных

клеток и нормальными иммунными клетками. Гуманизированные C4 и C36 демонстрировали связывание с ALPPL2 и ALPP человека, но не ALPL и ALPI человека, в то время как гуманизированное C53 специфически связывается с ALPPL2 человека, но не ALPP, ALPL и ALPI человека, транзиторно экспрессирующимся в клетках 293Т, по результатам анализа FACS (А). Различные дозы гуманизированных C36, C4 и C53 демонстрировали связывание с ALPPL2/ALPP-положительной линии клеток (NCI-N87), но не с отрицательной линией клеток (MIAРаса-2). Гуманизированное C53 имеет аффинность связывания, сравнимую с коммерческим антителом (кат. №: eBioScience #14-9870-82), и более слабую аффинность связывания по сравнению с гуманизированными C4 и C36 (В). Гуманизированные C36, C4 и C53 не демонстрировали связывания с наивными РВМС и активированными CD3/CD28-бусами и ИЛ-2 РВМС человека (CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки, В-клетки, CD11b⁺ миелоидные Мφ-клетки) (С). Гуманизированные C36, C4 и C53 не демонстрировали связывания с Т-клетками, В-клетками и миелоидными Мφ-клетками (D).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, специфически связывающимся ALPPL2 и/или ALPP, но не ALPL или ALPI. Антигенсвязывающие молекулы могут связываться с ALPPL2 и/или ALPP или клеткой, экспрессирующей ALPPL2 и/или ALPP, с аффинностью от приблизительно 14 пМ до приблизительно 10 нМ.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекулой, специфически связывающейся с ALPPL2 и/или, но не ALPL или ALPI, содержащей: (а) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3; и (b) переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3; где комбинация аминокислотных последовательностей VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 приведена в любой из строк в таблице 1.

Плацентарная щелочная фосфатаза 2 (ALPPL2) является членом семейства щелочных фосфатаз (AP), состоящего из двух близкородственных изоформ, экспрессирующихся в плацентарных трофобластах (ALPPL2 и ALPP), и двух широко экспрессирующихся членов ALPL (неспецифического в отношении ткани, печень/костная ткань/почка) и ALPI (кишечник). В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с ALPPL2 и/или ALPP. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с ALPPL2 человека и/или ALPP человека. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающие молекулы имеют повышенную эффективность благодаря высокой аффинности к ALPPL2 и/или ALPP.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула не имеет какого-либо детектируемого связывания с ALPL или ALPI. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула не имеет какого-либо детектируемого

связывания с ALPL человека или ALPI человека. Это также можно обозначать как детектируемое связывание с константой диссоциации (K_d) более 10 нМ, более 100 нМ, более 1 мкМ, более 10 мкМ, более 100 мкМ или более 1 мМ в отношении ALPL человека или ALPI человека. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающие молекулы имеют желаемые терапевтические окна из-за отсутствия связывания с ALPL или ALPI. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающие молекулы не индуцируют (или индуцируют минимальное) уничтожение Т-клетками нормальных клеток.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения выделяли моноклональные антитела против опухолеспецифических антигенов, плацентарных щелочных фосфатаз человека (ALPPL2) с высокой аффинностью (K_d в субнанолярном диапазоне) и специфичностью (не реагируют с близкородственными ALPL или ALPI), иммуногистохимической активностью (полезно для разработки сопутствующих диагностических средств), перекрестной реактивностью в отношении ортолога не являющегося человеком примата (полезно для токсикологических исследований). Авторы настоящего изобретения гуманизировали некоторые клоны, пересаживая определяющую комплементарность область (CDR) на каркас IgG1 человека, и наблюдали, что эти гуманизированные антитела сохраняют высокую аффинность к ALPPL2. Авторы настоящего изобретения также показали, что эти "голые" гуманизированные антитела индуцировали мощную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в анализе совместной культуры репортерных клеток Jurkat и первичных естественных киллеров (NK) с линиями клеток рака желудка. Индуцирование ADCC также наблюдали в случае линии клеток рака яичников и рака поджелудочной железы. Авторы настоящего изобретения демонстрировали пригодность использования этих гуманизированных антител в качестве конъюгатов антитело-лекарственное средство благодаря уничтожению злокачественных клеток первичными конъюгатами и во вторичном анализе. Авторы настоящего изобретения также получали биспецифические антитела посредством гетеродимеризации этих гуманизированных антител с антителами против CD3. Эти биспецифические антитела действовали как мощные рекрутеры Т-клеток (TcE) и достигали уничтожения линий клеток рака желудка, рака яичников и рака поджелудочной железы в пикомолярной концентрации (пМ). Таким образом, эти антитела можно использовать в качестве таргетированной терапии против опухолей, экспрессирующих ALPPL2 на поверхности клеток.

В таблице 1 показаны возможные комбинации CDR, которые могут присутствовать на антигенсвязывающей молекуле.

	V_H	V_L
CDR1	FTISNNYWIC (SEQ ID NO 1)	QNIDNYLS (SEQ ID NO: 4)
CDR2	WIGCIATGDGSTYY (SEQ ID NO: 2)	LLIYRASTLAS (SEQ ID NO: 5)
CDR3	RGAAGSSWTTYFDF (SEQ ID NO: 3)	QNNNGGSTFTGFP (SEQ ID NO: 6)

CDR1	FDFSSNGMC (SEQ ID NO: 7)	QSINNELS (SEQ ID NO: 10)
CDR2	WIACIYVDSSDNTNY (SEQ ID NO: 8)	LLIYGASTLES (SEQ ID NO: 11)
CDR3	RGYGYVGSAMD L (SEQ ID NO: 9)	QSAYYSSSSSYANT (SEQ ID NO: 12)
CDR1	FTISSIWIC (SEQ ID NO: 13)	ESISNLLA (SEQ ID NO: 16)
CDR2	WIACIYAGSDGGSYY (SEQ ID NO: 14)	VLIYKASALPS (SEQ ID NO: 17)
CDR3	RASNSWQYGYAGYGN YKDYFNL (SEQ ID NO: 15)	QSYYGSSDTGNT (SEQ ID NO: 18)
CDR1	FSFSSSYWIS (SEQ ID NO: 19)	QSISSYLA (SEQ ID NO: 22)
CDR2	WIACIAIGSSGTTY Y (SEQ ID NO: 20)	LLIYRASTLAS (SEQ ID NO: 23)
CDR3	RSGDGYTYVEL (SEQ ID NO: 21)	QNYYDIDDSNT (SEQ ID NO: 24)
CDR1	FSFSWIC (SEQ ID NO: 25)	QSISSWLA (SEQ ID NO: 28)
CDR2	WIACIYAGSSAKTY Y (SEQ ID NO: 26)	LLIYGTSTLAS (SEQ ID NO: 29)
CDR3	RASNYYRYGVAGYAD YTG YFNL (SEQ ID NO: 27)	QNYGGSSSGDA (SEQ ID NO: 30)
CDR1	FSFSSNYWIC (SEQ ID NO: 31)	QNIYSNLA (SEQ ID NO: 34)
CDR2	WIACIATGSSGSTYY (SEQ ID NO: 32)	LLIYGASNLES (SEQ ID NO: 35)
CDR3	RGEYTYGYVEYAI V TQYYFDL (SEQ ID NO: 33)	QSADYIGSAYNA (SEQ ID NO: 36)
CDR1	FSFSSSY YMC (SEQ ID NO: 37)	QSISSNYLA (SEQ ID NO: 40)
CDR2	WIACIYTTYGGTWY (SEQ ID NO: 38)	LLIYRASTLES (SEQ ID NO: 41)
CDR3	RSSISDVTYFNL (SEQ ID NO: 39)	QSY YDNNNYA (SEQ ID NO: 42)
CDR1	FTLSTYWVC (SEQ ID NO: 43)	QSVYNNNYLA (SEQ ID NO: 46)
CDR2	WIGCIDTVSSGD TYF (SEQ ID NO: 44)	LLIYWASKLAS (SEQ ID NO: 47)
CDR3	RRTGSGWTL (SEQ ID NO: 45)	LGAYVSN GWYFA (SEQ ID NO: 48)
CDR1	FSFSSY WTC (SEQ ID NO: 49)	ESVYNNNQLS (SEQ ID NO: 52)
CDR2	WLGCTDGGSSGD TY Y (SEQ ID NO: 50)	LLIYWASKLAS (SEQ ID NO: 53)
CDR3	RNLITWDL (SEQ ID NO: 51)	AGYKSSITDGNA (SEQ ID NO: 54)

CDR1	FDFSTNIMC (SEQ ID NO: 55)	QSIISALA (SEQ ID NO: 58)
CDR2	WIACIYAGDGSTYY (SEQ ID NO: 56)	LLIYAASLAS (SEQ ID NO: 59)
CDR3	RASTYWNYGYAGYGYYPGYFNL (SEQ ID NO: 57)	QTYAYSTKSNYGSV (SEQ ID NO: 60)
CDR1	FSFSSGYDMC (SEQ ID NO: 61)	EDIYSGLA (SEQ ID NO: 64)
CDR2	WIACIYTGDGSTYY (SEQ ID NO: 62)	LLIYKASNLAS (SEQ ID NO: 65)
CDR3	REDVSSGDYTFNL (SEQ ID NO: 63)	QQGVTYSNVDNT (SEQ ID NO: 66)
CDR1	FSFSSTYYMC (SEQ ID NO: 67)	QNIYSNLA (SEQ ID NO: 70)
CDR2	WIACIYTGSTGSTYY (SEQ ID NO: 68)	LLIFGASNLES (SEQ ID NO: 71)
CDR3	RGDYTYAYAGGAHVVTNYYFDL (SEQ ID NO: 69)	QTADYSSSTDWGA (SEQ ID NO: 72)
CDR1	FDFSSNGMC (SEQ ID NO: 73)	QSI SNELS (SEQ ID NO: 76)
CDR2	WIACIYVDSSDSTYY (SEQ ID NO: 74)	LLIYGASTLES (SEQ ID NO: 77)
CDR3	RGYGYVGSAMD L (SEQ ID NO: 75)	QSAYYSSSSSYANT (SEQ ID NO: 78)
CDR1	FTLSTYWVC (SEQ ID NO: 79)	QSVYNNNYLA (SEQ ID NO: 82)
CDR2	WIGCIDTVSSGDYF (SEQ ID NO: 80)	LLIYWASKLAS (SEQ ID NO: 83)
CDR3	RRTGSGWTL (SEQ ID NO: 81)	LGAYVSNGWYFA (SEQ ID NO: 84)
CDR1	FSFSSSYMC (SEQ ID NO: 85)	QSVFSNDYFS (SEQ ID NO: 88)
CDR2	WIACIYPDDGNTYY (SEQ ID NO: 86)	LLIYDASRLAS (SEQ ID NO: 89)
CDR3	RALAYYAYVDGGHSYAINDFDL (SEQ ID NO: 87)	QGTYYSSAWYNA (SEQ ID NO: 90)
CDR1	FDFSSNGMC (SEQ ID NO: 91)	QSI SNELS (SEQ ID NO: 94)
CDR2	WIACIYVDSSDNTNY (SEQ ID NO: 92)	LLIYGASTLES (SEQ ID NO: 95)
CDR3	RGYGYVGSAMD L (SEQ ID NO: 93)	QSAYYSSSSSYANT (SEQ ID NO: 96)
CDR1	IDFSSDYMC (SEQ ID NO: 97)	QSIGSLLA (SEQ ID NO: 100)
CDR2	WIACIYTGSSDDTY Y (SEQ ID NO: 98)	LLIYWASTLAS (SEQ ID NO: 101)
CDR3	RGGYGGKDL (SEQ ID NO: 99)	QCTYGSSGSSSYLNA (SEQ ID NO: 102)

CDR1	FDFSSNGMC (SEQ ID NO: 103)	QSIANELA (SEQ ID NO: 106)
CDR2	WIACIYVDSSDSTYY (SEQ ID NO:	LLIYGASTLES (SEQ ID NO: 107)
CDR3	104) RGYGYVGSAMD L (SEQ ID NO: 105)	QSAYYSSSSSYANT (SEQ ID NO: 108)
CDR1	FTLSTYWVC (SEQ ID NO: 109)	ESVYNNNYLS (SEQ ID NO: 112)
CDR2	WIGCIDTVSSGDTYF (SEQ ID NO:	LLIQASTLAS (SEQ ID NO: 113)
CDR3	110) RRTGSRWTL (SEQ ID NO: 111)	LGAFVSNWYFA (SEQ ID NO: 114)
CDR1	FSFSSGYNIC (SEQ ID NO: 115)	HSISKYFS (SEQ ID NO: 118)
CDR2	LIACIYTSSSGSTYY (SEQ ID NO:	LLIYEASTLAS (SEQ ID NO: 119)
CDR3	116) RGEAYYAYGYVGYAYYHGAFDP (SEQ ID NO: 117)	QSYYYGTSSSYA (SEQ ID NO: 120)
CDR1	FSFSSSYMC (SEQ ID NO: 121)	QSISSYLA (SEQ ID NO: 124)
CDR2	WIACIYAGSSGGTTY (SEQ ID NO:	LLIYRASTLAS (SEQ ID NO: 125)
CDR3	122) RAFSYYYSDGYTGYAYGL (SEQ ID NO: 123)	QGAYYSSSSSYG (SEQ ID NO: 126)
CDR1	FSFSGYDM (SEQ ID NO: 127)	QGSSLA (SEQ ID NO: 130)
CDR2	WIACIHSSSGTTY (SEQ ID NO: 128)	LLIYAASYLA (SEQ ID NO: 131)
CDR3	RDFSYTDDYISYVYATD (SEQ ID NO: 129)	QSTYYSSSTDIRA (SEQ ID NO: 132)
CDR1	FSFSSYWIC (SEQ ID NO: 133)	QIYNNLA (SEQ ID NO: 136)
CDR2	WIACIYAGSSGTYY (SEQ ID NO:	LLIYGASNLE (SEQ ID NO: 137)
CDR3	134) RAEYIDGYADYTYTTLYFDL (SEQ ID NO: 135)	QSADLTSSINV (SEQ ID NO: 138)
CDR1	FSFNSNYWMC (SEQ ID NO: 139)	ESVYNNNHLA (SEQ ID NO: 142)
CDR2	WIGCILFGNTDTYY (SEQ ID NO:	LLIYLASILDS (SEQ ID NO: 143)
CDR3	140) RSVSGVGSAWN L (SEQ ID NO: 141)	AGYKGITIDGSA (SEQ ID NO: 144)

CDR1	FDSSYYWIC (SEQ ID NO: 145)	QSVYNVNLLA (SEQ ID NO: 148)
CDR2	WIACIYGGSSGSTYY (SEQ ID NO:	LLIYETSKLES (SEQ ID NO: 149)
CDR3	146) RSLYTWRYADYAASTLNL (SEQ ID NO: 147)	AGGYSSSKDNS (SEQ ID NO: 150)
CDR1	FSFSSSYFMC (SEQ ID NO: 151)	QSISSYLS (SEQ ID NO: 154)
CDR2	WIACIYTG DGNNYY (SEQ ID NO:	LLIYRASTLAS (SEQ ID NO: 155)
CDR3	152) RGGSYAYGYAGYDYYPDAFDY (SEQ ID NO: 153)	QSYSSSSGSYG (SEQ ID NO: 156)
CDR1	FSFNSYYMC (SEQ ID NO: 157)	QNIYSNLA (SEQ ID NO: 160)
CDR2	WIACISGGSSDNTYY (SEQ ID NO:	LLIYGASNLES (SEQ ID NO: 161)
CDR3	158) RDIPRSGYFGCDL (SEQ ID NO: 159)	QSTVYNSNYANT (SEQ ID NO: 162)
CDR1	FSFSSSYWIY (SEQ ID NO: 163)	QSVYDNNWLA (SEQ ID NO: 166)
CDR2	WIACIYTASRGSIIY (SEQ ID NO:	LLIYAASTLSS (SEQ ID NO: 167)
CDR3	164) RGPDYTYGYIGDALTRLDL (SEQ ID NO: 165)	AGGYSSTSDIEDNT (SEQ ID NO: 168)
CDR1	FSFSSSYWIC (SEQ ID NO: 169)	ESINSWLA (SEQ ID NO: 172)
CDR2	WIACIYAGSSGDTYY (SEQ ID NO:	LLIYSASTLAS (SEQ ID NO: 173)
CDR3	170) RAEYIDGYADYTYTTLYYFDL (SEQ ID NO: 171)	QSYYSFSRFA (SEQ ID NO: 174)
CDR1	FSFSSGYWIC (SEQ ID NO: 175)	QSI SNALA (SEQ ID NO: 178)
CDR2	WIACIYTG VGATYY (SEQ ID NO:	LLIYSASTLES (SEQ ID NO: 179)
CDR3	176) RDFGGSSGFYFNL (SEQ ID NO: 177)	QNYYGSTSSSYGVA (SEQ ID NO: 180)
CDR1	FSFSSSYYMC (SEQ ID NO: 181)	ESIYSNLA (SEQ ID NO: 184)
CDR2	WIACIYAGSTFSTYY (SEQ ID NO:	LLIYLASTLAS (SEQ ID NO: 185)
CDR3	182) RSDSYTYGYAGYAYAIFNL (SEQ ID NO: 183)	QSAYYSSSADIA (SEQ ID NO: 186)

CDR1	LDFSSSYWIC (SEQ ID NO: 187)	QNIYNNLA (SEQ ID NO: 190)
CDR2	WIGCIKTATETTVY (SEQ ID NO:	LLIYGASNLES (SEQ ID NO: 191)
CDR3	188) KTYADNGGYINL (SEQ ID NO: 189)	QSADLTSSINV (SEQ ID NO: 192)
CDR1	FSFSSSYWIC (SEQ ID NO: 193)	QSVYDNNWLA (SEQ ID NO: 196)
CDR2	WIACIYTASRDSIYY (SEQ ID NO:	LLIYEASKLAS (SEQ ID NO: 197)
CDR3	194) RGPYYSYAYIGDALTRLDL (SEQ ID NO: 195)	AGGYSSSSDIEDNT (SEQ ID NO: 198)
CDR1	FSFNSNYMC (SEQ ID NO: 199)	QSVYNNNNLA (SEQ ID NO: 202)
CDR2	WIACIYTGIVVPTY (SEQ ID NO:	LLIYSASSLAS (SEQ ID NO: 203)
CDR3	200) RDPYVGSSYIYNL (SEQ ID NO: 201)	AGYKTYSNNENA (SEQ ID NO: 204)
CDR1	FSFSSSYMC (SEQ ID NO: 205)	ENIYSNLAW (SEQ ID NO: 208)
CDR2	WIACIYAGSSSSTYY (SEQ ID NO:	LLIYGASNLES (SEQ ID NO: 209)
CDR3	206) RAGYIDSYVDYTYAAWYYFDL (SEQ ID NO: 207)	QSADLSSSINV (SEQ ID NO: 210)
CDR1	FSFSSSYMC (SEQ ID NO: 303)	ESIYNNNNLG (SEQ ID NO: 306)
CDR2	WIGCIYTGNDTWTY (SEQ ID NO:	LLIYWASTLAS (SEQ ID NO: 307)
CDR3	304) RGLSPIDL (SEQ ID NO: 305)	AGYKSRTTDGSAF (SEQ ID NO: 308)
CDR1	FSFSSGYDMC (SEQ ID NO: 309)	QSIGSSLA (SEQ ID NO: 312)
CDR2	WIACIHSSSGTTY (SEQ ID NO: 310)	LLIYAASYLAS (SEQ ID NO: 313)
CDR3	RDFSYTDDYISYVYATDL (SEQ ID NO: 311)	QSTYYSSSTDIRA (SEQ ID NO: 314)

В таблице 2 показаны комбинации последовательностей V_H и V_L (CDR1, 2 и 3 подчеркнуты) в антигенсвязывающей молекуле, полученные из 36 клонов антител.

ID клона	V _H	V _L
AB1C4	QSLEESGGDLVKPGPSLTLTCKAS <u>GFTISNNYWICWVRQAPGKGLEWI</u> <u>GCIATGDGSTYYASWAKGRFTISK</u> TSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA <u>RGAAGSSWTTYFDWFPGTPVTV</u> SS (SEQ ID NO: 211)	DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC QAGQNIDNYLSWYQQKPGQPPK <u>LLIYRASTLASGVPSRFKGS</u> <u>SGT EFTLTISDLECADAAATYYCQNNN</u> <u>GGSTFTGFPFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 212)

AB1C10	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS</u> <u>GFDSSNGMCWVRQAPGKGLEWI</u> <u>ACIYVDSSDNTNYASWVNGRFTIS</u> <u>RTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC</u> <u>ARGYGYVGSAMDLWGQGLTVTV</u> SS (SEQ ID NO: 213) </p>	<p> DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC QASQSINNELSWYQQKPGQRPKL LIYGASTLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISDLECADAATYYCQSAYY SSSSYANTFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 214) </p>
AB1C11	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCKAS</u> <u>GFTISSIWICWVRQAPGKGLEWIAC</u> <u>IYAGSDGGSYYASWARGRFTISK</u> <u>SSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR</u> <u>ASNSWQYGYAGYGNYKDYFNLW</u> GPGTLTVVSS (SEQ ID NO: 215) </p>	<p> FELTQTPSSVEAVVGGTVTINCQA SESISNLLAWYQQKSGQPPKVLII KASALPSGVSSRFKSGSGSGTEFTL TISDLECADAATYYCQSYYGSSD TGNTFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 216) </p>
AB1C12	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS</u> <u>GFSFSSSYWISWVRQAPGKGLEWI</u> <u>ACIAIGSSGTTYASWAKGRFTISK</u> <u>TSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA</u> <u>RSGDGYTYVELWGPGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 217) </p>	<p> DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKC QASQSISSYLAWYQQKPGQPPKL LIYRASTLASGVPSRFRKSGSGGTQ FTLTISDLECADAATYYCQNYIDI DDSDNTFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 218) </p>
AB1C13	<p> QEQLLEESGGDLVKPEGLTLTCTA SGFSFSWICWVRQAPGKGLEWIAC IYAGSSAKTYASWAKGRFTISKA SSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR ASNYRYGVAGYADYTYGYFNLW GPGTLTVVSS (SEQ ID NO: 219) </p>	<p> FELTQTPASVEAAVGGTVTIKCQ ASQSISSWLAWYHQKPGQRPKLL IYGTSTLASGVPSRFRKSGSGGTEF TLTISDLECADAATYYCQNYGGS SSGDAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 220) </p>
AB1C14	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS</u> <u>GFSFSSNYWICWVRQAPGKGLEWI</u> <u>ACIATGSSGSTYYASWAKGRFTISK</u> <u>TSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA</u> <u>RGEYTYGYVEYAIVTQYYFDLWG</u> PGTLTVVSS (SEQ ID NO: 221) </p>	<p> FEMTQTPSSVSAVGGTVTINCQ ASQNIYSNLAWYQQKPGQRPKLL IYGASNLESGVPSRFRKSGSGGTEY TLTISDLECDDAATYYCQSADYIG SAYNAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 222) </p>

AB1C15	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS <u>GFSFSSSYMCWVRQAPGKGLEWI</u> <u>ACIYTTYGGTWYASWAKGRFTISK</u> TSSTTVTLQMTSLTDADTATYFCA <u>RSSISDVTYFNLWGPGLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 223)</p>	<p>DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC QASQISNYLAWYQQKPGQPPEL <u>LIYRASTLESGVPSRFRKSGSGTG</u> FTLTISDLECADAATYYCQSYD <u>NNNYAFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 224)</p>
AB1C17	<p>QEQLKESGGDLVKPGASLTLTCTA SGFTLSTYWVCWVRQAPGKGLEW <u>IGCIDTVSSGDTYFASWAKGRFTGS</u> KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC <u>ARRTGSGWTLWGPGLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 225)</p>	<p>LVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQ SSQSVYNNNYLAWFQQNPGQPP <u>KLLIYWASKLASGVPSRFRKSGS</u> GTQFTLTISDVQCDDAATYYCLG <u>AYVSNGWYFAFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 226)</p>
AB1C18	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS <u>GFSFSSYWTCWVRQAPGKGLEWL</u> <u>GCTDGGSSGDTYYATWAKGRVAI</u> SKTSSTTVTLQVTSLSLAADTATYFC <u>ARNLITWDLWGPGLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 227)</p>	<p>IVMTQTPSSKSVVPGDVTINCQA <u>SESVYNNNQLSWFQQKPGQPPKL</u> <u>LIYWASKLASGVPSRFRKSGSGT</u> QFTLTISDVVCDDAATYYCAGYK <u>SSITDGNAFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 228)</p>
AB1C19	<p>QSLEESGGDLVQPEGSLTLTCKAS <u>GFDSTNIMCWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CIYAGDGSTYYASWVNGRFTISK</u> SSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>ASTYWNYGYAGYGYPGYFNLW</u> GPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 229)</p>	<p>DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC QASQSIISALAWYQQKPGQPPKLL <u>IYAASTLASGVPSRFRKSGSGTQF</u> TLTISDLECADAATYYCQTYAYS <u>TKSNYGSVFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 230)</p>
AB1C21	<p>QQQLVESGGGLVKPGASLTLTCKA SGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLE <u>WIACIYTGDGSTYYASWARGRFTI</u> SKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF <u>CAREDVSSGDYTFNLWGPGLVT</u> VSS (SEQ ID NO: 231)</p>	<p>YDMTQTPASVEVTVGGTVTIKCQ <u>ASEDIYSGLAWYQQKPGQRPKLL</u> <u>IYKASNLASGVPSRFRSGSGSGTEF</u> TLTISGVECADAATYYCQQGVTY <u>SNVDNTFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 232)</p>

AB1C23	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS</u> <u>GFSFSSTYYMCWVRQAPGKGLEW</u> <u>IACIYTGSTGSTYYASWAKGRFTG</u> <u>SKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF</u> <u>CARGDYTYAYAGGAHVNTNYYFDL</u> <u>WGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 233)</u> </p>	<p> <u>LVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQ</u> <u>ASQNIYSNLAWYQQKPGQRPKLL</u> <u>IFGASNLESGVPSRFKSGSGTEF</u> <u>TLTISDLECDAAATYYCQTADYS</u> <u>SSTDWGAFFGGGTEVVVK (SEQ ID</u> <u>NO: 234)</u> </p>
AB1C25	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS</u> <u>GDFSSNGMCWVRQAPGKGLEWI</u> <u>ACIYVDSSDSTYYASWVNGRFTIS</u> <u>RTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC</u> <u>ARGYGYVGSAMD_LWGQGLVTV</u> <u>SS (SEQ ID NO: 235)</u> </p>	<p> <u>DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC</u> <u>QASQISISNELSWYQQKPGQRPKL</u> <u>LIYGASTLESGVPSRFSGSGSGTE</u> <u>FLLTISDLECADAATYYCQSAYY</u> <u>SSSSYANTFFGGGTEVVAA (SEQ</u> <u>ID NO: 236)</u> </p>
AB1C28	<p> <u>QEQLKESGGDLVKPGASLTLTCTA</u> <u>SGFTLSTYWVCWVRQAPGKGLEW</u> <u>IGCIDTVSSGDTYFASWAKGRFTGS</u> <u>KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC</u> <u>ARRTGSGWTLWGPGTLVTVSS</u> <u>(SEQ ID NO: 237)</u> </p>	<p> <u>LVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQ</u> <u>SSQSVYNNNYLAWFQQNPGQPP</u> <u>KLLIYWASKLASGVPSRFKSGSGS</u> <u>GTQFTLTISDVQCDDAATYYCLG</u> <u>AYVSNGWYFAFGGGIEVVVK</u> <u>(SEQ ID NO: 238)</u> </p>
AB1C29	<p> <u>QEHLEESGGGLVKPEGLTLTCTA</u> <u>SGFSFSSSYMCWVRQAPGKGLE</u> <u>WIACIYPDDGNTYYASWAKGRFTI</u> <u>SKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF</u> <u>CARALAYYAYVDGGHSYAINDFD</u> <u>LWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 239)</u> </p>	<p> <u>QVLTQTPSSVSAAVGGTVTINCQ</u> <u>SSQSVFSNDYFSWYQQKPGQPPK</u> <u>LLIYDASRLASGVPSRFKSGSGT</u> <u>QFTLTISGVQCDDAATYYCQGTY</u> <u>YSSAWYNAFFGGGTEVVVK (SEQ</u> <u>ID NO: 240)</u> </p>
AB1C31	<p> <u>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS</u> <u>GDFSSNGMCWVRQAPGKGLEWI</u> <u>ACIYVDSSDNTNYASWVNGRFTIS</u> <u>RTSSTTVDLKMTSLTAADTATYFC</u> <u>ARGYGYVGSAMD_LWGQGLVTV</u> <u>SS (SEQ ID NO: 241)</u> </p>	<p> <u>DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC</u> <u>QASQISISNELSWYQQKPGQRPKL</u> <u>LIYGASTLESGVPSRFSGSGSGTE</u> <u>FLLTISDLECADAATYYCQSAYY</u> <u>SSSSYANTFFGGGTEVVVK (SEQ</u> <u>ID NO: 242)</u> </p>

AB1C32	QEQLLEESGGDLVKPGGTLTLTCKA SGIDFSSDYMCWVRQAPGKGLE WIACIYTGSSDDTY ^Y ASWAKGRFT ISKTSSTVTLQMTSLTAADTATYF CARGGYGGKDLWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 243)	VVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQ ASQSIGSL ^L LAWYQQKPGQPPN ^L LI YWASTLASGVPSRFKGS ^G SGTEF TLTISDLECD ^A AATYYCQCTYGS SGSSSYLNAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 244)
AB1C34	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFDFSSNGMCWVRQAPGKGLEW ^I ACIYVDSSDSTY ^Y ASWVNGRFTIS KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC ARGYGYVGSAMD ^L WGQGT ^L VTV SS (SEQ ID NO: 245)	NIVMTQTPSPVSGAVGGTVTIKC QASQ ^S ISNELAWFQQKPGQRPK ^L LIYGASTLES ^G VPSRFSGSGSGTE FTLTISDLECAD ^A AATYYCQ ^S AYY SSSSYANTFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 246)
AB1C35	QEQLKESGGDLVKPGASLTLTCTA SGFTLSTYWVCWVRQAPGKGLEW ^I IGCIDTVSSGD ^T YFASWAKGRFTGS KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC ARRTGSRW ^T LWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 247)	QVLTQTPSSVSAGVGGTVTINCQ ASESVYNN ^N YLSWYQQKPGQPP KLLIYQASTLASGVPSRFKGS ^G SG TQFTLTISDVQCDD ^A AATYYC ^L GA FVSNGWYFAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 248)
AB1C36	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSFSSGYNICWVRQAPGKGLEL ^I A CIYTSSSGSTY ^Y ASWAKGRFTISK ^T SSTTVTLQMTSLTVADTATYFCAR ^R GEAYYAYGYVGYAYYHGAFDPW GPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 249)	DIVMTQTPASVEAGVGGTVTIKC QASHSISKYFSWYQQKIGQPPK ^L L IYEASTLASGVPSRFKGS ^G SGTQF TLTISDLECAD ^A AATYYCQ ^S YYYYG TSSSYAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 250)
AB1C39	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSFSSSYMCWVRQAPGKGLEW ^I ACIYAGSSGGTY ^Y ASWAKGRFTIS KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC ARAFSY ^Y YSDGYTGYAYGLWGPG TLVTVSS (SEQ ID NO: 251)	DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC QASQ ^S ISSYLAWYQQKPGQPPK ^L LIYRASTLASGVPSRFKGS ^G SGTQ FTLTISDLECAD ^A AATYYCQ ^G AYY SSSSYGFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 252)

AB1C45	<p>QERLEESGGGLVQPEGSLTLTCTAS <u>GFSFSSSYMCWVRQAPGKGM EW</u> IGCIYTGNDDTWYASWAKGRFTVS KTSSTTVTLQMTSLTATDTATYFC <u>ARGLSPIDLWPGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 315)</p>	<p>IVMTQTPSSKSVVPGDVTINCQA <u>SESIYNNNNLWYQQKPGQPPKL</u> LIYWASTLASGVPSRFKGS GSGT QFTLTISDVECDAAATYYC<u>AGYK</u> <u>SRTTDGSAFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 316)</p>
AB2C53	<p>QEQLVESGGGLVQPEGSLTLTCTA SGFSFSGYDMCWVRQAPGKGLEW <u>IACIHSSSGTYIANWAKGRFTISK</u> SSTTVTLQMTSLAADTATYFC<u>ARD</u> <u>FSYTDDYISYVYATDWGPGTLVT</u> SS (SEQ ID NO: 253)</p>	<p>AIEMTQTPASVSAAVGGTVTIKC QAS<u>QGSSLA</u>WYQQKPGQPP<u>LLI</u> <u>YAASYLASVPSRFKGS</u>GSGTEYT LTISGVQCADAAYYC<u>QSTYYSSS</u> <u>TDIRAFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 254)</p>
AB2C78	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS <u>GFSFSSYWICWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CIYAGSSGTYIASWAKGRFTISK</u> SSTTVTLQTTSLAADTATYFC<u>ARAE</u> <u>YIDGYADYTYTTLYFDLWGP</u> TVSS (SEQ ID NO: 255)</p>	<p>ALVMTQTPSSVSAAVGGTVTINC QASQIYNNLAWYQQKPGQR<u>PKL</u> <u>LIYGASNLEGVPSRFKGS</u>GSGTEY TLTISDLECDAAAYYC<u>QSADLTSS</u> <u>INVFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 256)</p>
AB2C102	<p>QQQLEESGGDLVQPGASLTLTCTA SGFSFN SNYWMCWGRQAPGKGLE <u>WIGCILFGNTDTYYANWAKGRFTI</u> SKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF CARSVSGVGSANLWGP<u>TLVTV</u> SS (SEQ ID NO: 257)</p>	<p>IVMTQTPSSKSVVPGDVTINCQA SESVYNNNHLAWYQQKPGQSPK <u>LLIYLASILDSGVPSRFKGS</u>GSGT QFTLTISDVVCDAAATYYC<u>AGYK</u> <u>GITIDGSAFGGGTELVVK</u> (SEQ ID NO: 258)</p>
AB2C103	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFDFSSYYWICWVRQAPGKGLEW<u>I</u> <u>ACIYGGSSGSTYYATWAKGRFTIS</u> ETSSTTVTLQMTSLTAADMATYFC <u>ARSLYTWRYADYAASTLNLWGP</u> TLVTVSS (SEQ ID NO: 259)</p>	<p>AVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQS SQSVYNVNLLAWYQQKPGQPPK <u>LLIYETSKLESGVPSRFSGSGSGT</u> QFTLTISDVQCDDAAATYYC<u>AGGY</u> <u>SSSKDNSFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 260)</p>

AB2C124	QEQLVESGGGLVQPEGSLTLTCTA SGFSFSSSYFMCWVRQAPGKGLE WIACIYTGDNYYASWAKGRFTI SKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF CSRGGSYAYGYAGDYYPDAFD YWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 261)	DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKC QASQSISSYLSWYQQKPGQPPKL LIYRASTLASGVPSRFKGSSTGTQ FTLTISDLECADAATYYCQSYYY SSSGSYGFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 262)
AB2C127	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSFNSYMCWVRQAPGKGLEWI ACISGGSSDNTYYASWAKGRFTTS KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC ARDIPRSGYFGCDLWGPGLTVTS S (SEQ ID NO: 263)	VVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQ ASQNIYSNLAWYQQKPGQRPKLL IYGASNLESGVPSRFKGSSTGTEY TLTISNLECADAATYYCQSTVYN SNYANTFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 264)
AB2C128	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSFSSSYWIYWVRQAPGKGLEWI ACIYTASRGSIIYASWTKGRFTISK TSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA RGPDYTYGYIGDALTRLDLWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 265)	AVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQS SQSVYDNNWLAWYQQKAGQPP KLLIYAASLSSGVPSRFKGSSTG IEFTLTISDVQCDDAATYYCAGG YSSTSDIEDNTFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 266)
AB2C129	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWI ACIYAGSSGDTYYASWAKGRFTIS KTSSTTVTLQTSLTAADTATYFC ARAHEYIDGYADYTYTTLYYFDLW GPGTPVTVSS (SEQ ID NO: 267)	DVVMTQTPASVSEPVGGTVTINC QASESINSWLAWYQQKPGQPPKL LIYASTLASGVPSRFKGSSTGIEF TLTISDLECADAATYFCQSYYSFS RFAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 268)
AB2C130	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSFSSGYWICWVRQAPGKGLEWI ACIYTGVGATYYASWAKGRFTISK TSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA RDFGGSSGFYFNLWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 269)	FELTQTPSSVEAAVGATVTIKCQA SQSISNALAWYQQKPGQPPKLLIY SASTLESGVPSRFKGSSTGTEFTL TISDLECADAATYYCQNYYGSTS SSYGVAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 270)

AB2C131	<p>QSLEESGGGLVQPEGSLTLTCTASG <u>FSFSSSYMCWVRQAPGKGLEWIA</u> CIYAGSTFSTYYASWAKGRFTISK SSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>SDSYTYGYAGYAYAIFNLWGPG</u> TLVTVSS (SEQ ID NO: 271)</p>	<p>LVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQ <u>ASESIYSNLAWYQQKPGQPPKLLI</u> YLASTLASGVPSRFRKGS GSGTEFT LTISDLECADAAATYYCQSA <u>YSSS</u> <u>ADIAFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO: 272)</p>
AB2C133	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GLDFSSSYWICWVRQAPGKGLEW <u>I</u> GCIKTATETTVYASWAKGRFTISK TSSTTVTLQMTSLTAADTATYLCA <u>KTYADNGGYINLWGPGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 273)</p>	<p>LVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQ ASQNIYNNLAWYQQKPGQRPKL <u>L</u> LIYGASNLESGVPSRFRKGS GSGTE YTLTISDLECDAAATYYCQSA <u>DL</u> <u>TSSINVF</u>GGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 274)</p>
AB2C135	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSESSSYWICWVRQAPGKGLEW <u>I</u> ACIYTASRDSIYYASWAKGRFTISK TSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA <u>RGPYYSYAYIGDALTRLDLWGQG</u> TLVTVSS (SEQ ID NO: 275)</p>	<p>AVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQS <u>SQSVYDNNWLAWYQQKPGQPPK</u> <u>LLIYEASKLASGVPSRFRKGS</u>SGT QFTLTISGVQCDDASTYYCAGGY <u>SSSDIEDNTF</u>GGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 276)</p>
AB2C136	<p>QEQLLEESGGDLVKPGASLTLTCTA SGFSENSNYMCWVRQAPGKGLE <u>WI</u> ACIYTGIVVPTYASWAKGRFTI SKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF CARDPYVGSSYIYNLWGPGTLVTV SS (SEQ ID NO: 277)</p>	<p>LVMTQTPSPVSAAVGSTVTISCQS <u>SQSVYNNNNLAWYQQKPGQPPK</u> <u>LLIYSASSLASGVPSRFRKGS</u>SGT QFTLTISGVECDAAATYYCAGYK <u>TYSNNENAF</u>GGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 278)</p>
AB2C138	<p>QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTAS GFSESSSYMCWVRQAPGKGLEW <u>I</u> ACIYAGSSSTYYASWAKGRFTISK TSSTTVTLQTSLTAADTATYFCAR <u>AGYIDSYVDYTYAAWYYFDLWGP</u> GTLVTVSS (SEQ ID NO: 279)</p>	<p>QVLTQTPSSVSEPVG GTVTINCQA <u>SENIYSNLAWYHQKPGQRPKLLI</u> YGASNLESGVPSRFRKGS GSGTEY TLYHQTISDLECDAAATYYCQSA <u>DLSSSINVF</u>GGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 280)</p>

В таблице 3 приведены некоторые примеры последовательностей V_H , V_L гуманизированных клонов

	V_H	V_L
--	-------	-------

hC4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASG <u>F</u> TISNNY <u>WIC</u> WVRQAPGKGL EWIGCIATGDG <u>STYY</u> ASWAKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAAGSSW <u>TTY</u> FD <u>FWGQ</u> GTLVTVSS(SEQ ID NO: 281)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAG <u>QNIDNYLSWYQQKPGKVPKLLIYRAS</u> TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDVATYYC <u>QNNNGGSTFTGF</u> PF <u>GQG</u> TKVEIK (SEQ ID NO: 282)
hC12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASG <u>F</u> SFSSSYWISWVRQAPGKGLE <u>WIACIAIGSSGTTY</u> ASWAKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARSGDGYTYVELWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 283)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <u>SISSYLA</u> WYQQKPGKVPKLLIYRA <u>ST</u> <u>L</u> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DVATYYC <u>QNYDIDDS</u> DN <u>T</u> FGQGTK VEIK (SEQ ID NO: 284)
hC15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASG <u>F</u> SFSSSYMCWVRQAPGKGL <u>E</u> WIACIY <u>TTYGGT</u> WYASWAKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR <u>SSISD</u> VTYFNLWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 285)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <u>SISNYLA</u> WYQQKPGKVPKLLIYRA <u>ST</u> <u>L</u> ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DVATYYC <u>QSYDNNNYA</u> FGQGTKVE IK (SEQ ID NO: 286)
hC18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASG <u>F</u> SFSSYWTCWVRQAPGKGLE <u>W</u> LGCTDGGSSGDTYYATWAKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARNLITWDLWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 287)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASE <u>SVYNNNQLS</u> WYQQKPGKVPKLLIY <u>W</u> <u>ASKLA</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDVATYYC <u>AGYKSSITD</u> GNAFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 288)
hC31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASG <u>F</u> DFSSNGMCWVRQAPGKGLE <u>WIACIYVDSSD</u> NTNYASWVNGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGYGYVGSAMD <u>L</u> WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 289)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <u>SISNELS</u> WYQQKPGKVPKLLIY <u>GASTL</u> <u>E</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED VATYYC <u>QSAYYSSSSYANT</u> FGQGTK VEIK (SEQ ID NO: 290)

hC36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSGYNICWVRQAPGKGLE <u>LIACIYTSSSGSTYYASWAKGRFTI</u> SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYC <u>ARGEAYYAYGYVGYAYYHG</u> <u>AFDPWGQGLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 291)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASH <u>SISKYFSWYQQKPGKVPKLLIYEASTL</u> <u>ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED</u> VATYYC <u>QSYYYGTSSSYAFGQGTKV</u> EIK (SEQ ID NO: 292)
hC53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGL <u>EWIACIHSSSGTTYASWAKGRFT</u> ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYC <u>ARDFSYTDDYISYVYATDL</u> <u>WGQGLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 317)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <u>SIGSSLAWYQQKPGKVPKLLIYAASY</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE</u> DVATYYC <u>QSTYYSSSTDIRAFGQGTK</u> VEIK (SEQ ID NO: 318)
hC131	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSSYMCWVRQAPGKGL <u>EWIACIYAGSTFSTYYASWAKGRF</u> TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYC <u>ARSDSYTYGYAGYAYAIF</u> <u>NLWGQGLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 293)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASE <u>SIYSNLAWYQQKPGKVPKLLIYLAST</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE</u> DVATYYC <u>QSAYYSSSADIAFGQGTKV</u> EIK (SEQ ID NO: 294)

Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут находиться в выделенной, очищенной, синтетической или рекомбинантной форме. Подходящие антигенсвязывающие молекулы можно выбирать из антител и их антигенсвязывающих фрагментов, включая моноклональные антитела (MAb), химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека и антигенсвязывающие фрагменты таких антител. Антигенсвязывающие молекулы могут являться мультивалентными (например, бивалентными) или моновалентными. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы содержат Fc-домен. В других вариантах осуществления в антигенсвязывающих молекулах отсутствует Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы являются моновалентными антигенсвязывающими молекулами (например, Fab, scFab, Fab', scFv, одноплечевыми антителами и т.д.).

Термин "антигенсвязывающая молекула" означает молекулу, имеющую аффинность связывания с антигеном-мишенью. Следует понимать, что этот термин распространяется на иммуноглобулины, фрагменты иммуноглобулинов и неиммуноглобулиновые белковые каркасы, демонстрирующие антигенсвязывающую активность. Типичные антигенсвязывающие молекулы, которые можно использовать в

практическом осуществлении настоящего изобретения, включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител.

Как определено в настоящем описании, антигенсвязывающие молекулы могут являться "голыми" или конъюгированными с другими молекулами или веществами, такими как токсины, радиоактивные изотопы, низкомолекулярные лекарственные средства, полипептиды и т.д.

В рамках изобретения термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), специфически связывающуюся или взаимодействующую с конкретным антигеном. Термин "антитело" включает полноразмерные иммуноглобулиновые молекулы, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), соединенные друг с другом дисульфидными связями, а также их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (которую можно сокращенно обозначать как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (которую можно сокращенно обозначать как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, являющимися более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных вариантах осуществления изобретения FR антитела по изобретению (или его антигенсвязывающей части) может являться идентичной последовательностям зародышевой линии человека или природно или искусственно модифицированной. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определять с помощью параллельного анализа двух или более CDR.

Антитело включает антитело любого класса, такого как IgG, IgA или IgM (или его подкласса), и антитело может не иметь какой-либо конкретный класс. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей антитела, иммуноглобулины можно приписывать разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделять на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, называют α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Структура субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

В рамках изобретения термин "определяющие комплементарность области" (CDR; т.е. CDR1, CDR2 и CDR3) относится к аминокислотным остаткам переменного домена

антитела, наличие которых необходимо для связывания антигена. Каждый переменный домен, как правило, имеет три области CDR, идентифицируемые как CDR1, CDR2 и CDR3. Каждая определяющая комплементарность область может содержать аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области", определяемые, например, по Kabat (т.е. приблизительно остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), и/или остатки из "гиперпеременной петли" (т.е. приблизительно остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых случаях определяющая комплементарность область может включать аминокислоты и из области CDR, определенной по Kabat, и из гиперпеременной петли.

Термин "гуманизованное" антитело относится к антителу, содержащему аминокислотные остатки из не принадлежащих человеку CDR и аминокислотные остатки из FR человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все из CDR соответствуют CDR не принадлежащего человеку антитела, и все или по существу все из FR соответствуют FR антитела человека. Гуманизованное антитело, необязательно, может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека.

В рамках изобретения "химерная" молекула является молекулой, содержащей один или более неродственных типов компонентов или содержащей две или более химически отличающиеся области, которые можно конъюгировать друг с другом, подвергать слиянию, связывать, транслировать, соединять с помощью линкера, химически синтезировать, экспрессировать с последовательности нуклеиновой кислоты и т.д. Например, пептидная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты, пептид и детектируемая метка, неродственные пептидные последовательности и т.п. В вариантах осуществления, в которых химерная молекула содержит аминокислотные последовательности другого происхождения, химерная молекула включает (1) полипептидные последовательности, обнаруживаемые совместно в природе (т.е. по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей гетерологична в отношении по меньшей мере одной из других аминокислотных последовательностей), или (2) аминокислотные последовательности, несоединенные в природе. Например, в рамках изобретения термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получают из конкретного источника или биологического вида, в то время как остальную часть тяжелой и/или легкой цепи получают из другого источника или биологического вида.

В рамках изобретения термин "антиген" и грамматически эквивалентные ему выражения (например, "антигенный") относятся к соединению, композиции или веществу,

которое может специфически связываться продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, такими как молекула антитела или Т-клеточный рецептор. Антигены могут представлять собой любой тип молекулы, включая, например, гаптены, простые промежуточные метаболиты, сахара (например, олигосахариды), липиды и гормоны, а также макромолекулы, такие как сложные углеводы (например, полисахариды), фосфолипиды и белки. Распространенные категории антигенов включают, в качестве неограничивающих примеров, вирусные антигены, бактериальные антигены, грибковые антигены, антигены простейших и другие паразитарные антигены, опухолевые антигены, антигены, связанные с аутоиммунными заболеваниями, аллергены и антигены при отторжении трансплантатов, токсины и разные другие антигены.

Термин "антигенсвязывающий участок" относится к участку, т.е. одному или более аминокислотным остаткам, антигенсвязывающей молекулы, обеспечивающему взаимодействие с антигеном. Например, антигенсвязывающий участок антитела содержит аминокислотные остатки из определяющих комплементарность областей (CDR). Нативная молекула иммуноглобулина, как правило, имеет два антигенсвязывающих участка, Fab-молекула, как правило, имеет один антигенсвязывающий участок. Антигенсвязывающий участок антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, как правило, специфически связывается с антигеном и, более конкретно, эпитопом антигена.

Термины "антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающая часть", "антигенсвязывающий домен" и "антигенсвязывающий участок" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения части антигенсвязывающей молекулы, участвующей в связывании антигена. Эти термины включают любой природный, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном с образованием комплекса.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полных молекул антител любыми подходящими стандартными способами, такими как протеолитическое расщепление или рекомбинантные способы генетической инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, в коммерческих источниках, библиотеках ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и обрабатывать химически или способами молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для встраивания кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих

гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или затрудненный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированными доменами, химерные антитела, антитела с пересаженными CDR, одноплечевые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентный нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены акул IgNAR, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент" в рамках изобретения.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотную композицию и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, смежную или находящуюся в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут находиться относительно друг друга в любой подходящей конфигурации. Например, переменная область может являться димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие примеры конфигураций переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_{H1} ; (ii) V_H - C_{H2} ; (iii) V_H - C_{H3} ; (iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ; (v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} , (vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_{H1} ; (ix) V_L - C_{H2} , (x) V_L - C_{H3} ; (xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ; (xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любые из указанных выше примеров конфигураций, переменные и константные домены можно соединять друг с другом напрямую или с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкому или полугибкому соединению между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из указанных выше конфигураций переменного и константного домена в нековалентном соединении друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидных связей). Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, как правило, будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен может специфически связываться с отдельным антигеном или другим эпитопом на том же антигене. Любой мультиспецифический формат

антигенсвязывающей молекулы, включая биспецифические форматы антигенсвязывающей молекулы, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению общепринятыми способами, доступными в этой области.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, участвующему в связывании антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела, как правило, имеют схожие структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). См., например, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания специфичности связывания антигена.

В рамках изобретения термин "константные домены" или "константная область" означает сумму иных доменов антитела, чем вариабельная область. Константная область не вовлечена напрямую в связывание антигена, но имеет различные иммунные эффекторные функции.

Термин "биспецифическая антигенсвязывающая молекула" относится к мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, обладающей способностью связываться с двумя разными эпитопами на одном антигене или на двух разных антигенах. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула может являться бивалентной, тривалентной или тетравалентной. В рамках изобретения термины "валентный", "валентность", "валентности" или другие их грамматические варианты означают количество антигенсвязывающих участков в антигенсвязывающей молекуле. Эти участки распознавания антигена могут распознавать один эпитоп или разные эпитопы. Бивалентные и биспецифические молекулы описаны, например, в Kostelny et al., 1992. *J Immunol* 148:1547; Pack and Plückthun, 1992. *Biochemistry* 31:1579, Gruber et al. 1994. *J Immunol* 5368, Zhu et al. 1997. *Protein Sci* 6:781, Hu et al., 1996. *Cancer Res.* 56:3055, Adams et al., 1993. *Cancer Res.* 53:4026, и McCartney et al., 1995. *Protein Eng.* 8:301. Тривалентные биспецифические антигенсвязывающие молекулы и тетравалентные биспецифические антигенсвязывающие молекулы также известны в этой области. См., например, Kontermann RE (ed.), *Springer Heidelberg Dordrecht London New York*, pp. 199-216 (2011). Биспецифическая антигенсвязывающая молекула также может иметь валентность больше 4 и также входит в объем настоящего изобретения. Такие антигенсвязывающие молекулы можно получать, например, способом "dock-and-lock" (Chang, C.-H. et al. *Bispecific antibodies*. Kontermann RE (2011), выше).

Фраза "специфически связывается" или "специфическое связывание" относится к реакции связывания между двумя молекулами, по меньшей мере в два раза и, более типично, более чем в 10-100 раз превышающей фоновую ассоциацию молекул в физиологических условиях. При использовании одного или более детектируемых связывающих средств, являющихся белками, специфическое связывание определяет

наличие белка в гетерогенной популяции белков и других биологических средств. Таким образом, в условиях определенного иммунологического анализа, определенная антигенсвязывающая молекула связывается с конкретной антигенной детерминантой, что, таким образом, позволяет определять ее наличие. Для специфического связывания с антигенной детерминантой в таких условиях необходима антигенсвязывающая молекула, выбранная по своей специфичности к детерминанте. Этот выбор можно осуществлять, исключая антигенсвязывающие молекулы, перекрестно реагирующие с другими молекулами. Для выбора антигенсвязывающих молекул можно использовать различные форматы иммунологических анализов (например, иммуноглобулины), таким образом, что молекулы являются специфически иммунореактивными в отношении конкретного антигена. Например, твердофазный анализ ELISA общепринято используют для выбора антител, специфически иммунореактивных в отношении белка (например, описание форматов и условия иммунологических анализов, которые можно использовать для определения специфической иммунореактивности см. в Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)). Способы определения аффинности и специфичности связывания также хорошо известны в этой области (см., например, Harlow and Lane, выше); Friefelder, "Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology" (W.H. Freeman and Co. 1976)).

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с клеткой, экспрессирующей ALPPL2, с аффинностью от приблизительно 14 пМ до приблизительно 10 нМ.

Термин "аффинность" или "аффинность связывания" относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антигенсвязывающей молекулы) и ее партнера по связыванию (например, антигена). Если не указано иначе, в рамках изобретения термин "аффинность связывания" относится к характерной аффинности связывания, отражающей взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары, например, антигенсвязывающей молекулы. Аффинность молекулы X к своему партнеру Y, как правило, можно представить с помощью константы диссоциации (K_d), являющейся соотношением констант скорости диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} , соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут включать разные константы скорости, при условии, что соотношение констант скоростей остается тем же. Аффинность можно измерять общепринятыми, известными в этой области способами, включая представленные в настоящем описании. Конкретным способом измерения аффинности является поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Термины "полипептид", "пептид" или "белок" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения линейной последовательности аминокислотных остатков, соединенных один за одним с помощью пептидных связей между альфа-аминогруппой и карбокси-группой смежных остатков. Аминокислотные остатки, как правило, находятся в природной изомерной "L"-форме. Однако, остатки в изомерной "D"-

форме можно заменять любым L-аминокислотным остатком при условии, что полипептид сохраняет желаемое функциональное свойство.

В рамках изобретения термин "модифицированное антитело" включает синтетические формы антител, измененные таким образом, что они не являются природными, например, антитела, содержащие по меньшей мере две части тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (такие как антитела с делетированными доменами или минитела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные так, чтобы связываться с двумя или более разными антигенами или разными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелой цепи, соединенные с молекулами scFv и т.п. Молекулы scFv известны в этой области и описаны, например, в патенте США № 5892019. Кроме того, термин "модифицированное антитело" включает мультивалентные формы антител (например, тривалентные, тетравалентные и т.д. антитела, связывающиеся с тремя или более копиями одного антигена).

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с ALPPL2 макака-резуса. ALPPL2 макака-резуса может иметь последовательность, приведенную в Genbank как ID XP_011726419.1.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула содержит: (a) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности V_H , приведенной в любой из строк таблицы 2 или таблицы 3, и (b) аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) в отношении аминокислотной последовательности V_L , приведенной в той же строке в таблице 2 или таблице 3, что и аминокислотная последовательность V_H .

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с ALPPL2 и ALPP, но не ALPL или ALPI.

Антигенсвязывающая молекула, например, может содержать:

a) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 281, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 282,

b) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 283, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 284,

c) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 285, и аминокислотную

последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 286,

d) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 287, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 288,

e) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 289, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 290,

f) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 291, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 292, или

g) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 293, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 294.

Фраза "по меньшей мере 90% идентичности последовательности", как определено в настоящем описании, может включать по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула не связывается с ALPP. Антигенсвязывающая молекула может связываться с ALPPL2, но не ALPP. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с ALPPL2, но не ALPP, ALPL или ALPI. Антигенсвязывающая молекула может содержать:

a) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36,

b) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72,

c) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90,

d) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128 и SEQ ID NO: 129, и переменную

область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131 и SEQ ID NO: 132,

е) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134 и SEQ ID NO: 135, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 138,

ф) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174; или

г) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 207, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 210.

В одном из вариантов осуществления антитело содержит:

а) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 221, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 222,

б) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 223, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 224,

с) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 239, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 240,

д) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 253, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 254,

е) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 255, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 256,

ф) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 267, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 268, или

g) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 279, и аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 280.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула является антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, или химерным антигенным рецептором (CAR).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным или химеризованным.

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным антителом, содержащим:

a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

i) V_{HFR1} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO: 295),

ii) V_{HFR2} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении WVRQAPGKGLE (SEQ ID NO: 296),

iii) V_{HFR3} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении ASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 297),

iv) V_{HFR4} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 298), и

b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

i) V_{LFR1} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQAG (SEQ ID NO: 299)

ii) V_{LFR2} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении WYQQKPGKVPK (SEQ ID NO: 300),

iii) V_{LFR3} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 301)

iv) V_{LFR4} , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 302).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность C_{H1} , имеющую по меньшей мере 90% (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) идентичности в отношении:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK (SEQ ID NO: 319).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность C_L , имеющую по меньшей мере 90% (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) идентичности в отношении:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 320).

Типичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению включают полноразмерные иммуноглобулины и антигенсвязывающие фрагменты, включая рекомбинантные антигенсвязывающие молекулы, которые могут являться моновалентными или мультивалентными, моноспецифическими или мультиспецифическими.

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является полноразмерным антителом, по существу интактным антителом, Fab-фрагментом, scFab, Fab', одноцепочечным переменным фрагментом (scFv) или одноплечевым антителом.

В одном из вариантов осуществления антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело является антителом IgG1. Антитело может иметь активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и может индуцировать уничтожение NK-клетками. Константная область тяжелой цепи может являться Fc-областью человека дикого типа или Fc-областью человека, включающей одну или более замен аминокислот. Антитела могут иметь мутации, стабилизирующие дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина, такие как мутации в шарнирной области IgG4, как описано в этой области (например, Angal et al., 1993. Mol. Immunol., 30:105-08). Также см., например, патентную заявку США № 2005/0037000. Константная область тяжелой цепи также может иметь замены, модифицирующие свойства антигенсвязывающей молекулы (например, снижающие одно или более из: связывания Fc-рецептора, гликозилирования антигенсвязывающей молекулы, дезамидирование, связывание с комплементом или окисление метионина). В некоторых случаях антигенсвязывающие молекулы могут иметь мутации, такие как описанные в патентах США №№ 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула модифицирована для снижения или устранения эффекторной функции.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению является моновалентной антигенсвязывающей молекулой. Неограничивающие моновалентные антигенсвязывающие молекулы включают: Fab-фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; Fab'-фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}, а также часть домена C_{H2}; Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1}; Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; молекулу одноцепочечного антитела (например, scFab и scFv); фрагмент однодоменного антитела (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), состоящий из домена V_H; и одноплечевое антитело, такое, как описано в патентной заявке США № 20080063641 (Genentech), или другое моновалентное антитело, например, такое, как описано в WO2007048037 (Amgen).

В одном из вариантов осуществления моновалентная антигенсвязывающая молекула содержит Fv-фрагмент. Fv-фрагмент является наименьшей единицей иммуноглобулиновой молекулы с функцией связывания антигена. Антигенсвязывающая молекула в формате scFv (одноцепочечного варибельного фрагмента) состоит из варибельных областей тяжелых (V_H) и легких (V_L) цепей, соединенных друг с другом гибким пептидным линкером, которые легко можно экспрессировать в функциональной форме в экспрессирующем хозяине, таком как *E. coli* и клетки млекопитающих, что позволяет с помощью белковой инженерии улучшать свойства scFv, например, повышать аффинность и изменять специфичность (Ahmed et al., 2012. Clin Dev Immunol. 2012:980250). Типичные примеры последовательностей линкеров описаны в разделе 4.5 ниже. При конструировании scFv порядок домены может представлять собой V_H -линкер- V_L или V_L -линкер- V_H , и можно использовать обе ориентации.

В некоторых вариантах осуществления последовательности линкеров, используемые в scFv, являются мультимерами пентапептида GGGGS [SEQ ID NO:66] (или G4S или Gly4Ser). Они включают 15-мер (G4S)₃ (Huston et al., 1988. Proc Natl Acad Sci USA. 85(16), 5879-83), 18-мер GGSSRSSSSGGGGSGGGG [SEQ ID NO:67] (Andris-Widhopf et al., "Generation of human scFv antibody libraries: PCR amplification and assembly of light- и heavy-chain coding sequences." Cold Spring Harbor Protocols, 2011(9)) и 20-мер (G4S)₄ (Schaefer et al., "Construction of scFv Fragments from Hybridoma or Spleen Cells by PCR Assembly." в Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dübel, Springer Verlag, Heidelberg, Germany (2010) pp. 21-44). Предложены многие другие последовательности, включая последовательности с добавленными функциональностями, например, эпитопная метка или кодирующая последовательность, содержащая участок рекомбинации Cre-Lox или последовательности, улучшающие свойства scFv, зачастую в контексте конкретных последовательностей антитела.

Клонирование scFv, как правило, осуществляют, посредством двухстадийной ПЦР с перекрывающимися праймерами (также известной как ПЦР со сплайсингом с перекрывающимися расширениями или SOE-ПЦР), как описано (Schaefer et al., 2010, выше). Сначала амплифицируют и выделяют из геля домены V_H и V_L , а затем собирают их за одну стадию сборочной ПЦР. Линкер получают посредством перекрывания двух внутренних праймеров или посредством добавления линкерного праймера, последовательность которого охватывает весь линкер или более (сборочная ПЦР с тремя фрагментами).

Антигенсвязывающие молекулы одноцепочечного Fv (scFv) можно получать рекомбинантно, например, в *E. coli*, клетках насекомых или клетках-хозяевах млекопитающих, после клонирования кодирующей белок последовательности scFv в контексте подходящих экспрессирующих векторов с подходящими участками инициации трансляции и транскрипции и, в случае экспрессии в клетках млекопитающих, последовательностью сигнального пептида.

В одном из вариантов осуществления моновалентная антигенсвязывающая молекула содержит Fab-фрагмент. В иллюстративном примере этого типа моновалентная антигенсвязывающая молекула является одноплечевым антителом, состоящей или состоящей по существу из одного антигенсвязывающего фрагмента (Fab) и Fc-области, где Fc-область содержит первый и второй Fc-полипептиды, и где первый и второй Fc-полипептиды находятся в комплексе.

Рекомбинантная экспрессия Fc-содержащих моновалентных антигенсвязывающих молекул зачастую может приводить к нежелательным примесям бивалентных гомодимеров. Известны стратегии ингибирования образования гомодимеров, включая способы, которыми встраивают мутации в константные области иммуноглобулинов для создания измененных структур, поддерживающих неблагоприятные взаимодействия между полипептидными цепями и супрессирующих образование нежелательных Fc-гомомеров. Неограничивающие примеры этих стратегий способствования гетеродимеризации включают встраивание структур "выступ-во-впадину" (КИН) в два полипептида и использование природной гетеродимеризации доменов C_L и C_{H1} (см., Kontermann, *выше*, pp. 1-28 (2011) Ridgway et al., 1996. Protein Eng. 9(7):617-21; Atwell et al., 1997. J Mol Biol. 270(1):26-35; как описано в WO 2005/063816). Эти мутации КИН способствуют гетеродимеризации содержащей "выступ" Fc и содержащей "впадину" тяжелой цепи, улучшая сборку моновалентного антитела и снижая уровень нежелательного бивалентного антитела.

Модификации в Fc-домене антигенсвязывающих молекулах могут быть желательными для снижения связывания Fc-рецептора и, таким образом, снижения вероятности FcγRIIa-опосредованной активации тромбоцитов. Например, известно, что так называемая двойная мутация "LALA" (Leu234Ala с Leu235Ala) в IgG человека (включая IgG1) значительно нарушает связывание Fc-рецептора и эффекторную функцию (Lund et al., 1991, J. Immunol. 147, 2657-2662; Lund et al., 1992, Mol. Immunol. 29:53-59). В случае IgG4 человека, сконструированный вариант с мутациями S228P/L235E (SPLE) ранее продемонстрировал минимальное связывание FcγR (Newman et al., 2001, Clin. Immunol. 98, 164-174). Мутации в Fc-доменах IgG1 или IgG4 можно комбинировать, например, комбинирование мутаций LALA в IgG1 человека с мутацией P329G или комбинирование мутации SPLE в IgG4 человека с мутацией P329G полностью устраняло взаимодействия FcγR и C1q (Schlothauer et al., 2016, Protein Eng Des. Sel. 29, 457-466).

В одном из вариантов осуществления в антигенсвязывающей молекуле (например, МАб или его антигенсвязывающем фрагменте) каждая из цепей Fc антитела IgG1 несет мутации P329G, L235A, L234A (P329G LALA), или каждая из цепей Fc IgG4 несет мутации P329G, S228P, L235E для снижения или устранения какого-либо нежелательного перекрестного связывания, активации тромбоцитов или иммунной эффекторной функции (например, антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), фагоцитоза (ADCP) и обусловленной компонентом цитотоксичности (CDC)) антигенсвязывающей молекулы.

В одном из вариантов осуществления каждая из цепей Fc IgG1 антигенсвязывающей молекулы (или антитела) несет мутации, включающие а) S239D, A330L и I332E или б) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, повышающие иммунную эффекторную функцию антигенсвязывающей молекулы (например, ADCC).

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула (или антитело) содержит последовательность C_{H2}-C_{H3}, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322 или SEQ ID NO: 323.

Антигенсвязывающие молекулы могут содержать последовательность тяжелой цепи. Последовательность тяжелой цепи может, например, содержать или состоять из последовательности V_H, указанной в таблице 3, слитой с последовательностью C_{H1} (например, SEQ ID NO: 319) и последовательностью C_{H2}-C_{H3} (например, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322 или SEQ ID NO: 33). Например, последовательность тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 332 или SEQ ID NO: 333.

Антигенсвязывающие молекулы могут содержать последовательность легкой цепи. Последовательность легкой цепи может, например, содержать или состоять из последовательности V_L, указанной в таблице 3, напрямую слитой с последовательностью C_L (например, SEQ ID NO: 320). Например, последовательность легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 331 или SEQ ID NO: 334.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к моновалентным антигенсвязывающим молекулам, полученным посредством коэкспрессии легкой цепи, тяжелой цепи и укороченного Fc-домена. Соответственно, тяжелая цепь включает мутации "впадины" и мутации P329G LALA, в то время как укороченный Fc-домен включает мутации "выступа" и мутации P329G LALA.

Экспрессии антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, можно достигать, например, в бактериальных клетках-хозяевах (например, *Escherichia coli*), дрожжевых клетках-хозяевах, клетках-хозяевах насекомых или клетках-хозяевах млекопитающих после клонирования кодирующих белок последовательностей конструкций в контексте подходящих экспрессирующих векторов с подходящими участками инициации трансляции и транскрипции, и, при необходимости, последовательностями сигнального пептида.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула является мультивалентной антигенсвязывающей молекулой, неограничивающие примеры которой включают: иммуноглобулины, F(ab')₂, тандемный scFv (taFv или scFv₂), scFv-Fc, диатело, dAb₂/V_HH₂, минитела, миниантитела ZIP, димер барназа-барстар, производные с модификациями "выступ-во-впадину", SEED-IgG, гетеро-Fc-scFv, Fab-scFv, Fab)₂/sc(Fab)₂,

scFv-(ФНО α)₃, scFv-Jun/Fos, Fab'-Jun/Fos, тритело, тримерное антитело, триби-минитело, тример барназа-барстара, Collabody, DNL-F(ab)₃, scFv₃-C_{H1}/C_L, Fab-scFv₂, IgG-scFab, IgG-scFv, scFv-IgG, scFv₂-Fc, F(ab')₂-scFv₂, scDB-Fc, scDb-C_{H3}, Db-Fc, scFv₂-H/L, DVD-Ig, tandAb, scFv-dhlx-scFv, dAb₂-IgG, dAb-IgG, dAb-Fc-dAb, тетратело, стрептатело (scFv-стрептавидин)₄, (scFv-p53)₄, [sc(Fv)₂]₂; тандемное диатело (tandab) и их комбинации.

В одном из вариантов осуществления мультивалентная антигенсвязывающая молекула выбрана из IgG-подобных антител (например, Triomab/квадрома, Trion Pharma/Fresenius Biotech; вариантов с модификациями "выступ-во-впадину", Genentech; CrossMAbs, Roche; электростатически совмещенных антител, AMGEN; LUZ-Y, Genentech; антитела с доменом, сконструированным посредством обмена между цепями (SEED), EMD Serono; Biolonic, Merus; и антител с обменом Fab, Genmab), симметричных IgG-подобных антител (например, Ig с двойным нацеливанием (DT), GSK/Domantis; антитела два-в-одном, Genentech; перекрестно сшитых MAb, Karmanos Cancer Center; MAb₂, F-star; и Coy X-body, Coy X/Pfizer), слитых белков IgG (например, Ig с двойным переменным доменом (DVD), Abbott; IgG-подобных биспецифических антител, Eli Lilly; Ts2Ab, Medimmune/AZ; BsAb, ZymoGenetics; HERCULES, Biogen Idec; TvAb, Roche), слитых белков Fc (например, слитых белков scFv/Fc, Academic Institution; SCORPION, Emergent BioSolutions/Trubion, ZymoGenetics/BMS; технологии переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (Fc-DART), MacroGenics; двойного (ScFv)₂-Fab, National Research Center for Antibody Medicine), слитых белков Fab (например, F(ab)₂, Medarex/AMGEN; Fab двойного действия или Bis-Fab, Genentech; Fab с технологией "dock-and-lock" (DNL), ImmunoMedics; бивалентный биспецифический Fab, Biotechnol; и Fab-Fv, UCB-Celltech), антител на основе ScFv и диатела (например, биспецифических рекрутеров Т-клеток (BiTE), Micromet; тандемных диател (Tandab), Affimed; DART, MacroGenics; одноцепочечного диатела, Academic; TCR-подобных антител, AIT, Receptor Logics; слитого белка сывороточного альбумина человека и scFv, Merrimack; и COMBODIES, Epigen Biotech), слитых белков IgG/не-IgG (например, иммуноцитокинов, EMDSerono, Philogen, ImmunGene, ImmunoMedics; слитого белка суперантигена, Active Biotech; и иммунного мобилизирующего противоопухолевого mTCR, ImmTAC) и олигоклональных антител (например, Symphogen и Merus).

В одном из вариантов осуществления антитело является биспецифическим или триспецифическим антителом. В одном из вариантов осуществления антитело является биспецифическим антителом. Биспецифическое антитело может являться антителом, содержащим первый антигенсвязывающий участок, специфически связывающийся с ALPPL2, и второй антигенсвязывающий участок, специфически связывающийся с CD3. В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело может связываться со злокачественной клеткой и рекрутировать иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки) для уничтожения злокачественной клетки. Антигенсвязывающие полипептиды, специфически связывающиеся с CD3, хорошо известны в этой области. Второй антигенсвязывающий участок, например, может содержать CD3-специфические

последовательности CDR или последовательности VH/VL из муромонаба (ортоклона ОКТ3), форалумаба, теплизумаба, блинатумомаба или висилизумаба. Биспецифическое антитело, например, может содержать последовательности CDR VH SEQ ID NO: 335-337 и последовательности CDR VL SEQ ID NO: 338-340. Альтернативно, антитело может содержать последовательности CDR VH SEQ ID NO: 341-343 и последовательности CDR VL SEQ ID NO: 344-346.

В одном из вариантов осуществления биспецифические антитела по изобретению получают с использованием стратегии "выступ-во-впадину", предназначенной для конструирования поверхности контакта между первым и вторым полипептидом для гетероолигомеризации. Предпочтительная поверхность контакта содержит по меньшей мере часть домена СН3 константного домена антитела. Показано, что мутации "выступ-во-впадину" в домене СН3 последовательности Fc значительно снижают образование гомодимеров (см., например, Merchant et al., 1998, Nature Biotechnology, 16:677-681). "Выступы" конструируют, заменяя аминокислоты с небольшими боковыми цепями из поверхности контакта первого полипептида аминокислотами с более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсаторные "впадины" размера, идентичного или схожего с "выступами", необязательно, создают на поверхности контакта второго полипептида, заменяя аминокислоты с крупными боковыми цепями аминокислотами с меньшими боковыми цепями (например, аланином или треонином). Если на поверхности контакта первого или второго полипептида существует имеющий правильное расположение и размер "выступ" или "впадина", необходимо всего лишь сконструировать соответствующую "впадину" или "выступ", соответственно, на смежной поверхности контакта. "Выступ" и "впадину" можно получать синтетическими способами, такими как изменение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, или пептидный синтез. Дополнительное описание "выступов-во-впадину" см. в патентах США №№ 5731168; 5807706; 5821333.

Общий способ получения гетеромультимера с использованием стратегии "выступ-во-впадину" включает экспрессию в одной или отдельных клетках-хозяевах полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, измененный относительно исходного полинуклеотида так, чтобы кодировать "выступ", и второго полинуклеотида, кодирующего второй полипептид, измененный относительно исходного полинуклеотида так, чтобы кодировать "впадину". Полипептиды экспрессируют в общей клетке-хозяине с выделением гетеромультимера из культуры клетки-хозяина или в отдельных клетках-хозяевах с выделением и очисткой с последующим образованием гетеромультимера. В некоторых вариантах осуществления образующийся гетеромультимер является мультимерным антителом, например, биспецифическим антителом.

Химерная молекула

Настоящее изобретение относится к химерной молекуле, содержащей антигенсвязывающую молекулу, как определено в настоящем описании, и гетерологичное вещество.

В одном из вариантов осуществления гетерологичное вещество является детектируемым веществом, увеличивающим время полужизни веществом или терапевтическим веществом.

Детектируемые вещества по настоящему изобретению включают, например, любые вещества, известные в этой области, подходящие для диагностической детекции, включая детекцию *in vitro* и визуализацию *in vivo*. Детектируемое вещество может являться, например, флуорофором, радионуклидным репортером, содержащей металл наночастицей или микрочастицей, эхоконтрастным средством (например, нанопузырек или микропузырек) или оптическим красителем. Они также включают контрастные частицы, видимые при магнитно-резонансной томографии (МРТ) и визуализация с помощью магнитных частиц (МРІ). Флуорофоры можно определять и/или визуализировать, например, посредством поляризации флуоресценции, активируемой флуоресценцией сортировки клеток и флуоресцентной микроскопии, которые можно комбинировать или не комбинировать с масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ESI-MS), а также флуоресцентной компьютерной томографией (FLECT). Радионуклидные репортеры можно определять и визуализировать с помощью детекции радионуклидов (определения ядерного излучения), такой как, например, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или сцинтиграфия. Содержащие металл наночастицы или микрочастицы можно определять с использованием оптической визуализации, включая МРТ, которую, как правило, используют с парамагнитными наночастицами или микрочастицами, и МРІ, которую, как правило, используют с суперпарамагнитными частицами. Эхоконтрастные средства можно определять с использованием ультразвуковой визуализации, включая контрастно-усиленное УЗИ (CEU).

Детектируемая метка также может являться фермент-субстратной меткой. Фермент, как правило, может катализировать химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно измерять различными способами. Например, фермент может катализировать химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно измерять различными способами. Например, фермент может катализировать изменение цвета субстрата, которое можно измерять спектрофотометрически. Альтернативно, фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Способы количественного анализа изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат становится электронно-возбужденным в результате химической реакции, а затем может испускать свет, который можно измерять (например, с использованием хемилюминометра), или отдает энергию флуоресцентному акцептору. Примеры ферментативных меток включают люциферазы (например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу; патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRPO), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаридов (например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкоза-6-фосфат-

дегидрогеназу), оксидазы гетероциклов (такие как *urease* и ксантинооксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и т.п.

Примеры комбинаций фермент-субстрат включают, например:

1) пероксидаза хрена (HRPO) использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя (например, ортофенилендиамина (OPD) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМВ));

2) щелочная фосфатаза (AP) с пара-нитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата; и

3) β -D-галактозидаза (β -D-Gal) с хромогенным субстратом (например, р-нитрофенил- β -D-галактозидаза) или флуорогенным субстратом (4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза).

В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающую молекулу можно не метить и ее наличие можно определять с использованием меченого антитела, связывающегося с антигенсвязывающей молекулой. Антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно использовать в любом известном способе анализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямые и непрямые анализы сэндвич-типа, иммуногистохимия и иммунопреципитация.

В одном из вариантов осуществления химерная молекула содержит по меньшей мере одно гетерологичное вещество, являющееся "увеличивающим время полужизни веществом". Увеличивающие время полужизни вещества могут включать, например, (i) полипептиды XTEN; (ii) Fc; (iii) альбумин, (iv) альбумин-связывающий полипептид или жирную кислоту, (v) C-концевой пептид (СТР) из 13 (β) субъединицы хорионического гонадотропина человека, (vi) PAS; (vii) НАР; (viii) трансферрин; (ix) полиэтиленгликоль (PEG); (x) гидроксиэтил-крахмал (HES), (xi) полисиаловые кислоты (PSA); (xii) рецептор клиренса или его фрагмент, блокирующий связывание химерной молекулы с рецептором клиренса; (xiii) пептиды низкой сложности; (xiv) или любые их комбинация. В некоторых вариантах осуществления увеличивающее время полужизни вещество содержит Fc-область. В других вариантах осуществления увеличивающее время полужизни вещество содержит две Fc-области, слитые с помощью линкера. Примеры гетерологичных веществ также включают, например, FcRn-связывающие вещества (например, полные Fc-области или их части, связывающиеся с FcRn), одноцепочечные Fc-области (scFc-области, например, как описано в патентной публикации США № 20080260738, WO 2008/012543 и WO 2008/1439545) или процессируемые scFc-области. В некоторых вариантах осуществления гетерологичное вещество может включать участок присоединения для неполипептидного вещества, такого как полиэтиленгликоль (PEG), гидроксиэтил-крахмал (HES), полисиаловая кислота или любые производные, варианты или комбинации этих веществ.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно гетерологичное вещество является терапевтическим веществом. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое вещество выбрано из противоопухолевого вещества (например,

цитостатических/токсических и/или антипролиферативных лекарственных средств), иммунотерапевтического вещества и противовоспалительного вещества. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство можно использовать в лечении злокачественного новообразования. Пригодные классы противоопухолевых средств включают химиотерапевтические средства, типичные примеры которых включают антитубулиновые средства, ауристатин, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие средства (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина), трехъядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, ингибиторы кальмодулина, химиотерапевтические сенсibilизаторы, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, майтанзиноиды, нитрозомочевины, платинолы, порообразующие соединения, пуриновые антиметаболиты, пурамицины, сенсibilизаторы для лучевой терапии, рапамицины, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомераз, алкалоиды барвинка или т.п.

В одном из вариантов осуществления терапевтическое вещество является ауристатином, таким как монометилауристатин F (ММАF) или монометилауристатин E (ММАЕ).

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающую молекулу соединяют с терапевтическим веществом через валин-цитруллиновый (Vc) линкер

Полинуклеотиды, конструкции и клетки-хозяева

Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающую молекулу, как определено в настоящем описании, или химерную молекулу как определено в настоящем описании.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения полимера нуклеотидов, который может являться мРНК, РНК, кРНК, кДНК или ДНК. Термин, как правило, относится к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований - рибонуклеотидов, или дезоксинуклеотидов, или модифицированной форме любого типа нуклеотида. Термин включает одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающую молекулу, как представлено в настоящем описании.

Термин "вектор" означает молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно - молекулу ДНК, полученную, например, из плазмиды, бактериофага или вируса, в которую можно встраивать или клонировать последовательность нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, вектор содержит один или более уникальных участков рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенной клетке-хозяине, включая целевую клетку или ткань, или клетку-предшественника или ее ткань, или к интеграции в геном определенного хозяина таким образом, что клонированная последовательность

может воспроизводиться. Таким образом, вектор может являться автономно реплицирующимся вектором, т.е. вектором, существующим в виде экстрахромосомной единицы, репликация которой не зависит от репликации хромосом, например, линейная или замкнутая кольцевая плаزمиды, экстрахромосомный элемент, минихромосома или искусственная хромосома. Вектор может содержать любые средства для обеспечения ауторепликации. Альтернативно, вектор может являться вектором, который при встраивании в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомами, в которые интегрирован. Векторная система может содержать один вектор или плазмиду, два или более векторов или плазмид, совместно содержащих общую ДНК, подлежащую встраиванию в геном клетки-хозяина, или транспозон. Выбор вектора, как правило, будет зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор будут встраивать. Вектор также может включать селективный маркер, такой как ген резистентности к антибиотику, который можно использовать для селекции подходящих трансформантов. Примеры таких генов резистентности хорошо известны специалистам в этой области.

Настоящее изобретение относится к конструкции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающую молекулу, как определено в настоящем описании, или химерную молекулу, как определено в настоящем описании, в функциональной связи с одной или более контрольными последовательностями.

Термин "конструкция" относится к рекомбинантной генетической молекуле, включая одну или более выделенных последовательностей нуклеиновой кислоты из разных источников. Таким образом, конструкции являются химерными молекулами, в которых две или более последовательности нуклеиновой кислоты другого происхождения собираются в одну молекулу нуклеиновой кислоты и включают любую конструкцию, содержащую (1) последовательности нуклеиновой кислоты, включая регуляторные и кодирующие последовательности, необнаруживаемые в природе совместно (т.е. по меньшей мере одна из нуклеотидных последовательностей является гетерологичной в отношении по меньшей мере одной из других нуклеотидных последовательностей), или (2) последовательности, кодирующие части функциональных молекул РНК или белков, не соединенных в природе, или (3) части промоторов, не соединенных в природе. Типичные конструкции включают любую рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плаزمиды, космиды, вирус, автономно реплицирующаяся молекула полинуклеотида, фаг или линейная или кольцевая одноцепочечная или двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты ДНК или РНК, полученная из любого источника, способная к интеграции в геном или автономной репликации, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, где одна или более молекул нуклеиновой кислоты функционально связаны. Конструкции по настоящему изобретению, как правило, будут включать необходимые элементы для прямой экспрессии интересующей последовательности нуклеиновой кислоты, также содержащейся в конструкции, такой как, например, целевая последовательность нуклеиновой кислоты или модуляторная последовательность

нуклеиновой кислоты. Такие элементы могут включать контрольные элементы или регуляторные последовательности, такие как промотор, функционально связанный (так, чтобы направлять транскрипцию) с интересующей последовательностью нуклеиновой кислоты, и зачастую также включает последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержаться в векторе. В дополнение к компонентам конструкции, вектор может включать, например, один или более селективных маркеров, один или более участков начала репликации, например, прокариотического и эукариотического происхождения, по меньшей мере один участок множественного клонирования и/или элементы для облегчения стабильной интеграции конструкции в геном клетки-хозяина. Две или более конструкции могут содержаться в одной молекуле нуклеиновой кислоты, такой как один вектор, или в двух или более отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, таких как два или более отдельных вектора. "Экспрессирующая конструкция", как правило, включает по меньшей мере контрольную последовательность, функционально связанную с интересующей нуклеотидной последовательностью. Таким образом, например, промоторы, функционально связанные с нуклеотидными последовательностями, подлежащими экспрессии, представлены в экспрессирующих конструкциях для экспрессии в организме или его части, включая клетку-хозяина. Что касается практического осуществления настоящего изобретения, специалисту в этой области хорошо известны общепринятые композиции и способы получения и использования конструкций и клеток-хозяев, см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition Volumes 1, 2, и 3. J. F. Sambrook, D. W. Russell, and N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

В рамках изобретения термины "контрольный элемент", "контрольная последовательность", "регуляторная последовательность" и т.п. означает последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК), необходимую для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариотических клеток, например, включают промотор и, необязательно, действующую в цис-положении последовательность, такую как последовательность оператора и участок связывания рибосомы. Контрольные последовательности, подходящие для эукариотических клеток, включают последовательности контроля транскрипции, такие как промоторы, сигналы полиаденилирования, транскрипционные энхансеры, последовательности контроля трансляции, такие как трансляционные энхансеры и внутренние участки связывания рибосомы (IRES), последовательности нуклеиновой кислоты, модулирующие стабильность мРНК, а также нацеливающие последовательности, нацеленные на продукт, кодируемый транскрибируемым полинуклеотидом, во внутриклеточный компартмент в клетке или внеклеточном окружении.

Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей конструкцию, как определено в настоящем описании.

Термины "хозяин", "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используют взаимозаменяемо для обозначения клеток, в которые встраивают экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформантов" и "трансформированные клетки", включающие первичную трансформированную клетку и потомство, полученное из них, безотносительно количеству пассажей. Потомство может не являться полностью идентичным содержанию нуклеиновых кислот в родительской клетке, но может содержать мутации. Мутантное потомство, имеющее ту же функцию или биологическую активность, по которой подвергали скринингу или селекции исходно трансформированную клетку, включены в настоящее изобретение. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, который можно использовать для получения антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Клетки-хозяева включают, помимо прочего, культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки ВНК, клетки NS0, клетки SP2/0, миеломные клетки YO, миеломные клетки мыши P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 или гибридные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых и растительные клетки, но также и клетки, содержащиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или культивируемую ткань растения или животного.

Фармацевтическая композиция

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающую молекулу, как определено в настоящем описании, или химерную молекулу, как определено в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтический носитель, состоящий из материала, не являющегося биологически или иначе нежелательным, т.е. материал можно вводить индивидууму вместе с выбранным активным средством, не вызывая какой-либо или существенной нежелательной реакции. Носители могут включать эксципиенты и другие добавки, такие как дилуенты, детергенты, красители, увлажнители или эмульгаторы, pH-буферные средства, консерванты и т.п.

Типичные фармацевтически приемлемые носители включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические средства, средства, замедляющие абсорбцию, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственного средства, гели, связывающие средства, эксципиенты, средства для повышения распадаемости, смазочные средства, подсластители, ароматизаторы, красители, подобные материалы и их комбинации, что будет известно специалисту в этой области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, включенную в настоящее описание в качестве ссылки). За исключением случаев, когда какой-либо

общепринятый носитель несовместим с активными ингредиентами, предусмотрено его использование в фармацевтических композициях.

Фармацевтические композиции могут находиться в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического использования. Подходящие фармацевтические композиции можно вводить внутривенно, подкожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов. Предпочтительным способом введения является парентеральное (например, внутривенное, подкожное, интраперитонеальное, внутримышечное). В конкретных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят посредством внутривенной инфузии или инъекции. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят посредством внутримышечной или подкожной инъекции.

В рамках изобретения фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" означают иные способы введения, чем энтеральное и топическое введение, как правило, посредством инъекции, и включают в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. В рамках изобретения фармацевтически приемлемые носители включают, в качестве неограничивающих примеров, 0,01-0,1 М и, предпочтительно, 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Другие общепринятые парентеральные носители включают растворы фосфата натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или жирные масла. Внутривенные носители включают наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов, например, на основе декстрозы Рингера, и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т.п.

Более конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы (если вещества являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального

получения стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. В таких случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, что существует возможность введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и, предпочтительно, будет законсервирована против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может являться растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Правильную текучесть можно поддерживать, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, и/или посредством поддержания необходимого размера частиц. В конкретных вариантах осуществления средство по настоящему изобретению можно конъюгировать с носителем для доставки в клетки. В этих вариантах осуществления средство можно инкапсулировать в подходящем носителе для облегчения доставки средства в клетки-мишени, повышения стабильности средства или минимизации потенциальной токсичности средства. Как будет понятно специалистам в этой области, для доставки средства по настоящему изобретению подходят различные носители. Неограничивающие примеры подходящих структурированных жидких систем для доставки могут включать наночастицы, липосомы, микроэмульсии, мицеллы, дендримеры и другие фосфолипид-содержащие системы. В этой области известны способы включения средств по настоящему изобретению в носители для доставки. Хотя ниже представлены различные варианты осуществления, будет очевидно, что предусмотрены другие известные в этой области способы встраивания антигенсвязывающей молекулы, как описано в настоящем описании, в носитель для доставки.

Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько дробных доз с течением времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от требований терапевтической ситуации. Антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно вводить несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут являться суточными, недельными, месячными или годовыми. Интервалы также могут являться нерегулярными в зависимости от измерений уровней модифицированного полипептида или антигена в крови пациента. Альтернативно, антигенсвязывающую молекулу можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, для которого необходимо менее частое введение. Дозу и частоту варьируют в зависимости от времени полужизни полипептида в организме пациента.

Предпочтительным может являться составление композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и единообразия доз. В рамках изобретения термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам в виде однократных доз для индивидуумов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, вычисленное для

получения желаемого терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтически приемлемым носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм по изобретению определяется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого хотят достичь, и (b) ограничений, известных в области составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Специалисты в этой области могут определять дозы и схемы введения антигенсвязывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающую молекулу вводят посредством инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе приблизительно от 0,01 до 50 мг/кг, например, от 0,01 до 0,1 мг/кг, например, приблизительно от 0,1 до 1 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг, приблизительно от 5 до 25 мг/кг, приблизительно от 10 до 50 мг/кг. Схему введения можно варьировать, например, от одного раза в неделю до одного раза в 2, 3 или 4 недели.

Следует отметить, что значения доз могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести облегчаемого состояния. Также следует понимать, что для любого конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования необходимо корректировать с течением времени в зависимости от потребности индивидуума и профессионального мнения специалиста, осуществляющего введение или наблюдающего за введением композиций, и что диапазоны доз, приведенные в настоящем описании, являются исключительно примерами и не предназначены для ограничения объема или практического осуществления композиции по изобретению.

Способы лечения

Настоящее изобретение относится к способу снижения экспрессии или активности ALPPL2 в клетке (такой как злокачественная клетка). Настоящее изобретение относится к способу снижения экспрессии или активности ALPPL2 в злокачественной клетке, включающему приведение злокачественной клетке в контакт с антигенсвязывающей молекулой, химерной молекулой, полинуклеотидом, конструкцией, вектором, клеткой-хозяином или фармацевтической композицией, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу снижения экспрессии или активности ALPPL2 в злокачественной клетке, включающему приведение злокачественной клетки в контакт с антигенсвязывающей молекуле, как определено в настоящем описании, или химерной молекуле, как определено в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "опухоль" относится к росту и пролиферации любой неопластической клетки, злокачественной или доброкачественной, и всех предзлокачественных и злокачественных клеток и тканей. Термины "злокачественное новообразование" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, как правило, частично характеризующемуся нерегулируемым ростом клеток. В рамках изобретения термин "злокачественное новообразование" относится к неметастатическим и метастатическим злокачественным новообразованиям, включая злокачественные новообразования на ранней стадии и поздней стадии. Термин

"предзлокачественный" относится к состоянию или росту, как правило, предшествующему или развивающемуся в злокачественное новообразование. Термин "неметастатический" означает злокачественное новообразование, являющееся доброкачественным или остающееся в первичном очаге и непроникающее в систему лимфатических или кровеносных сосудов или иные ткани, чем первичный очаг. Как правило, неметастатическое злокачественное новообразование является любым злокачественным новообразованием, имеющим стадию 0, I или II и иногда стадию III. Термин "злокачественное новообразование на ранней стадии" означает злокачественное новообразование, не являющееся инвазивным или метастатическим или классифицируемое как злокачественное новообразование стадии 0, I или II. Термин "злокачественное новообразование поздней стадии", как правило, относится к злокачественному новообразованию стадию III или стадию IV, но также может относиться к стадии II или подстадии стадии II. Специалисту в этой области будет понятно, что классификация злокачественного новообразования стадии II как злокачественного новообразования на ранней стадии или злокачественного новообразования на поздней стадии зависит от конкретного типа злокачественного новообразования. Неограничивающие иллюстративные примеры злокачественного новообразования включают рак молочной железы, рак предстательной железы или рак яичка, рак яичников, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легких, печеночно-клеточный рак, рак желудка, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевыводящих путей, рак щитовидной железы, рак почки, карциному, меланому, злокачественное новообразование головного мозга, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак эндометрия, множественную миелому, рак прямой кишки, мезотелиомы, рак эндометрия и рак пищевода. В примере варианта осуществления злокачественное новообразование является колоректальным раком, раком эндометрия, раком желудка, мезотелиомой, раком яичников, раком поджелудочной железы или раком яичка.

Настоящее изобретение относится к способу снижения или ингибирования пролиферации, выживания и жизнеспособности опухоли у индивидуума, включающему введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы, химерной молекулы, полинуклеотида, конструкции, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу снижения или ингибирования пролиферации, выживания и жизнеспособности опухоли у индивидуума, включающему введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Термин "пациент" включает человека и других млекопитающих, подвергаемых профилактическому или терапевтическому лечению. В рамках изобретения термин "индивидуум" включает любого человека или не являющегося человеком животного. Например, способы по настоящему изобретению можно использовать для лечения

индивидуума, имеющего злокачественное новообразование. В одном из вариантов осуществления индивидуум является человеком. Термин "не являющееся человеком животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, овца, собака, корова, куры, амфибии, пресмыкающиеся и т.д. Например, способы по настоящему изобретению можно использовать для лечения индивидуума, имеющего злокачественное новообразование. В одном из вариантов осуществления индивидуум является человеком. Термин "не являющееся человеком животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, овца, собака, корова, куры, амфибии, пресмыкающиеся и т.д.

Способы, представленные в настоящем описании, могут включать введение индивидууму "терапевтически эффективного количества" средства (например, антигенсвязывающей молекулы, химерной молекулы, полинуклеотида, конструкции, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции). В рамках изобретения термин "терапевтически эффективное количество" включает нетоксичное, но достаточное количество средства или соединения для обеспечения желаемого терапевтического эффекта. Необходимое точное количество будет варьироваться от индивидуума к индивидууму в зависимости от таких факторов, как биологический вид, подлежащий лечению, возраст и общее состояние здоровья индивидуума, тяжесть состояния, подвергаемого лечению, конкретное вводимое средство и способ введения и т.д. Таким образом, невозможно определить точное "эффективное количество". Однако в любом указанном случае специалист в этой области может определять подходящее "эффективное количество" с использованием всего лишь рутинного экспериментирования.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы, химерной молекулы, полинуклеотида, конструкции, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "лечение" может относиться к (1) профилактике или задержке возникновения одного или более симптомов нарушения; (2) ингибированию развития нарушения или одного или более симптомов нарушения; (3) облегчению нарушения, т.е. вызыванию регрессирования нарушения или по меньшей мере одного или более симптомов нарушения; и/или (4) вызыванию снижения тяжести одного или более симптомов нарушения.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование является раком желудка, раком яичников или раком поджелудочной железы.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, химерной молекуле, полинуклеотиду, конструкции, вектору, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как определено в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, как определено в настоящем описании, или химерной молекуле, как определено в настоящем описании, для применения в лечении злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающей молекулы, химерной молекулы, полинуклеотида, конструкции, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для лечения нуждающегося в этом индивидуума. Индивидуум может являться индивидуумом, страдающим злокачественным новообразованием.

Настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании, в производстве лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения или состояния, ассоциированного с нежелательной экспрессией ALPPL2 у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы, химерной молекулы, полинуклеотида, конструкции, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения или состояния, ассоциированного с нежелательной экспрессией ALPPL2 у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления нарушение или состояние, ассоциированное с нежелательной экспрессией ALPPL2, является злокачественным новообразованием.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование является солидным новообразованием.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование является раком шейки матки, раком толстого кишечника, раком эндометрия, раком желудка, раком яичников или раком поджелудочной железы.

Наборы

Настоящее изобретение относится к набору для детекции злокачественного новообразования, содержащему антигенсвязывающую молекулу или химерную молекулу, как определено в настоящем описании

Способы диагностики

Настоящее изобретение относится к способу определения вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 в

образце по сравнению с референсом свидетельствует о вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума.

В одном из вариантов осуществления способ включает детекцию ALPPL2 с помощью антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает а) детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 в образце по сравнению с референсом свидетельствует о повышенной вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума; и б) лечение индивидуума, как обнаружено, имеющего повышенную вероятность развития злокачественного новообразования.

В одном из вариантов осуществления способ включает детекцию ALPPL2 с помощью антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления способ включает лечение индивидуума с помощью антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу идентификации индивидуума, который, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2, включающему детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 свидетельствует о том, что индивидуум, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2.

В одном из вариантов осуществления способ включает детекцию ALPPL2 с помощью антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании, или химерной молекулы, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу идентификации и лечения индивидуума, который, вероятно, ответит на лечение с помощью антитела против ALPPL2, включающему а) детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 свидетельствует о том, что индивидуум, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2; и б) лечение индивидуума, который, как обнаружено, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2.

В рамках изобретения термин "и/или" относится и включает любые и все возможные комбинации одного или более из связанных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в качестве альтернативы (или).

В рамках изобретения термины в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное. Например, термин "средство" включает множество средств, включая их смеси.

Термин "приблизительно" означает количество, уровень, значение, число, частоту, процент, измерение, размер, массу или длину, варьирующуюся на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9,

8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от референсного количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, массы или длины.

На всем протяжении настоящего описания и следующих заявлений, если контекст не требует иного, термин "содержат" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут понимать как включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий.

В настоящем описании ссылка на любую публикацию предшествующего уровня техники (или информации, полученной из нее) или любые известные сведения не является и не должна восприниматься как признание, допущение или любая форма предположения о том, что эта публикация предшествующего уровня техники (или информация, полученная из нее) или известные сведения составляют часть общеизвестных сведений в области знания, к которой относится настоящее изобретение.

Специалистам в этой области будет понятно, что изобретение, представленное в настоящем описании, подвержено изменениям и модификациям, иным, чем конкретно описанные. Следует понимать, что настоящее изобретение включает все такие изменения и модификации, попадающие в его сущность и объем. Настоящее изобретение также включает все из стадий, признаков, композиций и соединений, упомянутых или указанных в настоящем описании, отдельно или в совокупности, и любые и все комбинации любых двух или более из указанных стадий или признаков.

Некоторые варианты осуществления изобретения далее будут описаны со ссылкой на следующие примеры, предназначенные исключительно для иллюстрирования, а не для ограничения объема описываемого объекта изобретения.

ПРИМЕРЫ

ID мишени и уровень техники

Рак желудка является преобладающим в Восточной Азии заболеванием, при котором 79% пациентов диагноз ставят на стадии IV, при этом пятилетняя выживаемость составляет менее 5%. Новый биомаркер поверхности клетки, ALPPL2, идентифицирован как мишень для терапевтических антител и сопутствующей диагностики. Идентификацию биомаркера осуществляли с помощью данных секвенирования РНК 19 пациентов с раком желудка посредством тщательного биоинформатического анализа.

Экспрессию белка ALPPL2 валидировали в 6 линиях клеток рака желудка с использованием коммерческого антитела против ALPPL2 при иммуногистохимическом окрашивании. Сильное мембранное окрашивание наблюдали в линиях клеток рака желудка, гиперэкспрессирующих мРНК ALPPL2, в то время как не наблюдали очевидного окрашивания в линиях клеток, не гиперэкспрессирующих транскрипт ALPPL2. Также оценивали клиническое преобладание посредством иммуногистохимического окрашивания 2 микропанелей опухолей желудка. Всего окрашивали 198 биоптатов опухоли, полученных с помощью толстоигольной биопсии, на различных стадиях заболевания и из разных областей желудка. Результаты свидетельствуют о том, что 32 из

198 образцов демонстрировали мембранное окрашивание ALPPL2, что составляет 16%. Не наблюдали очевидного мембранного окрашивания в смежных совпадающих и несовпадающих нормальных тканях.

Получение антител

Антитела против ALPPL2 человека получали посредством иммунизации кроликов антигеном. Антитела кролика выделяли посредством клонирования генов антитела непосредственно из отдельных В-клеток кролика.

Во время скрининга выбирали клоны, связывающиеся с ALPPL2, но не с родственным ALPI, экспрессирующимся в нормальной ткани кишечника (фигуры 1 и 2). Всего выделяли 36 клонов с высокой аффинностью к ALPP/ALPPL2 человека. Аминокислотные последовательности варьируемых областей и определяющих комплементарность областей приведены в таблице 1 и 2.

Аффинность и специфичность

Специфические клоны подвергали скринингу и идентифицировали с помощью ELISA и высокопроизводительной проточной цитометрии (фигура 3). Клетки почки кролика трансфицировали с использованием укороченных (для скрининга посредством ELISA) или полноразмерных (для скрининга посредством FACS) ALPI и ALPPL2.

Подгруппу клонов со специфичностью к ALPPL2/ALPP, но не ALPI подвергали дополнительной селекции по измерению аффинности с использованием интерферометрии биослоя (фигура 3). В этом способе одну концентрацию супернатанта разных клонов В-клеток кролика иммобилизовали на биосенсорах с протеином А. Затем биосенсоры инкубировали с анализом для измерения аффинности.

Конструировали сравнимое гуманизованное моноклональное антитело, описанное на предшествующем уровне техники, пересаживая CDR на тот же каркас, для оценки связывания с ALPPL2 и ALPI посредством ELISA. Сравнимое гуманизованное моноклональное антитело имеет следующие последовательности V_H и V_L :

V_H	V_L
QVQLQQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD
SSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN	VGGYNYVSWYQQHPGKAPKVMIDV
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL	TNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ
RAEDTAVYFCAKEGDSSRWSYDLWGRGT	AEDEADYYCSSYTSTSTLVVFGGGTK
LVTVSS (SEQ ID NO: 324)	LTVLG (SEQ ID NO: 325)

Ген синтезировали и клонировали в экспрессирующий вектор для получения рекомбинантного антитела. Данные поверхностного плазмонного резонанса на фигуре 4 свидетельствуют о том, что антитело, описанное на предшествующем уровне техники, демонстрирует неспецифическое связывание с ALPI, но не антитела по настоящему изобретению.

Активность при иммуногистохимии (ИНС)

Чтобы сделать возможной разработку сопутствующего диагностического средства оценивали активность антител при ИНС (фигура 5). Демаскирование антигена посредством расщепления протеиназой-К, но не термическое демаскирование антигена, делает возможной детекцию. С36, С45 и С130 делали возможной детекцию в ALPPL2 +ve линиях клеток (SCH) и фиксированных формалином, погруженных в парафин (FFPE) тканях опухолей человека посредством ИНС. Это свидетельствует о том, что антитела могут иметь диагностическое применение в стратификации пациентов и терапевтическое применение для лечения ALPPL2/ALPP +ve опухолей, включая рак желудка, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, мезотелиому и рак яичка. С36 демонстрирует отрицательное окрашивание во всех нормальных тканях, за исключением плаценты, что позволяет предположить, что ALPPL/ALPP не имеет/имеет низкую экспрессию в нормальных тканях. Это также свидетельствует об оптимальном терапевтическом окне этих антител в клинических условиях.

Перекрестная реактивность с не являющимся человеком приматом (NHP)

Антитела дополнительно оценивали на перекрестную реактивность в отношении ортологов не являющихся человеком приматов (фигура 6). Выбранные клоны демонстрировали реактивность в отношении ортолога макака-резуса.

Гуманизированные клоны (аффинность, селективность и специфичность)

Выбранные клоны (С4, С15, С131, С12, С18, С36 и С53) гуманизировали посредством пересадки CDR на каркас IgG1 человека. С использованием поверхностного плазмонного резонанса показано, что эти гуманизированные клоны сохраняют высокую аффинность к ALPP/ALPPL2 (фигура 7). Анализ поверхностного плазмонного резонанса осуществляли с использованием Biacore T200. Лиганды (например, ALPPL2 или ALPP) иммобилизовали на биосенсорных чипах CM5 и захватывали с помощью стрептавидина. Затем нагруженные лигандами сенсоры инкубировали с разными концентрациями аналита (рекомбинантно экспрессируемых, гуманизированных клонов антител) для измерения аффинности.

Гуманизированные клоны (С4, С36 и С53) сохраняли селективность в отношении опухолеспецифического ALPPL2 и/или ALPP, но не широко экспрессируемых ALPI и ALPL (фигура 13). Гуманизированные клоны также являлись специфическими в отношении злокачественных клеток, но не нормальных наивных и стимулированных иммунных клеток (фигура 13).

Гуманизированные клоны (ADCC)

Терапевтическую эффективность гуманизированных клонов тестировали, сначала оценивая антителозависимую клеточную токсичность посредством сокультивирования репортерных или первичных NK-клеток с линиями злокачественных клеток (фигура 8). С4 приводило к наиболее мощной индукции ADCC в обеих линиях клеток рака желудка с высокой и низкой экспрессией мишени по сравнению с другими клонами. Мощность С4 подтверждали в анализе совместного культивирования первичных NK-клеток с разными линиями клеток рака желудка. С4 достигало почти полного уничтожения

высокоэкспрессирующей линии клеток и демонстрировало мощность (максимальный % уничтожения и EC_{50}), пропорциональную уровню экспрессии мишени. Кроме того, С4 также тестировали в репортерном анализе и подтверждали индуцирование ADCC разными линиями клеток рака яичников и рака поджелудочной железы.

Fc-область гуманизированного С4 дополнительно конструировали для повышения ADCC. С помощью репортерного анализа подтверждали, что более гуманизированное С4 со сконструированным Fc активнее индуцировало ADCC с помощью линии клеток рака желудка.

Гуманизированные клоны (ADC)

Оценивали пригодность использования этих гуманизированных антител в качестве конъюгата антитело-лекарственное средство. Сначала тестировали уничтожение линий клеток рака желудка этими антителами в присутствии вторичных антител, конъюгированных с vc-MMAF (фигура 9). Анализ вторичных ADC показал некоторые различия мощности среди клонов; уничтожение наблюдали только в некоторых линиях клеток рака желудка с высокой экспрессией мишени, но не других. Эти результаты подтверждали с использованием тех же антител, конъюгированных с vc-MMAE. Первичная конъюгация антител с vc-MMAE потенцировала уничтожение тех же линий клеток рака желудка, наблюдаемое в анализе вторичных ADC.

Гуманизированные клоны (рекрутеры Т-клеток)

Далее было показано, что эти гуманизированные антитела можно успешно адаптировать для использования в качестве рекрутеров Т-клеток для индуцирования мощного опосредованного Т-клетками уничтожения злокачественных клеток (фигура 10, фигура 11 и фигура 12). Биспецифические антитела благодаря гетеродимеризации гуманизированных клонов с антителами против CD3 достигали мощного и специфического уничтожения линий клеток пара желудка, рака яичников и рака поджелудочной железы, независимо от уровня экспрессии мишени. В частности, с помощью С4 достигали почти полного уничтожения множества линий злокачественных клеток при пиколярных концентрациях.

ALPPL2-специфический клон

Химеризованный и гуманизированный клон С53 демонстрировал специфичность связывания с ALPPL2, но не ALPP (фигура 12). Химеризованный С53 также перекрестно реагировал с ортологом макака-резуса. Аффинность связывания гуманизированного С53 по сравнению с гуманизированным С36 с ALPPL и ALPP определяли с использованием интерферометрии биослоя. В этом способе биотинилированные лиганды (т.е. ALPPL2 или ALPP) иммобилизовали на биосенсорах SA. Затем нагруженные лигандами сенсоры инкубировали с разными концентрациями аналита (рекомбинантно экспрессируемыми гуманизированными клонами антител) в буфере. Гуманизированное антитело С53 демонстрировало аффинность связывания в наномолярном диапазоне с ALPPL, но не ALPP, что определяли посредством интерферометрии биослоя, в то время как

гуманизированное C36 демонстрировало схожую аффинность связывания с ALPPL2 и ALPP.

Дополнительно было показано, что гуманизированное антитело C53 поддерживало свою цитолитическую активность в ADCC и адаптировано для использования в качестве рекрутера Т-клеток для индуцирования мощного опосредованного Т-клетками уничтожения злокачественных клеток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ALPPL2 и/или ALPP, но не ALPL или ALPI, содержащая:

а) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотные последовательности VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3; и

б) вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотные последовательности VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3; где комбинация аминокислотных последовательностей VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 приведена в любой из строк в таблице 1.

2. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула специфически связывается с ALPPL2 и/или ALPP или клеткой, экспрессирующей ALPPL2 и/или ALPP, с аффинностью приблизительно от 14 пМ до приблизительно 10 нМ.

3. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула специфически связывается с ортологом макака-резуса ALPPL2/ALPP.

4. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула содержит а) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117; и б) вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120.

5. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула содержит:

а) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности V_H , как приведено в любой из строк таблицы 2 или таблицы 3, и

б) аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) в отношении аминокислотной последовательности V_L , приведенной в той же строке в таблице 2 или таблице 3, что и аминокислотная последовательность V_H .

6. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула содержит:

а) аминокислотную последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 291, и

б) аминокислотную последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (включая по меньшей мере от 91% до 100% и все целые значения процентных долей между ними) в отношении SEQ ID NO: 292.

7. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула не связывается с ALPP.

8. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где антигенсвязывающая молекула

является антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, или химерным антигенным рецептором (CAR).

9. Антигенсвязывающая молекула по п.8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным или химеризованным.

10. Антигенсвязывающая молекула по п.8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является полноразмерным антителом, по существу интактным антителом, Fab-фрагментом, scFab, Fab', одноцепочечным переменным фрагментом (scFv) или одноплечевым антителом.

11. Антигенсвязывающая молекула по п.8, где антитело является биспецифическим или триспецифическим антителом.

12. Антигенсвязывающая молекула по п.11, где биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий участок, специфически связывающийся с ALPPL2, и второй антигенсвязывающий участок, специфически связывающийся с CD3.

13. Химерная молекула, содержащая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-12 и гетерологичное вещество.

14. Химерная молекула по п.13, где гетерологичное вещество является детектируемым веществом, увеличивающим время полужизни веществом или терапевтическим веществом.

15. Химерная молекула по п.14, где терапевтическое вещество является монOMETИЛАУРИСТАТИНОМ F (MMAF) или монOMETИЛАУРИСТАТИНОМ E (MMAE).

16. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-10 или химерную молекулу по любому из пп.13-15.

17. Конструкция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-12 или химерную молекулу по любому из пп.13-15 в функциональной связи с одной или более контрольными последовательностями.

18. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию по п.17.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-12 или химерную молекулу по любому из пп.13-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ снижения экспрессии или активности ALPPL2 в злокачественной клетке, включающий приведение злокачественной клетки в контакт с антигенсвязывающей молекулой по любому из пп.1-12 или химерной молекулой по любому из пп.13-15.

21. Способ снижения или ингибирования пролиферации, выживания и жизнеспособности опухоли у индивидуума, включающий введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15.

22. Способ лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ

включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15.

23. Способ по п.22, где злокачественное новообразование является колоректальным раком, раком эндометрия, раком желудка, мезотелиомой, раком яичников, раком поджелудочной железы или раком яичка.

24. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-12 или химерная молекула по любому из пп.13-15 для применения в лечении злокачественного новообразования.

25. Применение антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15 в производстве лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

26. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с нежелательной экспрессией ALPPL2 у индивидуума, где способ включает введение индивидууму антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15.

27. Набор для детекции злокачественного новообразования, содержащий антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-12 или химерную молекулу по любому из пп.13-15.

28. Способ определения вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 в образце по сравнению с референсом свидетельствует о вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума.

29. Способ по п.28, где способ включает детекцию ALPPL2 с помощью антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15.

30. Способ лечения злокачественного новообразования у индивидуума, где способ включает а) детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 в образце по сравнению с референсом свидетельствует о повышенной вероятности развития злокачественного новообразования у индивидуума; и б) лечение индивидуума, как обнаружено, имеющего повышенную вероятность развития злокачественного новообразования.

31. Способ по п.30, где способ включает детекцию ALPPL2 с помощью антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15.

32. Способ по п.31, где способ включает лечение индивидуума антигенсвязывающей молекулой по любому из пп.1-12 или химерной молекулой по любому из пп.13-15.

33. Способ идентификации индивидуума, который, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2, включающий детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 свидетельствует о том, что индивидуум,

вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2.

34. Способ по п.33, где способ включает детекцию ALPPL2 с помощью антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-12 или химерной молекулы по любому из пп.13-15.

35. Способ идентификации и лечения индивидуума, который, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2, включающий а) детекцию ALPPL2 в образце, полученном из индивидуума, где повышенный уровень ALPPL2 свидетельствует о том, что индивидуум, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2; и б) лечение индивидуума, который, как обнаружено, вероятно, ответит на лечение антителом против ALPPL2.

36. Способ получения антигенсвязывающей молекулы, специфически связывающейся с ALPPL2, но не ALPL или ALPI, включающий:

- а) иммунизацию животного, предпочтительно кролика, с помощью ALPPL2,
- б) выделение из животного В-клетки, специфически связывающейся с ALPPL2, но не ALPL или ALPI, и
- в) определение аминокислотной последовательности антитела, экспрессируемого В-клеткой.

По доверенности

1/20

ФИГ.1

Ткани опухоли желудка и совпадающие
нормальные ткани (19 пар)

↓
Тотальная РНК

↓
кДНК

↓
Получение библиотеки, 250-300 п.н.

↓
Секвенирование РНК, Illumina End-pair, HiSeq200

↓
Биоинформатический анализ для идентификации генов,
гиперэкспрессированных в опухолевых тканях

994 гиперэкспрессированных
гена кратное изменение в
опухоли/нормальной ткани ≥ 2

Селекция
вручную
→

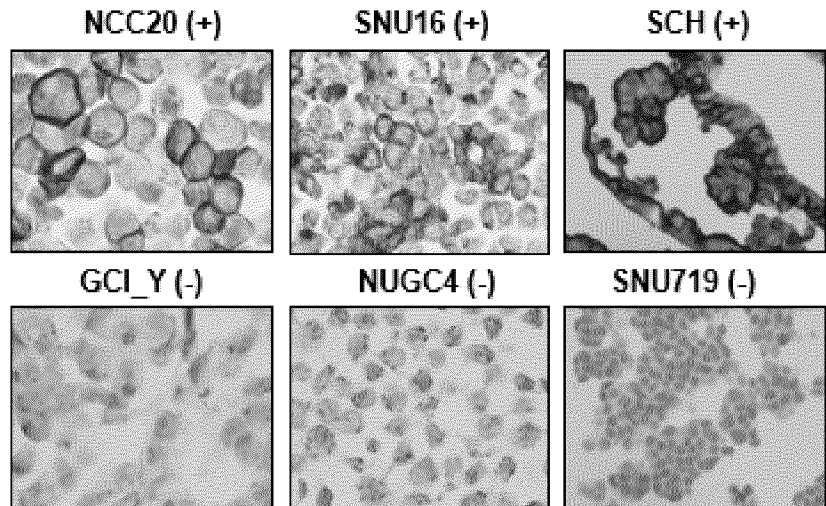
- Мембранные белки
- Ограниченная экспрессия в нормальных тканях
- Высокая частота рецидивов у пациентов
- Гиперэкспрессия в линиях клеток рака желудка
- Опубликованные TCGA и протеомные исследования

Ген	ФРKM в норме	ФРKM в опухоли	Кратное изменение	Частота		Экспрессия в нормальных тканях
				Опухоль>1, норма<0.5	Опухоль>5, норма<0.5	
<i>TM4SSF19</i>	0.19	1.21	6.28	9/19	0/19	отсутствие экспрессии/низкая экспрессия
<i>ALPPL2</i>	0.026	7.74	292.79	4/19	2/19	плацента
<i>TMPRSS13</i>	0.18	2.84	16.02	6/19	4/19	головной мозг, тонкий кишечник, двенадцатиперстная кишка, предстательная железа, кожа
<i>CDH12</i>	0.092	2.19	23.71	4/19	2/19	головной мозг, надпочечник, фаллопиева труба
<i>GLDN6</i>	0.02	4.88	233.50	4/19	2/19	отсутствие экспрессии/низкая экспрессия, эмбриональные/плюрипотентные стволовые клетки
<i>CEACAM7</i>	1.56	9.34	5.99	7/19	4/19	аппендикс, толстый кишечник, прямая кишка
<i>SLCO1A2</i>	0.030	1.43	48.05	6/19	2/19	головной мозг, слюнная железа
<i>SLCO1B3</i>	0.29	2.26	7.89	3/19	2/19	печень
<i>SSTR5</i>	0.27	1.42	5.30	5/19	2/19	отсутствие экспрессии/низкая экспрессия
<i>IL13RA2</i>	0.24	1.94	8.07	8/19	2/19	яичко, головной мозг, почка

ФИГ.2

Значения FPKM при секвенировании РНК

Линии клеток	ALPPL2
SCH	40.85
NCC20	17.56
SNU16	13.50
SNU719	0.00
GCI_Y	0.56
NUGC4	0.00

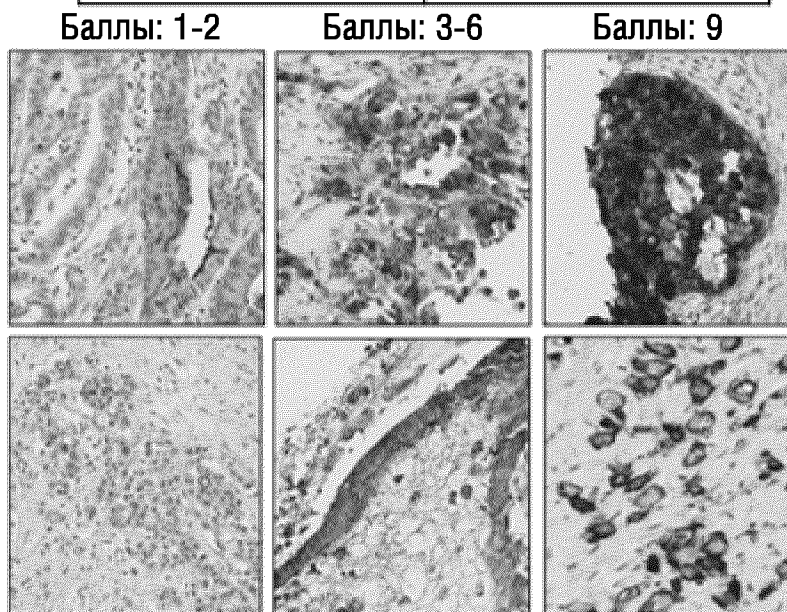


% положительных клеток: 1-9% (1); 10-50% (2); >50% (3)

Интенсивность окрашивания: слабая (1); умеренная (2); сильная (3)

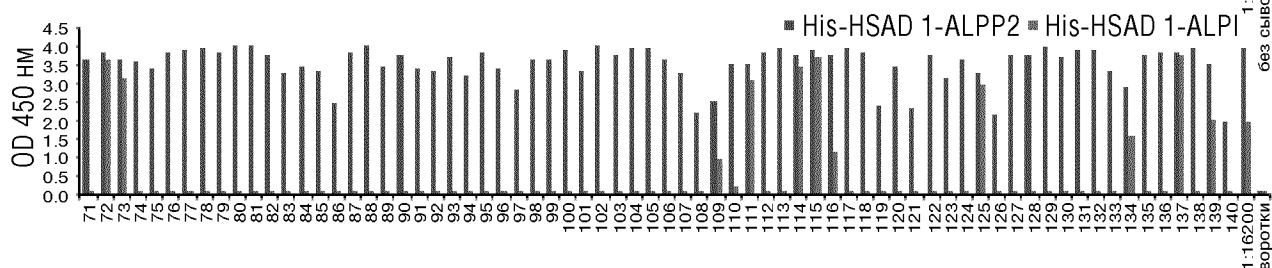
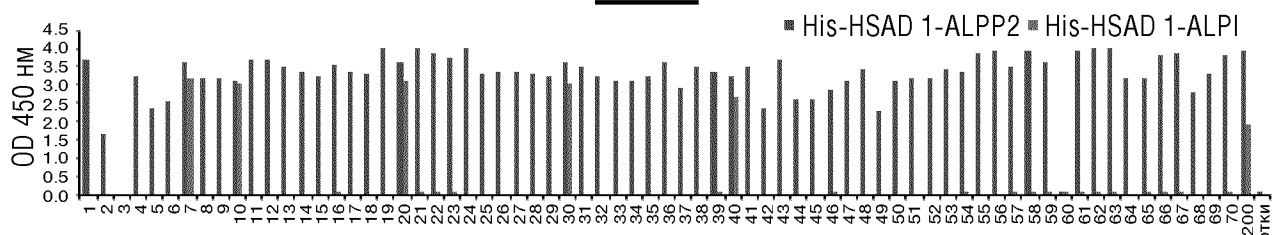
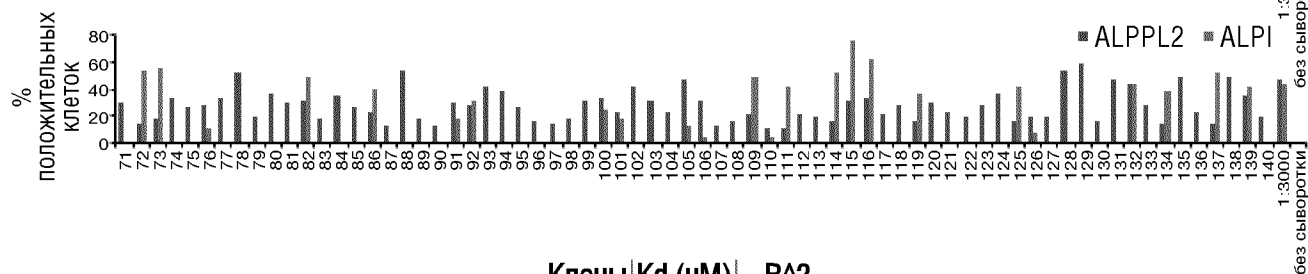
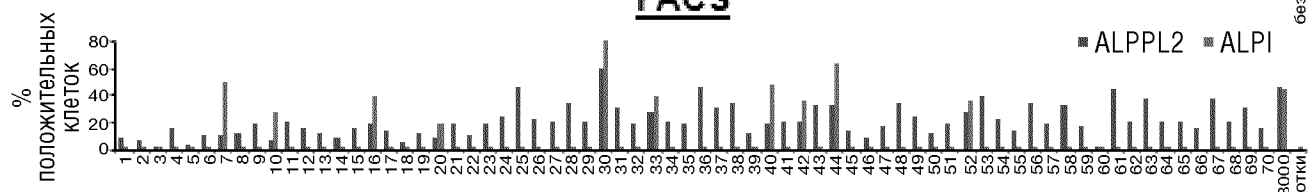
Баллы = % положительных клеток x интенсивность окрашивания

Баллы	Кол-во случаев
0	166 (85%)
1 – 2	9
3 – 6	18
9	5
1 – 9	32 (15%)



20x

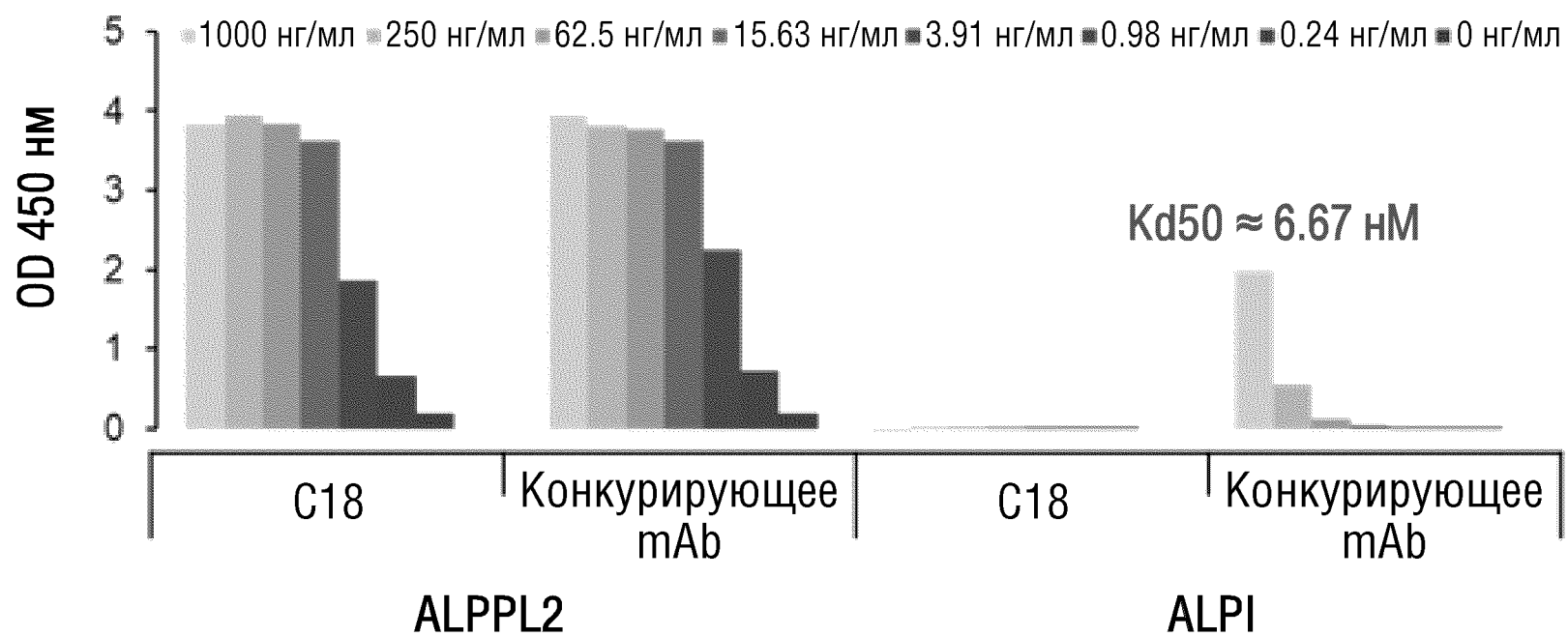
ФИГ.3

ELISA**FACS**

Клоны	Kd (нМ)	R ²
C4	0.001	100
C129	0.001	0.9984
C130	0.001	0.92864
C136	0.1	99.9
C10	0.15	99.9
C29	0.2	99.7
C138	0.2	99.8
C31	0.4	99.5
C102	0.5	0.99754
C15	0.6	0.99577
C12	0.8	0.98874
C133	1	0.92345
C18	1.4	0.97532
C25	1.4	0.97532
C21	1.4	0.93144
C36	1.6	98.5
C124	1.6	0.91724
C19	1.69	0.92002
C127	1.7	0.99172
C39	2	0.88134
C35	4.1	0.92625
C131	8	0.99966

ФИГ.4

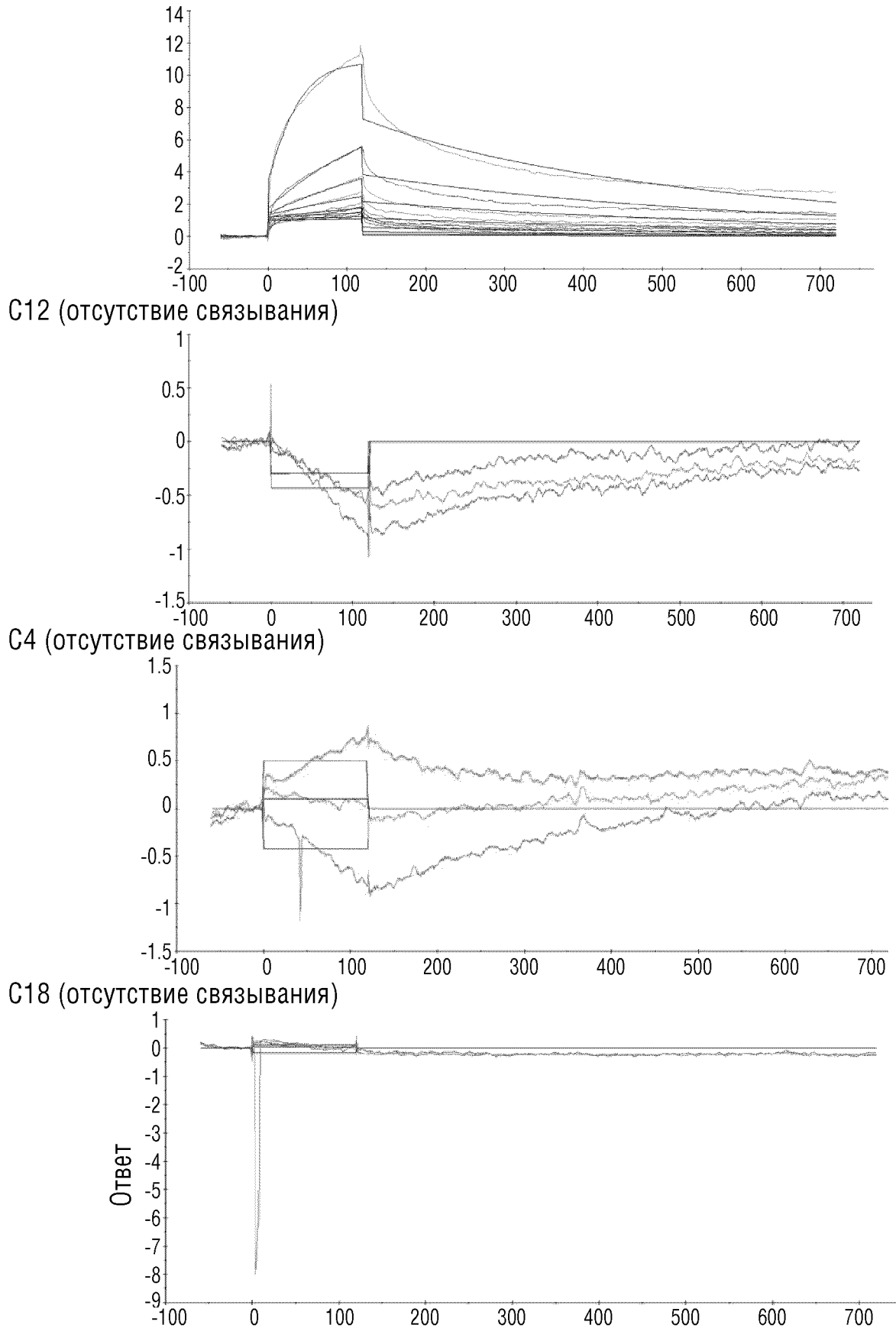
ELISA (реакционная способность в отношении ALPPL2 и ALPI)



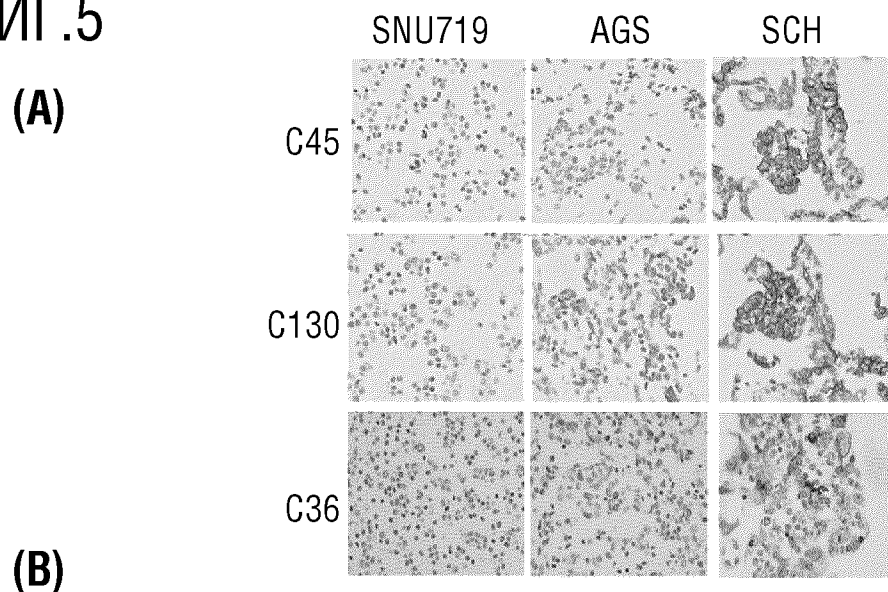
ФИГ.4 (продолжение)

SPR (реакционная способность в отношении ALPI)

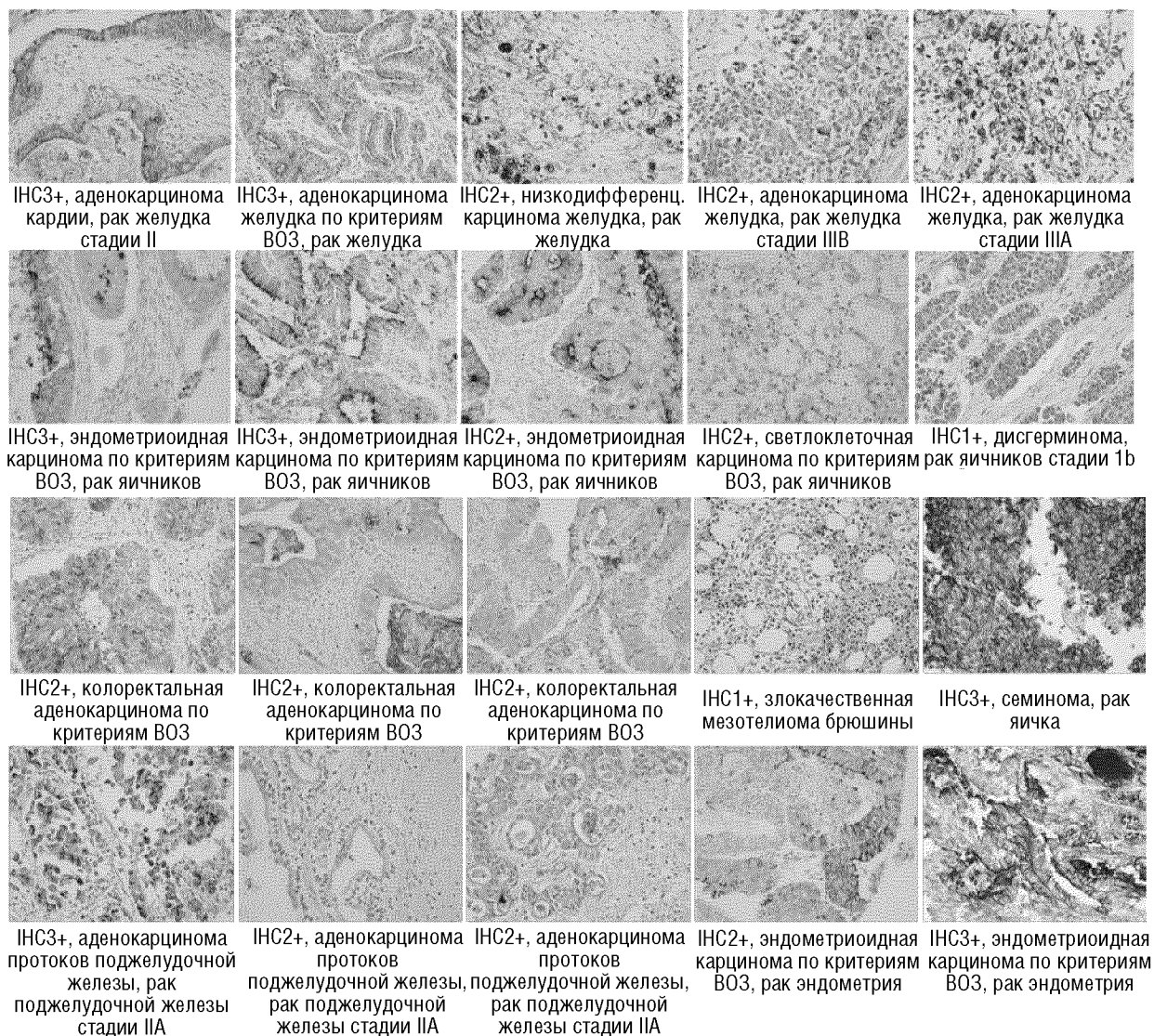
Конкурирующее mAb (Kd=3.63 нМ)



ФИГ.5



(B)



Типичные изображения получены с помощью светлопольного микроскопа с 40-кратным увеличением при одинаковой интенсивности света

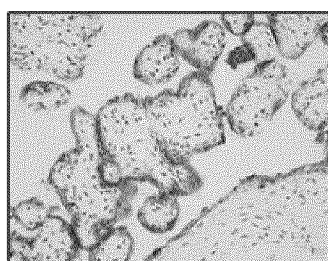
Н-баллы = $([1 \times (\% \text{ клеток A } 1+) + 2 \times (\% \text{ клеток B } 2+) + 3 \times (\% \text{ клеток C } 3+)]$ и А, В, С представляют собой % клеток (до ближайшего 5%) при интенсивности 1, 2, 3 соответственно;

Н-баллы: 0-100 = IHC1+, 101-200 = IHC2+, 201-300 = IHC3+

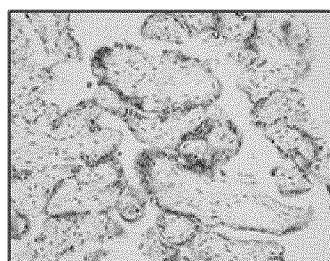
ФИГ.5 (продолжение)

(С)

Анатомическая структура	Результат	Количество биоптатов	Н-баллы	ИНС
Надпочечник	Отрицательный	3		
Мочевой пузырь	Отрицательный	3		
Костный мозг	Отрицательный	1		
Глаз	Отрицательный	3		
Молочная железа	Отрицательный	3		
Мозжечок	Отрицательный	3		
Кора головного мозга	Отрицательный	2		
Фаллопиева труба	Отрицательный	3		
ЖКТ-пищевод	Отрицательный	3		
ЖКТ-желудок	Отрицательный	3		
ЖКТ-тонкий кишечник	Отрицательный	3		
ЖКТ-толстый кишечник	Отрицательный	3		
ЖКТ-прямая кишка	Отрицательный	3		
Сердце	Отрицательный	3		
Почка	Отрицательный	6		
Печень	Отрицательный	3		
Легкое	Отрицательный	2		
Яичник	Отрицательный	3		
Поджелудочная железа	Отрицательный	3		
Паразитовидная железа	Отрицательный	1		
Гипофиз	Отрицательный	2		
Плацента	Положительный	3	75-195	ИНС2+
Предстательная железа	Отрицательный	3		
Кожа	Отрицательный	2		
Спинной мозг	Отрицательный	2		
Селезенка	Отрицательный	2		
Поперечнополосатая мышца	Отрицательный	3		
Яичко	Отрицательный	3		
Тимус	Отрицательный	3		
Щитовидная железа	Отрицательный	3		
Миндалины	Отрицательный	3		
Мочеточник	Отрицательный	3		
Матка-шейка матки	Отрицательный	3		
Матка-эндометрий	Отрицательный	3		



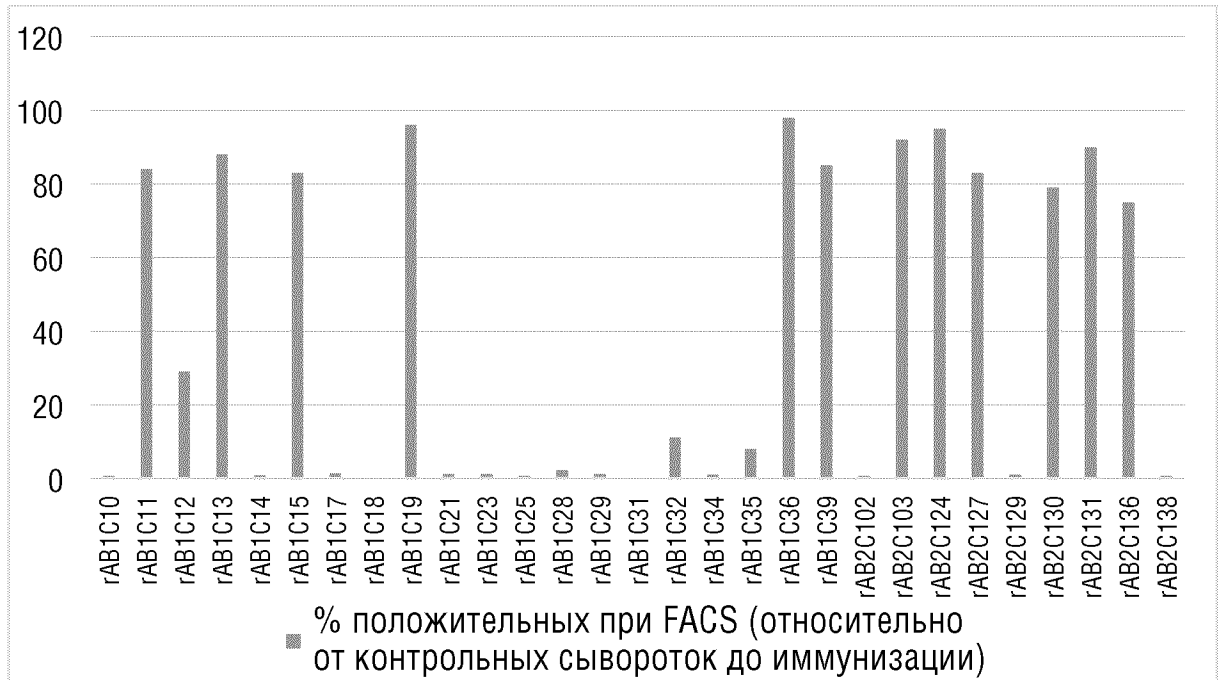
IHC2+, ткани плаценты



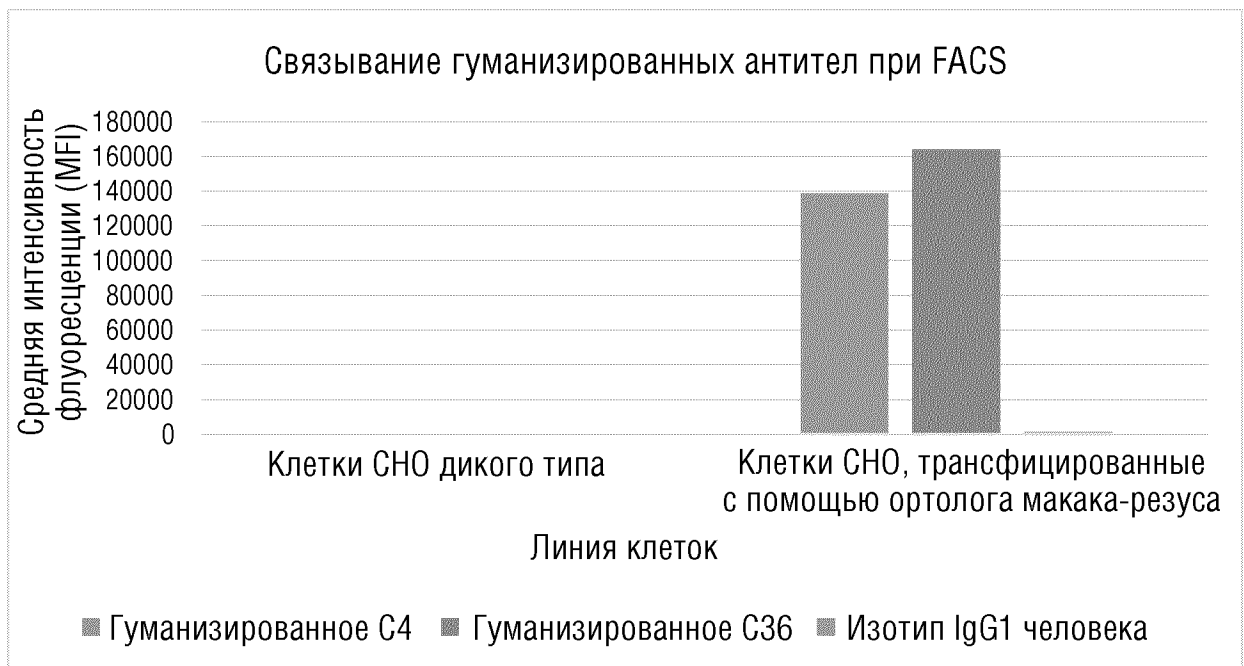
IHC2+, ткани плаценты

ФИГ.6

(A)



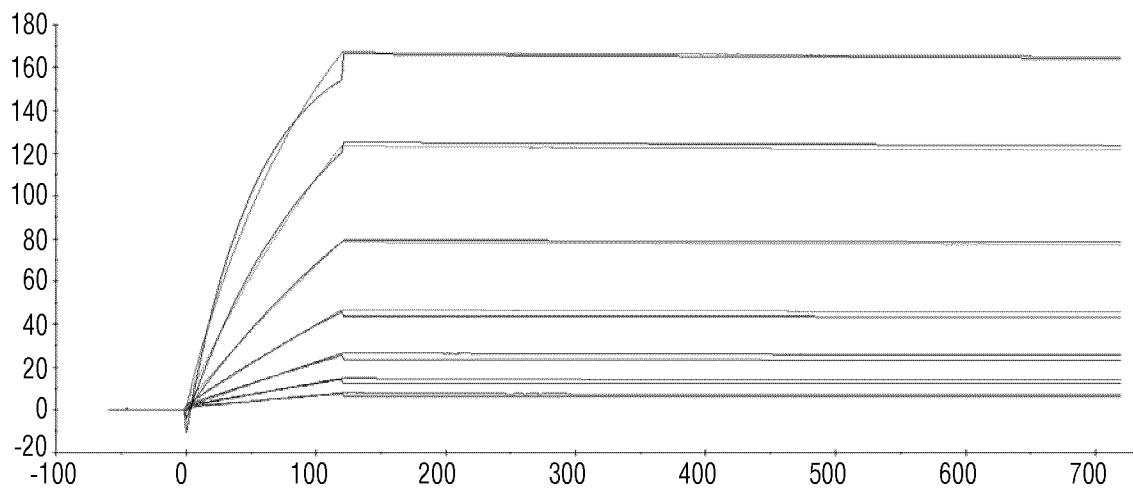
(B)



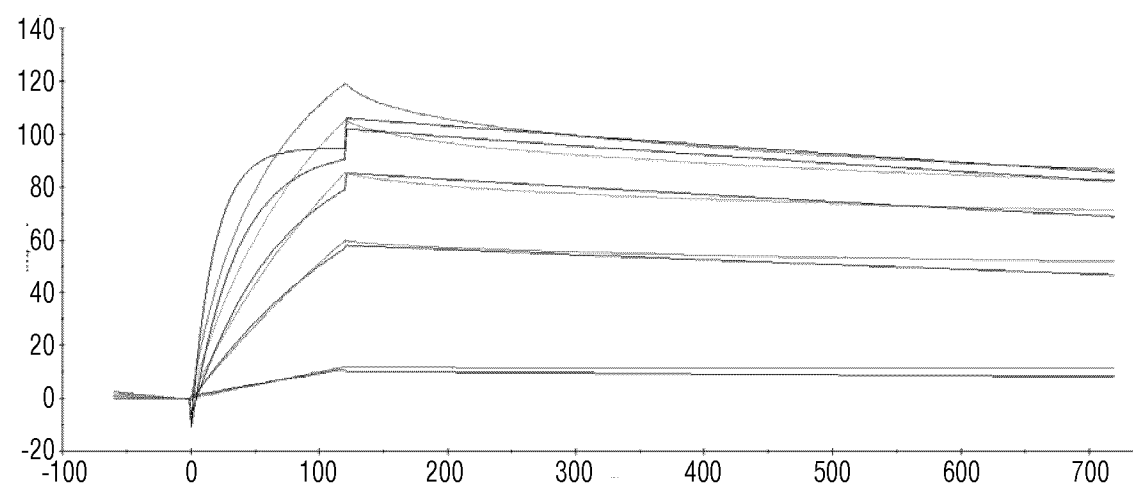
ФИГ.7

SPR (ALPPL2)

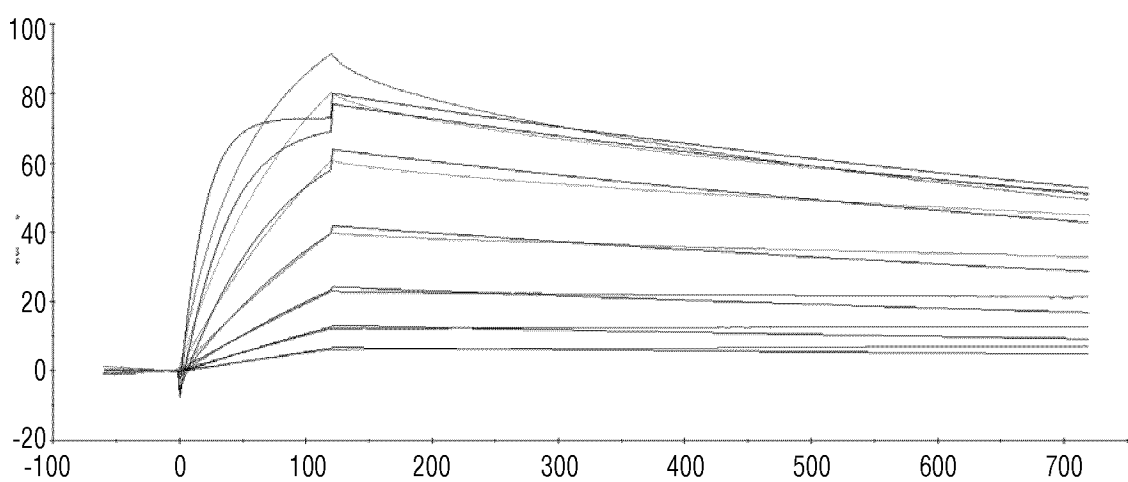
C4



C12



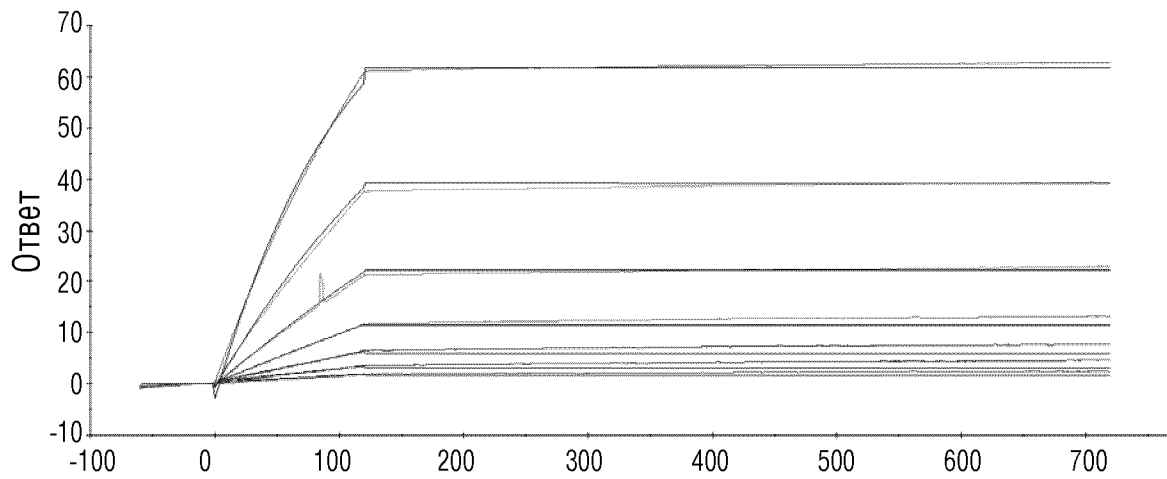
C18



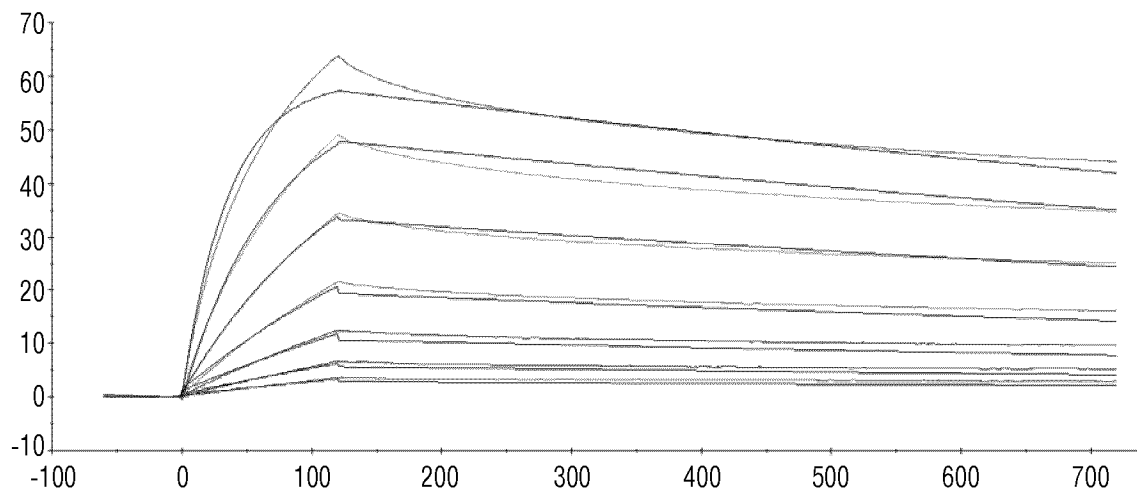
ФИГ.7 (продолжение)

SPR (ALPP)

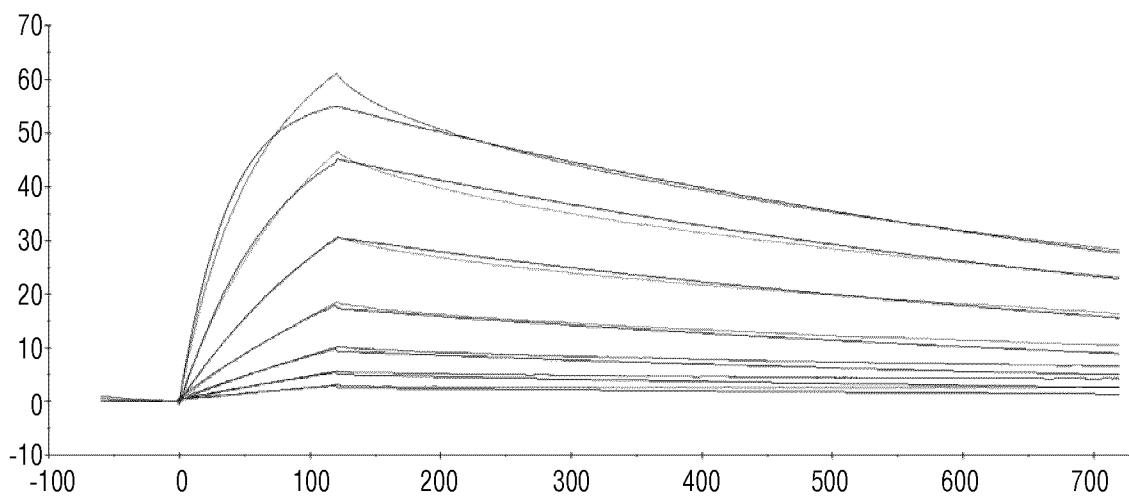
C4



C12



C18

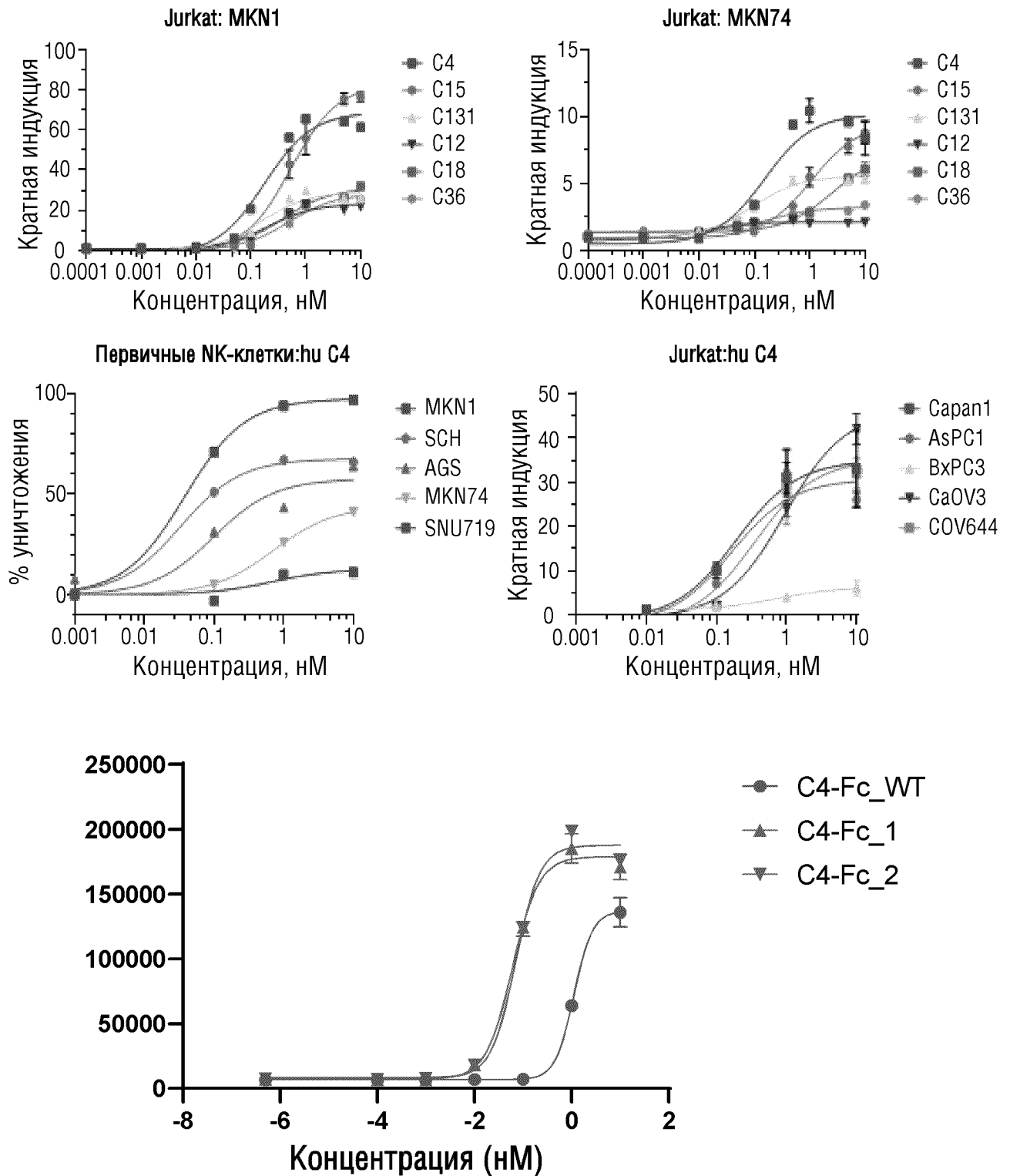


ФИГ.7 (продолжение)

Измерения аффинности (K_D)

	ALPP2	ALPP
C4	14 пМ	0.1 пМ
C12	80 пМ	235 пМ
C18	144 пМ	526 пМ

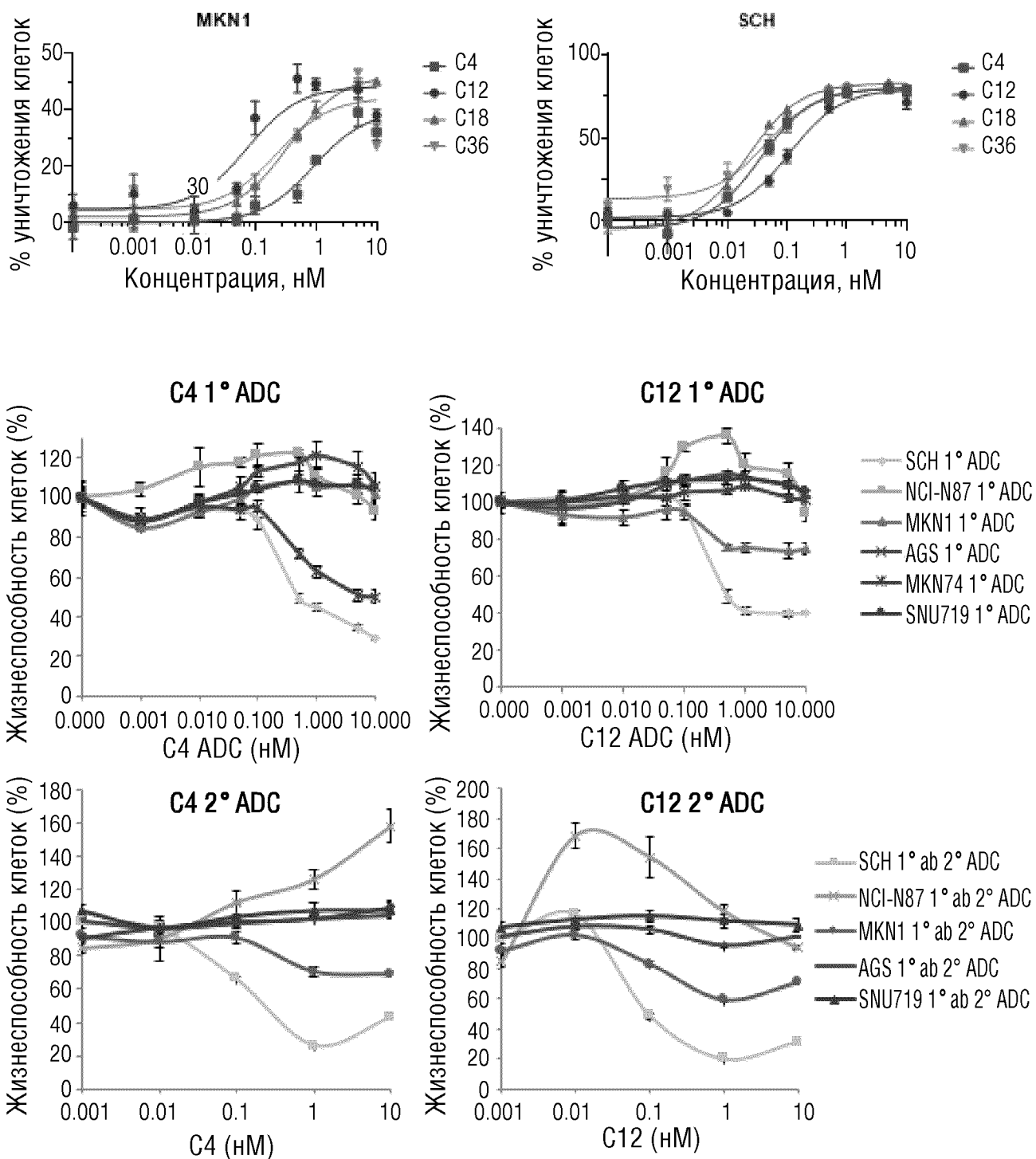
ФИГ.8



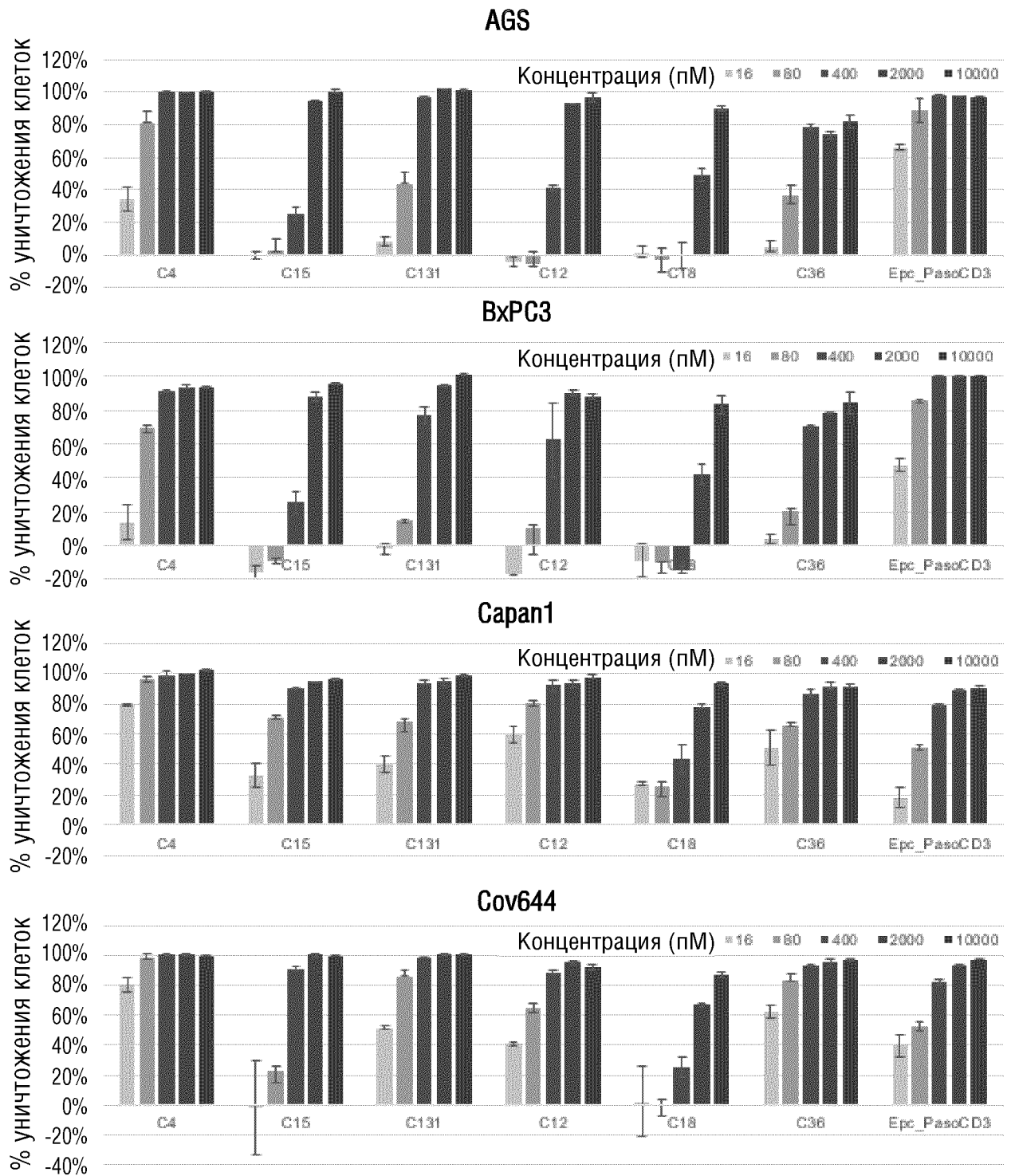
Мутации Fc-1 (S239D, A330L, I332E)

Мутации Fc-2 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L)

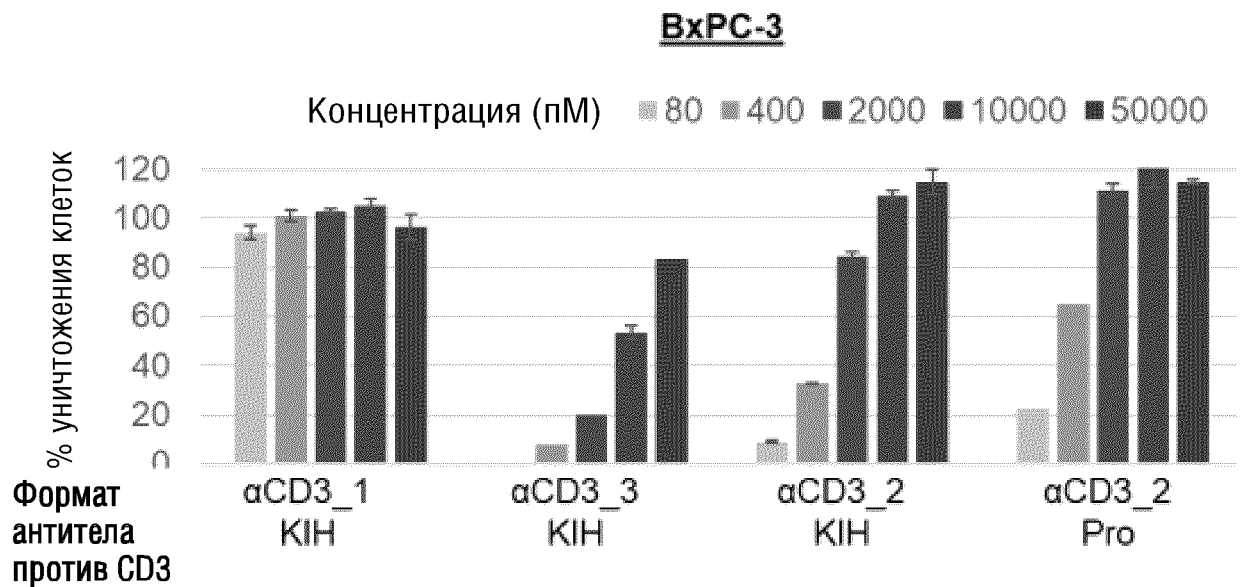
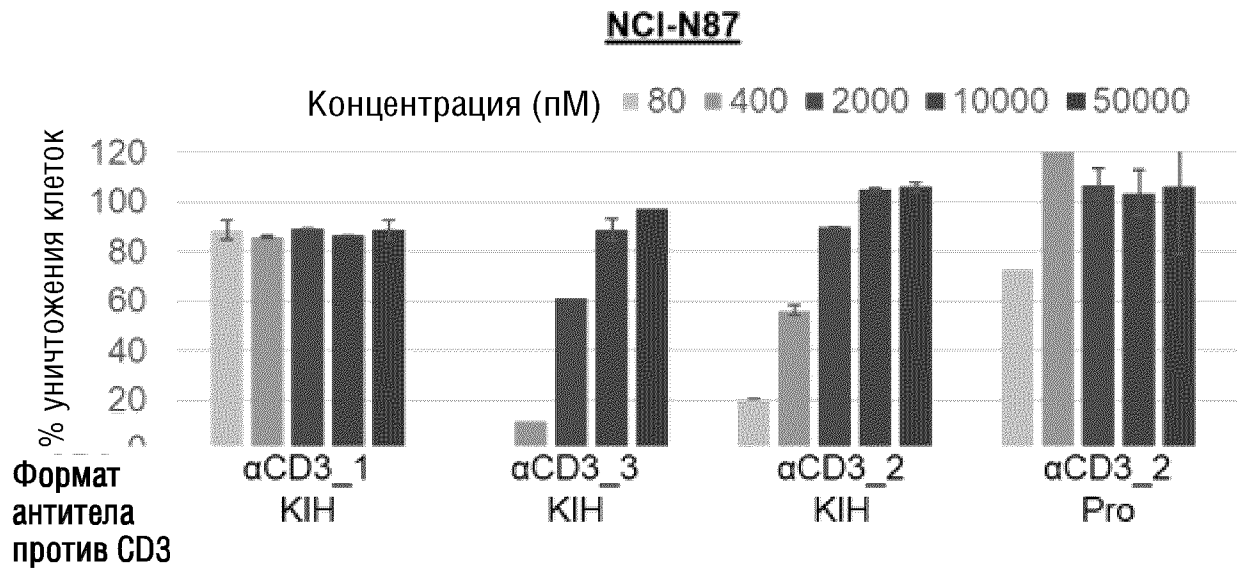
ФИГ.9



ФИГ.10

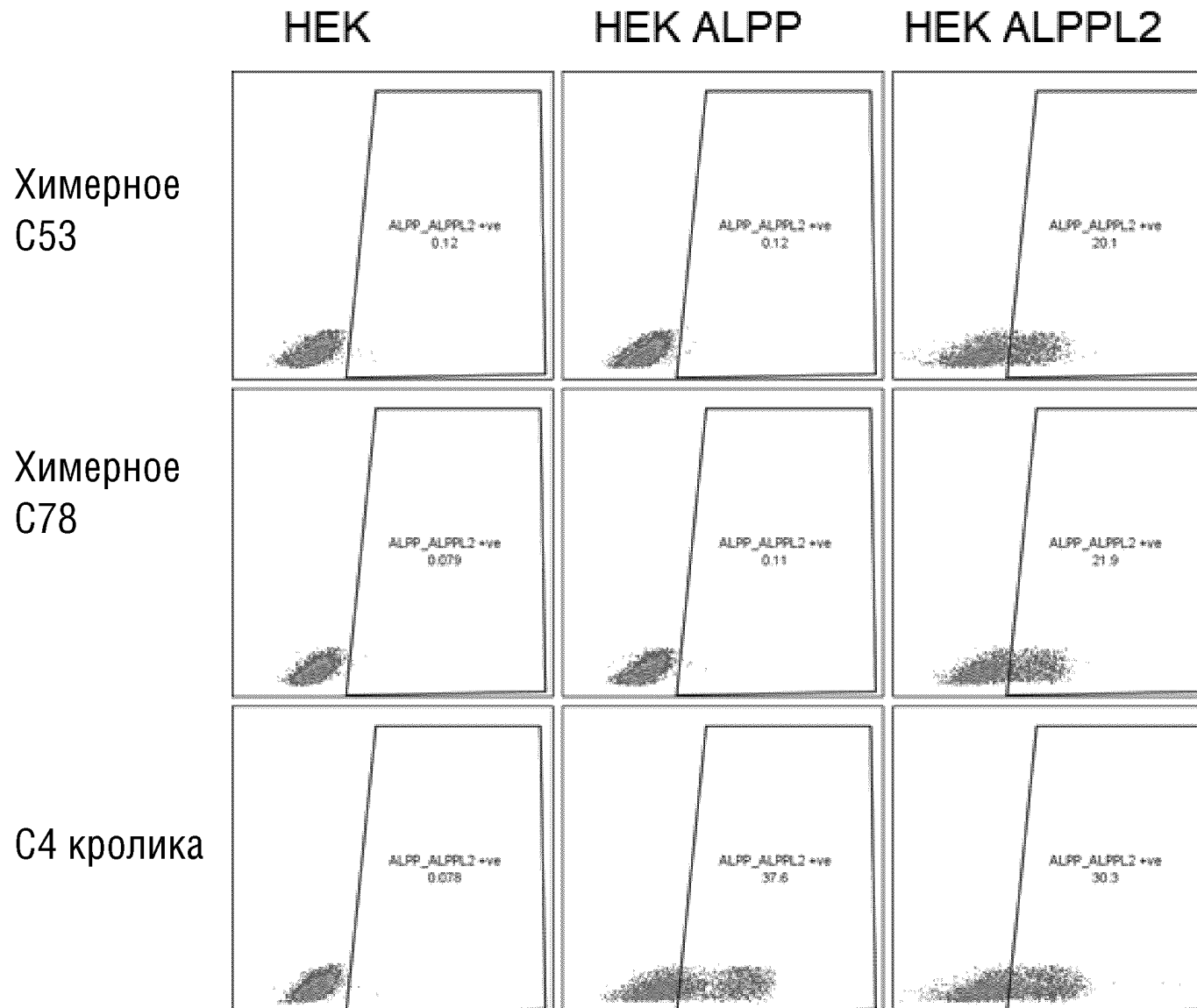


ФИГ.11



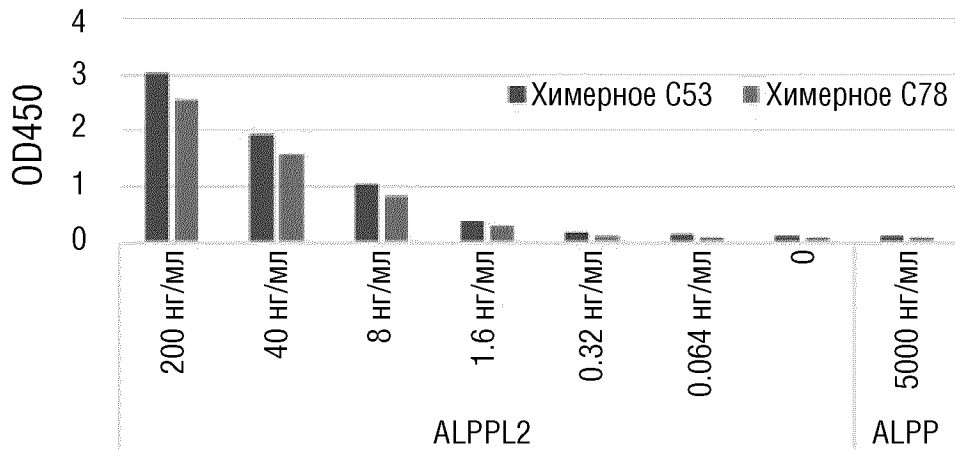
ФИГ.12

(A)

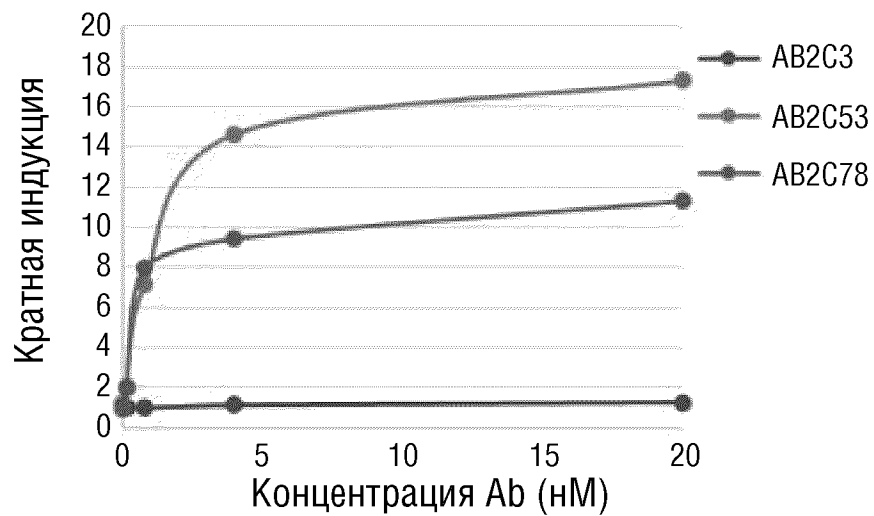


ФИГ.12 (продолжение)

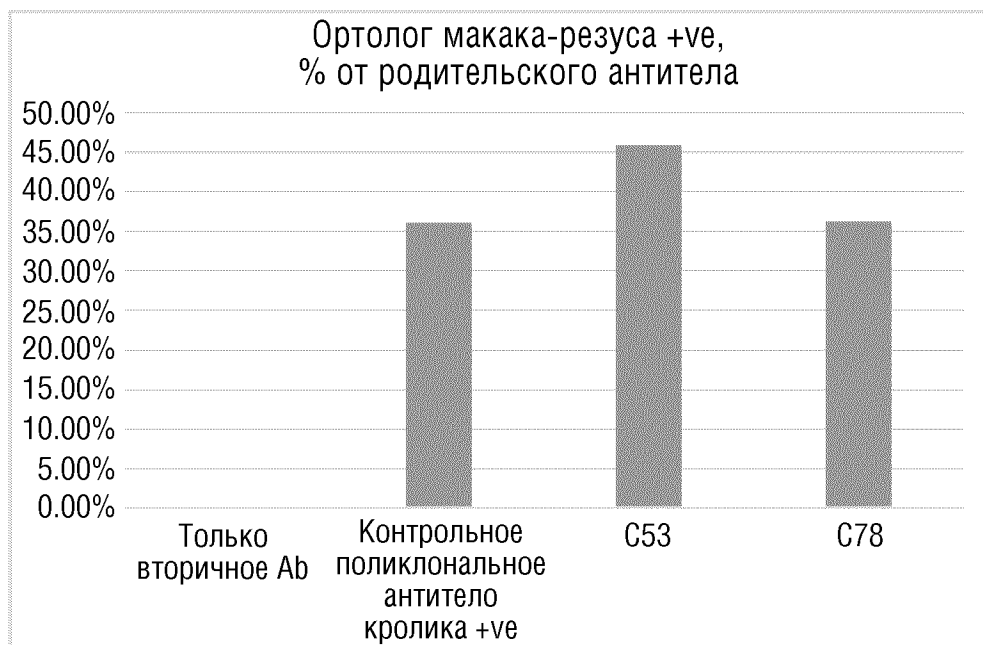
(B)



(C)

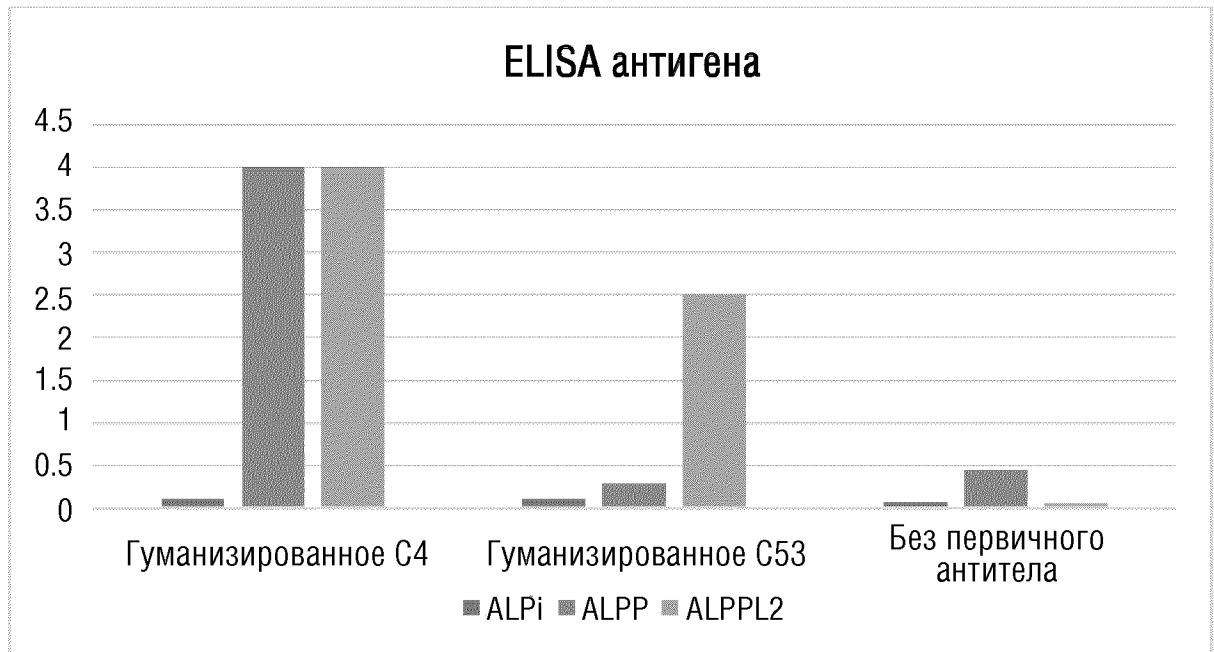


(D)

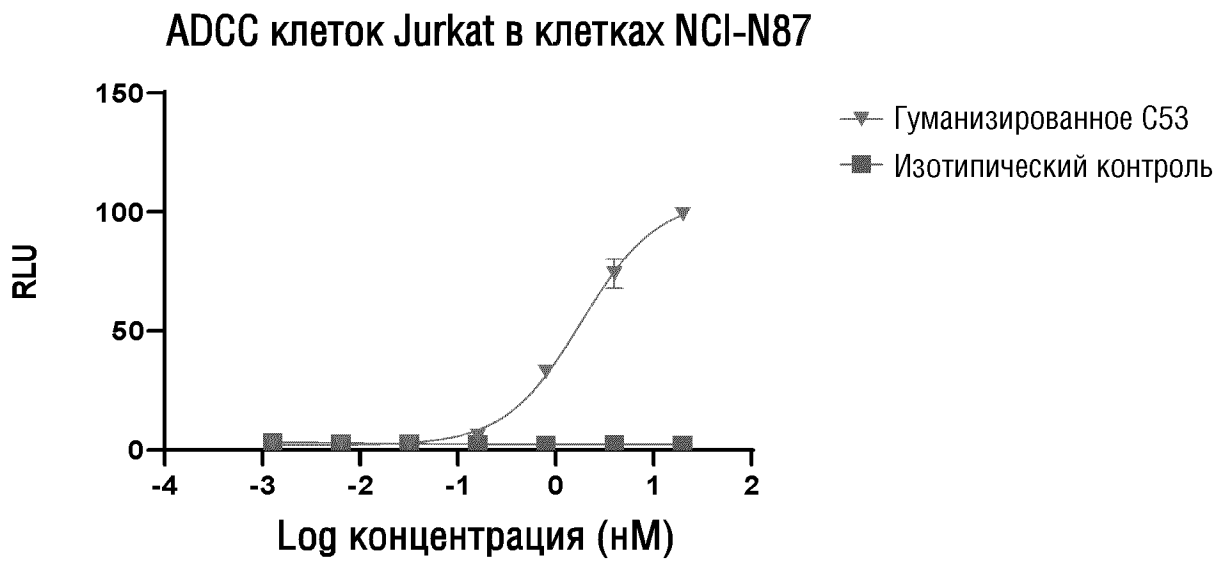


ФИГ.12 (продолжение)

(E)

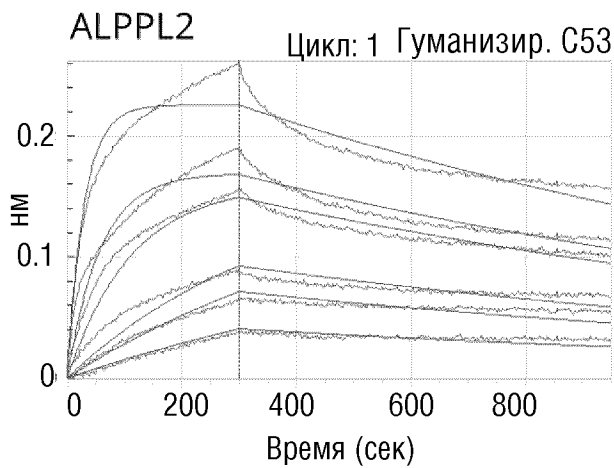
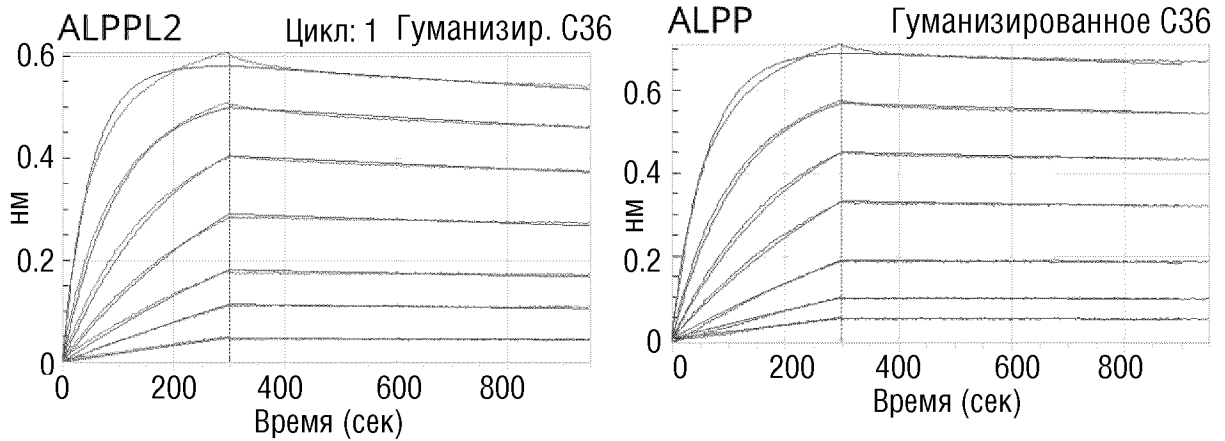


(F)



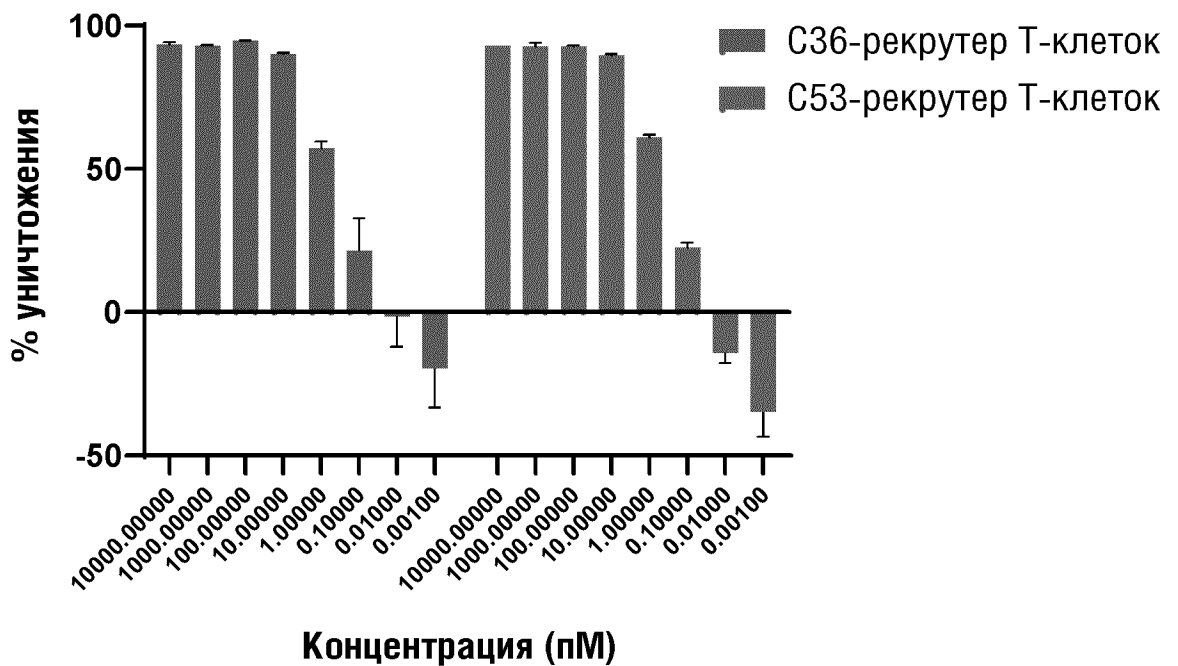
ФИГ.12 (продолжение)

(G)



Гуманизированный клон	ALPPL2 (K _D)	ALPP (K _D)
C36	0.3 нМ	0.2 нМ
C53	1 нМ	Отсутствие связывания

(H)



ФИГ.13

