

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043009

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.19

(21) Номер заявки
201691130

(22) Дата подачи заявки
2014.12.17

(51) Int. Cl. C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) ВЫДЕЛЕННОЕ АНТИТЕЛО ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С КОМПОНЕНТОМ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК ОСТРОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 13197882.7

(32) 2013.12.17

(33) EP

(43) 2016.11.30

(86) PCT/NL2014/050873

(87) WO 2015/093949 2015.06.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КЛИНГ БИОТЕРАПЬЮТИКС Б.В.
(NL)

(72) Изобретатель:
Спитс Херген, Бомонт Тим, Гиллиссен
Марейн Алетта, Баккер Адрианус
Квириус, Хазенберг Метте Дебора,
Кедде Мартейн (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) MATSUOKA S. ET AL.: "A Novel Type of Cell Death of Lymphocytes Induced by a Monoclonal Antibody without Participation of Complement", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 181, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 2007-2015, XP002980487, ISSN: 0022-1007, DOI:10.1084/JEM.181.6.2007, see Tab. 1A and first par. of the Discussion par.

ZHANG C. ET AL.: "A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 95, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 6290-6295, XP002978699, ISSN: 0027-8424, DOI:10.1073/PNAS.95.11.6290, see in particular the last par. of the Discussion par.

(57) Изобретение относится к областям биологии, иммунологии, медицины и терапии рака, в особенности к терапии миелопролиферативных или лимфопролиферативных расстройств. Предложено антитело, которое способно связываться с компонентом поверхности клеток острой миелоидной лейкемии (ОМЛ), а также другие варианты связывающих молекул на основе этого антитела, Т-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR), содержащая антитело, кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы, композиции и животные, содержащие антитело согласно изобретению, а также исследовательские, диагностические и терапевтические способы и применения, в которых задействовано это антитело.

B1

043009

043009

B1

Настоящее изобретение относится к областям биологии, иммунологии, медицины и терапии рака, в особенности к терапии миелопролиферативных или лимфопролиферативных расстройств. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, направленным против клеток острой миелоидной лейкемии.

Острая миелоидная лейкемия (ОМЛ) представляет собой злокачественное новообразование с высокой степенью риска с уровнями выживаемости пять лет у 40-50% пациентов моложе 60 лет. Для пациентов старше 65 лет исходы еще хуже, и длительные ремиссии наблюдаются лишь у менее чем 20% пациентов. Для лечения острой лейкемии часто применяют аллогенную трансплантацию стволовых клеток (ТСК). Изначально ее разработали, чтобы спасти пациентов, получающих в противном случае летальную миелоаблативную химиотерапию, но впоследствии обнаружили, что она осложняется связанными с аллореактивным иммунным ответом осложнениями (реакцией "трансплантат против хозяина"; РТПХ). Обеднение Т-клетками трансплантатов перед реинфузией предотвращало РТПХ, но в результате наблюдения того, что у реципиентов трансплантатов с уменьшенным количеством Т-клеток, аналогично реципиентам трансплантата монозиготного близнеца-донора, выявляли гораздо более высокую частоту рецидивов, становилось все более ясно, что успех аллогенной ТСК зависит от индукции иммунного ответа против лейкемии (трансплантат против лейкемии (ТПЛ)). Это привело к развитию стратегий применения аллогенной трансплантации стволовых клеток без миелоаблативного кондиционирования (трансплантация стволовых клеток в условиях пониженной интенсивности, ТСКПИ), чтобы снизить цитотоксичность и позволить проведение аллогенной ТСК у большей группы пациентов, включая пациентов старшего возраста и пациентов, получивших интенсивное предварительное лечение. Подготовительные схемы лечения при ТСКПИ нацелены на уничтожение адаптивной иммунной системы реципиента, чтобы предотвратить отторжение трансплантата, но не допускают полного разрушения костного мозга реципиента, тем самым снижая раннюю токсичность ТСК. После трансплантации стволовые клетки донора постепенно замещают стволовые клетки реципиента, и полный донорский химеризм обычно достигается в течение трех месяцев после ТСК. Хотя аллогенная ТСК исцеляет значительное количество пациентов, и был достигнут значительный прогресс в поддерживающей терапии реципиентов ТСК, 15-30% пациентов все еще погибает в результате связанных с трансплантацией осложнений, таких как РТПХ, и инфекционных осложнений (возникающих в результате медленного восстановления иммунной системы после ТСК или как осложнение иммуносупрессивной терапии от РТПХ).

Следовательно, хотя ТСК потенциально исцеляет, если удастся вызвать эффективные реакции трансплантата против лейкемии (ТПЛ), ее терапевтический успех ограничен иммунными ответами, направленными на организм реципиента, приводящими к РТПХ, которая вызывает высокую частоту осложнений и смертность.

Приблизительно у 70% пациентов, которым провели ТСК, в некоторый момент после ТСК развивается РТПХ, при этом затронутые органы включают кожу, печень, кишечник и легкое. РТПХ лечат посредством местной или системной иммуносупрессивной терапии, включающей кортикостероиды. Значительное количество пациентов с РТПХ не отвечает на терапию стероидами, и приблизительно половина данных пациентов также плохо отвечает на альтернативные (и отчасти все еще экспериментальные) меры, такие как трансплантация мезенхимальных стромальных клеток (MSC) или терапия, модулирующая Т-клетки, такая как терапия, направленная против фактора некроза опухоли α (анти-TNF α ; инфликсимаб). Экстенсивная и длительная иммуносупрессивная терапия нежелательна, поскольку она может задерживать развитие терапевтических ответов против лейкемии. В действительности, когда происходит рецидив ОМЛ во время прохождения пациентом иммуносупрессивной терапии, первым шагом будет быстро свести на нет введение иммуносупрессоров. Это может вызвать исцеляющий ответ ТПЛ, часто ценой возникновения РТПХ. У пациентов с рецидивом, находящихся на иммуносупрессивной терапии, которые не отвечают на постепенное уменьшение количества иммуносупрессоров, или у пациентов с рецидивом, которые уже прекратили прием иммуносупрессоров до того, как произошел рецидив, но у которых не развилась РТПХ, снижение опухолевой нагрузки посредством химиотерапии, а затем инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) в возрастающих дозах могут приводить к длительной ремиссии заболевания. Хотя отсутствие диагностических тестов, позволяющих продемонстрировать наличие сильного ответа ТПЛ, усложняет точную оценку частоты индукции ответов ТПЛ при аллогенной ТСК при первичной или рецидивирующей ОМЛ, в некоторых исследованиях предоставили убедительное доказательство индукции такого ответа у значительного количества пациентов. Например, Schmid и коллеги продемонстрировали эффективные ответы ТПЛ при ИДЛ у 50% из небольшой группы пациентов с рецидивом заболевания ОМЛ, у которых наблюдалась вторая ремиссия после химиотерапии (Schmid и др., 2007). Schlenk и коллеги убедительно показали аддитивное значение аллогенной ТСК при первичной ОМЛ, которая приводила к удвоению 5-летней выживаемости без рецидивов заболевания у пациентов с ОМЛ с высокой степенью риска, которые получили аллогенную ТСК от брата или сестры, по сравнению с пациентами, у которых не было подходящего донора брата или сестры (Schlenk и др., 2008). Таким образом, ответы ТПЛ часто достигаются за счет возникновения РТПХ, и наблюдение, что обеднение трансплантата Т-клетками уменьшало частоту РТПХ, но повышало частоту рецидивов заболевания, позволило предположить, что оба данных ответа преимущественно опосредуются зависимыми от Т-клеток иммунными

ответами на антигены реципиента.

В связи с высокой частотой РТПХ после аллогенной трансплантации стволовых клеток, приводящей к гибели 15-30% пациентов, а также тем фактом, что подходящий донор не всегда доступен для данного пациента, требуются альтернативные подходы к лечению. Целью настоящего изобретения является предоставление альтернативных средств и способов противодействия и/или предотвращения ОМЛ.

Согласно настоящему изобретению предложены полученные из пациента ОМЛ-специфические антитела человека, которые способны связываться с интактными клетками ОМЛ. Важно отметить, что указанные антитела получают из пациентов-людей с ОМЛ, которые получили аллогенную ТСК и находятся в полной ремиссии, свидетельствуя о том, что данные антитела эффективны против ОМЛ. В действительности, в разделе Примеры продемонстрировали, что антитела согласно настоящему изобретению способны связываться с интактными клетками ОМЛ. ОМЛ-специфические антитела человека согласно настоящему изобретению, следовательно, особенно подходят для применения в направленной против ОМЛ терапии. Например, антитело согласно настоящему изобретению связано с токсичной молекулой. После введения антитела, клетки ОМЛ будут связывать и/или интернализировать его, и токсичная молекула будет оказывать токсичное действие на клетку ОМЛ. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах реализации антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) или комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ) вызывается применением антитела согласно настоящему изобретению, возможно связанного с иммуномодулирующим соединением. Тот факт, что предложены антитела человека, или функциональные части или функциональные эквиваленты антител человека, уменьшает вероятность побочных действий у людей, что является существенным преимуществом. Следовательно, с антителами, предложенными в настоящем изобретении, стали доступны новые возможности лечения ОМЛ, которые можно применять дополнительно к существующей терапии ОМЛ, или в качестве ее альтернативы.

В важном варианте реализации настоящего изобретения предложены ОМЛ-специфические антитела человека, которые способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ. Введение таких антител пациенту с ОМЛ будет противодействовать клеткам ОМЛ без необходимости добавления к антителу дополнительных (токсических) молекул. В особенно предпочтительном варианте реализации предложены ОМЛ-специфические антитела человека, которые способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо от антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), апоптоза или фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. Предпочтительно, такие антитела способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ (по существу) независимо от любых других иммунных клеток, или комплемента, или апоптоза. В разделе Примеры показано, что такие антитела способны непосредственно уменьшать или ингибировать рост клеток ОМЛ, или даже способны убивать клетки ОМЛ, в отсутствие иммунных клеток, таких как NK-клетки или макрофаги, и в отсутствие комплемента. Данный вариант реализации противоположен подходам известного уровня техники, таким как, например, описанные в Majeti и др., 2009 г., и Willingham и др., 2012 г., в которых специфическое к CD47 антитело применяли для того, чтобы позволить фагоцитоз макрофагами опухолевых клеток. В WO 2009/051974 описано применение антител, специфичных к молекуле 1, подобной лектину типа C (CLL-1), которые способны вызывать КЗЦ против клеток ОМЛ *in vitro* в присутствии компонентов комплемента кролика. Bakker и др., 2004 г., тем не менее, не предусмотрели, что антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность или комплементзависимая цитотоксичность посредством CLL-1 будет эффективным механизмом нацеливания, и предложили конъюгированные с токсином антитела к CLL-1 для применения против ОМЛ. В WO 2012/098407 описано применение антител, специфичных к IL1RAP, для индукции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности, направленной против клеток ОМЛ, путем привлечения NK-клеток, которые вызывают гибель клеток ОМЛ. Следовательно, описанный выше известный уровень техники сфокусирован на применении антител для того, чтобы активировать другие иммунные клетки, что не может обеспечить желательные результаты у индивидов с нарушенным иммунитетом, таких как пациенты с ОМЛ, которые прошли химиотерапию с аллогенной ТСК или без нее.

В WO 2013/071068 описаны антитела к CXCR4, которые получили в трансгенных трансхромосомных мышах, экспрессирующих гены антител человека. Полученные антитела связывались с широким спектром гематопозитических клеток и были способны ингибировать рост линии клеток ОМЛ *in vitro*. Данные антитела к CXCR4 вызывают апоптоз в различных линиях клеток ОМЛ.

Также была описана терапия ОМЛ моноклональным антителом к CD33 (Walther и др., 2012). Например, описаны CD33-специфические антитела, конъюгированные с лекарственным средством.

В WO 2010/102244 описано гуманизированное антитело к EphA3, которое способно вызывать апоптоз клеток ОМЛ. Более того, у Biernacki и др., 2010 г., и Wu и др., 2000 г., описаны антитела, полученные из пациентов с ОМЛ, которые специфичны к внутриклеточным антигенам, таким как RAB38, TBCE, DUSP12 и RAFTK.

В заключение, в нескольких публикациях описаны антитела против ОМЛ, которые связываются с внутриклеточными антигенами. Такие антитела не являются антителами первого выбора для борьбы с живыми интактными клетками ОМЛ *in vivo* вследствие недоступности таких внутриклеточных мишеней,

когда клетки ОМЛ интактны. В других публикациях описаны антитела, которые связываются с широким спектром гематопозитических клеток, например, посредством CD33, CXCR4, CD47 или CLL-1. Антитела, которые связываются с широким спектром (гематопозитических) клеток, приводят к риску тяжелых побочных эффектов.

Некоторые антитела, описанные в данной области, действуют, вызывая фагоцитоз, АЗКЦ или КЗЦ, что означает, что необходимы другие иммунные клетки или компоненты комплемента для противодействия клеткам ОМЛ. Применение таких антител, следовательно, ограничено у индивидов с нарушенным иммунитетом. Более того, некоторые из описанных антител не принадлежат человеку, что вызывает высокий риск побочных действий. В других публикациях (таких как WO 2013/071068 и WO 2010/102244) описаны антитела, которые вызывают апоптоз клеток ОМЛ.

В противоположность приведенным выше публикациям, авторы настоящего изобретения использовали отличный подход. Вместо искусственного получения антител против компонента, который присутствует, среди прочего, на клетках ОМЛ, авторы настоящего изобретения выделили антитела из пациентов-людей с ОМЛ, у которых после получения аллогенной ТСК развился сильный ответ трансплантата против лейкемии, при этом они оставались в полной ремиссии. Данные антитела способны специфично связывать интактные клетки ОМЛ. Следовательно, вместо применения искусственно разработанных антител авторы настоящего изобретения изящно воспользовались преимуществом природной иммунной защиты, вызванной у пациентов-людей с ОМЛ после получения аллогенной ТСК. Гуморальный ответ, встречающийся в природе, приводит к очень точной селекции и разрастанию популяции В-клеток, которые продуцируют эффективные антитела *in vivo*. Антитела согласно настоящему изобретению, или функциональные части или функциональные производные указанных антител, следовательно, особенно подходят для связывания с клетками ОМЛ у пациентов с ОМЛ. Тот факт, что указанные антитела специфичны к интактным клеткам ОМЛ, а не к внутриклеточным антигенам, делает их особенно подходящими для терапии ОМЛ.

Было описано, что антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению может быть связано с токсичной молекулой. Такая токсичная молекула затем будет направлена на клетки ОМЛ *in vivo* посредством связывания антитела с клетками ОМЛ. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложены антитела человека, или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, которые способны связываться с интактными клетками ОМЛ и которые способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ. Такое антитело избавляет от необходимости соединения антитела с дополнительным токсичным компонентом (хотя применение токсичной молекулы все же может быть полезно для получения дополнительного эффекта, направленного против ОМЛ). В одном особенно предпочтительном варианте реализации предложены антитела человека, или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, согласно настоящему изобретению, которые способны связываться с интактными клетками ОМЛ и которые способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо от антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. Предпочтительно, такие антитела способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо или по существу независимо от других иммунных клеток или компонентов комплемента. Применение таких антител, обладающих сильной активностью, направленной против ОМЛ, предпочтительно, особенно у индивидов с нарушенным иммунитетом. В одном предпочтительном аспекте настоящего изобретения, следовательно, предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело человека или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое способно связываться с компонентом поверхности клеток острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) и которое способно уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо или по существу независимо от антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. Предпочтительно, такие антитела способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ (по существу) независимо от любых других иммунных клеток или комплемента. В разделе Примеры показано, что по меньшей мере антитела АТ12-023, АТ12-025 и АТ13-024 обладают данными свойствами. Следовательно, они являются предпочтительными антителами согласно настоящему изобретению.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации предложены антитела человека, или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, согласно настоящему изобретению, которые способны связываться с интактными клетками ОМЛ и которые способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо от апоптоза. В разделе Примеры показано, что по меньшей мере антитела АТ12-023, АТ13-031 и АТ13-037 обладают данным свойством. Это ясно из того факта, что данные антитела могут вызывать гибель клеток ОМЛ в присутствии ингибиторов апоптоза, таких как неспецифические ингибиторы каспаз Q-VD-OPh или Z-VAD-fmk, и из того факта, что большинство из данных антител (за исключением антитела АТ13-031) сохраняет цитотоксические свойства при 4°C. Согласно настоящему изобретению, антитела, такие как АТ12-023, АТ13-031 и АТ13-037, убивают клетки ОМЛ, на которые они нацелены, посредством некроза (такого как онкоз или некроптоз). Это обеспечивает пре-

имущество над известными на сегодняшний день вызывающими апоптоз антителами, состоящее в том, что вызывающие некроз антитела согласно настоящему изобретению будут усиливать иммунный ответ пациента больше, чем вызывающие апоптоз антитела. Это происходит благодаря тому факту, что в результате некроза содержимое клетки в большей степени открыто для контакта с иммунной системой индивида. Следовательно, дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело человека или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое способно связываться с компонентом поверхности клеток острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) и которое способно уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо или по существу независимо от апоптоза.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации предложены антитела человека, или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, согласно настоящему изобретению, которые способны уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо как от апоптоза, так и от приведенных выше иммунных клеток и комплемента. Следовательно, дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело человека или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое способно связываться с компонентом поверхности клеток острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) и которое способно уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ по существу независимо от антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), апоптоза или фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками.

Антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению предпочтительно способно связывать интактные клетки ОМЛ. Предпочтительно, такое антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, способно связываться с компонентом поверхности клетки, который специфичен для клеток ОМЛ. Это обычно означает, что не относящиеся к гематопозитическим клетки или незлокачественные гематопозитические клетки, такие как, например, гепатоциты, клетки толстого кишечника, фибробласты, эндотелиальные клетки, здоровые мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и здоровые клетки костного мозга, не узнаются или в значительно меньшей степени узнаются (по аффинности связывания) антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, согласно настоящему изобретению, чем клетки ОМЛ. Это означает, что связывание антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению с не относящимися к гематопозитическим клетками или незлокачественными гематопозитическими клетками обычно находится в том же диапазоне аффинностей, что и связывание с данными клетками постороннего контрольного антитела (где указанное контрольное антитело не обладает специфичностью к указанным клеткам). Некоторая реакционная способность по отношению к другим типам злокачественных гематопозитических клеток, тем не менее, входит в объем термина "ОМЛ-специфические". Например, в табл. 4 и на фиг. 6 показано, что антитела AT13-031 и AT12-023 способны связывать полученные из пациента В-клетки неходжкинской лимфомы. Следовательно, также предложено применение антитела AT13-031 или антитела AT12-023, или функциональной части или функционального производного любого из данных антител, для получения лекарственного средства от В-клеточной неходжкинской лимфомы или агента для ее профилактики, также, как и антитела AT13-031 или антитела AT12-023, или функциональной части или функционального производного любого из данных антител, для применения в способе по меньшей мере частичного лечения или предупреждения В-клеточной неходжкинской лимфомы. Аналогично, антитела AT13-024, AT13-031 и AT12-019 способны связываться с линиями клеток лимфомы и/или множественной миеломы (табл. 4). Применение антитела AT13-024, или антитела AT13-031, или антитела AT12-019, или функциональной части или функционального производного любого из данных антител, для получения лекарственного средства или агента для профилактики лимфомы и/или миеломы, следовательно, также предложено, как и антитело AT13-024, или антитело AT13-031, или антитело AT12-019, или функциональная часть или функциональное производное любого из данных антител, для применения в способе по меньшей мере частичного лечения или предупреждения лимфомы и/или миеломы.

В данном изобретении в объем термина "клетки ОМЛ" входят природные клетки ОМЛ, такие как первичные бластные клетки ОМЛ, которые присутствуют в пациентах с ОМЛ, а также линии клеток ОМЛ, такие как например, THP-1, Mono-Mac 6 и Molm 13.

Термин "антитело" в данном изобретении относится к белку иммуноглобулина, содержащему по меньшей мере переменную область тяжелой цепи (VH), соединенную в паре с переменной областью легкой цепи (VL), который специфичен к целевому эпитопу.

В данном изобретении "функциональная часть антитела" означает ту часть, которая обладает по меньшей мере одним общим с указанным антителом свойством по типу, не обязательно по величине. Указанная функциональная часть способна связывать тот же антиген, что и указанное антитело, хотя не обязательно в той же степени. В одном варианте реализации функциональная часть антитела содержит по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи (VH). Лишь некоторые из примеров функциональной части антитела представляют собой однодоменное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело, унитарное (unibody), одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), фрагмент Fab и фрагмент F(ab')₂.

"Функциональный эквивалент антитела" в данном изобретении означает искусственное связывающее соединение, содержащее по меньшей мере одну последовательность определяющей комплементарности области (CDR) антитела, предпочтительно последовательность CDR3 тяжелой цепи. Указанный функциональный эквивалент предпочтительно содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи антитела, а также последовательность CDR3 легкой цепи указанного антитела. Более предпочтительно, указанный функциональный эквивалент содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела, а также последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи указанного антитела. Функциональный эквивалент антитела, например, получают путем изменения антитела таким образом, что по меньшей мере способность полученного соединения связывать антиген была по существу такая же по типу, не обязательно по величине. Это осуществляют многими способами, например, посредством консервативной замены аминокислоты, при которой аминокислотный остаток заменяют на другой остаток, как правило, с аналогичными свойствами (размером, гидрофобностью и т.д.), таким образом, что общее функционирование антитела по существу не нарушено.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что тяжелая цепь антитела является большей из двух типов цепей, образующих молекулу иммуноглобулина. Тяжелая цепь содержит константный домен и переменный домен, указанный переменный домен участвует в связывании антигена. Легкая цепь антитела является меньшей из двух типов цепей, образующих молекулу иммуноглобулина. Легкая цепь содержит константный домен и переменный домен. Указанный переменный домен часто, но не всегда, вместе с переменным доменом тяжелой цепи вовлечен в связывание антигена.

Определяющие комплементарность области (CDR) представляют собой гиперпеременные участки, присутствующие в переменных доменах тяжелой цепи и переменных доменах легкой цепи. В случае целых антител, CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 присоединенной легкой цепи вместе образуют сайт связывания антигена.

В данном изобретении термин "антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению" также называют "связывающим соединением согласно настоящему изобретению".

Термин "компонент поверхности клеток ОМЛ" означает любой компонент, который по меньшей мере отчасти присутствует около или на поверхности клеток ОМЛ, или компонент, который присоединен к поверхности клетки ОМЛ. Лишь некоторые из примеров компонентов поверхности клеток ОМЛ представляют собой (транс)мембранные белки, гликопротеины и любое соединение, присоединенное к ним.

Термины "специфичный к" и "способный специфично связывать" используют в данном изобретении взаимозаменяемо, и они относятся к взаимодействию между антителом, или функциональной частью или функциональным эквивалентом указанного антитела, и его эпитопом. Это означает, что указанное антитело, или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, предпочтительно связывается с указанным эпитопом, чем с другими антигенами или последовательностями аминокислот. Таким образом, хотя указанное антитело, или его функциональная часть или эквивалент, может неспецифично связываться с другими антигенами или последовательностями аминокислот, аффинность связывания указанного антитела, или функциональной части или функционального эквивалента указанного антитела, с его эпитопом значительно выше, чем аффинность неспецифического связывания указанного антитела, или функциональной части или функционального эквивалента, с другими антигенами или последовательностями аминокислот.

Антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое способно связываться с конкретным эпитопом клеток ОМЛ, также может быть специфичным к другим, не относящимся к ОМЛ клеткам, если указанный эпитоп клеток ОМЛ также присутствует на других клетках (например, других клетках лейкемии, клетках миеломы или клетках лимфомы). В указанном случае антитело, называемое в данном изобретении специфичным к клеткам ОМЛ, также специфично к указанным другим клеткам, содержащим такой же эпитоп. Предпочтительно, антитела человека против ОМЛ, и функциональные части и функциональные эквиваленты указанных антител, предложенные в данном изобретении, значительно не связываются с не относящимися к гематопозитическим клетками и незлокачественными гематопозитическими клетками.

"Аффинность связывания" относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иначе, в данном изобретении "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между партнерами в связывающейся паре (например, между антителом и антигеном). Аффинность, как правило, может быть представлена посредством равновесной константы диссоциации (K_D), которую рассчитывают как отношение константы скорости ассоциации (k_a) к константе скорости диссоциации (k_d), см., например, Chen, Y., и др., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Аффинность можно измерить с помощью обычных способов, известных в данной области, таких как, например, анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например, с помощью устройства BiaCore или IBIS-iSPR в IBIS Technologies BV (Хенгело, Нидерланды), или анализ в жидкой фазе, такой как Kinexa. Предпочтительно

аффинность связывания антитела согласно настоящему изобретению с эпитопом около или на поверхности клеток ОМЛ характеризуется константой диссоциации (K_D), равной не более 100 нМ, более предпочтительно не более 50 нМ, более предпочтительно не более 25 нМ, более предпочтительно не более 10 нМ, более предпочтительно не более 5 нМ, более предпочтительно не более 2 нМ, более предпочтительно не более 1 нМ, более предпочтительно не более 0,5 нМ, более предпочтительно не более 0,3 нМ, более предпочтительно не более 0,1 нМ.

Процент идентичности последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот или термин "% идентичности последовательностей" в данном изобретении означает процент остатков в кандидатной последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот, которые идентичны остаткам в эталонной последовательности после выравнивания двух указанных последовательностей и введения разрывов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области, например, "Align 2".

В особенно предпочтительном варианте реализации предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое способно вызывать гибель первичных бластных клеток ОМЛ. Поскольку первичные бластные клетки ОМЛ получают непосредственно из пациента с ОМЛ, в противоположность доступным для приобретения линиям клеток, активность антитела против таких бластных клеток ОМЛ еще более характерна для ситуации *in vivo*. В разделе Примеры показано, что по меньшей мере антитела АТ13-024 и АТ12-025 обладают данным свойством. Данные антитела, следовательно, являются предпочтительными. В особенно предпочтительном варианте реализации предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое способно вызывать гибель первичных бластных клеток ОМЛ независимо или по существу независимо от антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), апоптоза и/или фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Предпочтительно такие связывающие соединения способны вызывать гибель бластных клеток ОМЛ по существу независимо от других иммунных клеток, или комплемента, или апоптоза. Антитела АТ13-024 и АТ12-025 также обладают данным предпочтительным свойством.

В данном изобретении термин "по существу независимо от АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки", означает, что АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоз связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, не требуются для направленного против ОМЛ действия, вызванного связывающим соединением согласно настоящему изобретению, даже если в ситуации *in vivo* АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоз связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, также может происходить. Следовательно, в данном варианте реализации АЗКЦ, КЗЦ и фагоцитоз связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, не исключаются, но также и не являются необходимыми. Аналогичным образом, термин "по существу независимо от других иммунных клеток или комплемента" означает, что связывающее соединение согласно настоящему изобретению, в принципе, способно оказывать направленное против ОМЛ действие без присутствия других иммунных клеток или комплемента, даже если в ситуации *in vivo* другие иммунные клетки или комплемент также могут проявлять направленную против ОМЛ активность. Термин "по существу независимо от апоптоза" означает, что направленное против ОМЛ действие оказывается связывающим соединением согласно настоящему изобретению посредством механизма, отличного от апоптоза. Предпочтительно, указанное направленное против ОМЛ действие оказывается посредством некроза.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое способно уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ *in vitro* в течение 7 дней, предпочтительно в течение 5 дней, более предпочтительно в течение 3 дней и еще более предпочтительно в течение 1 дня. Это указывает на быстрый терапевтический эффект.

Согласно настоящему изобретению предложены выделенные синтетические и рекомбинантные антитела человека и функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, которые способны связываться с интактными клетками ОМЛ. Указанные клетки ОМЛ предпочтительно по франко-американско-британской (ФАБ) классификации принадлежат к типам, выбранным из группы, состоящей из М5, М0, М1, М2, М3 и М4. Более предпочтительно, указанные клетки ОМЛ по ФАБ-классификации принадлежат к типам М5, или М1, или М0, или М4, предпочтительно к типу М5. Перечисленные типы по ФАБ-классификации часто встречаются у пациентов с ОМЛ.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации предложены выделенные синтетические и рекомбинантные антитела человека или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, которые способны связываться с различными клетками ОМЛ, принадлежащими к по меньшей мере двум, предпочтительно по меньшей мере трем, более предпочтительно по меньшей мере четырем различным типам по ФАБ-классификации. Такие антитела полезны для различных пациентов с ОМЛ различных типов по ФАБ-классификации, так что данные антитела можно широко применять. В табл. 3 показано, что антитело АТ12-025 способно связывать клетки ОМЛ, принадлежащие к по меньшей мере двум типам по ФАБ-классификации (М5+М1). Следовательно, оно представляет собой предпочти-

тельное антитело согласно настоящему изобретению. Антитела AT13-024, AT12-019, AT13-023, и AT13-022 способны связывать клетки ОМЛ, принадлежащие к по меньшей мере трем типам по ФАБ-классификации (M5+M0+M1). Антитело AT13-031 также способно связывать клетки ОМЛ, принадлежащие к по меньшей мере трем типам по ФАБ-классификации (M5+M1+M4). Данные антитела, следовательно, еще более предпочтительны. Более того, антитело AT12-023 способно связывать клетки ОМЛ, принадлежащие к по меньшей мере четырем типам по ФАБ-классификации (M5+M0+M1+M4). Данное антитело, следовательно, можно еще более широко применять, и, следовательно, оно является особенно предпочтительным.

В одном особенно предпочтительном варианте реализации предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, при этом указанное антитело принадлежит к изотипу IgG, предпочтительно к IgG1 или IgG3. Это имеет практическую значимость для медицинских применений у людей.

В табл. 1A и 1B и на фиг. 1 приведен обзор переменных последовательностей тяжелой и легкой цепей, а также отдельных последовательностей CDR, антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016. Данные антитела представляют собой предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению, полученные из трех пациентов-людей с ОМЛ. В данном изобретении в объем терминов "AT12-023", "AT12-025", "AT13-024", "AT12-019", "AT13-022", "AT13-023", "AT13-031", "AT12-020", "AT13-033", "AT13-034", "AT13-035", "AT13-036", "AT13-037", "AT14-013", "AT14-014", "AT14-015" и "AT14-016" входят все антитела, и функциональные части и функциональные эквиваленты, содержащие по меньшей мере области CDR1-3 тяжелой и легкой цепей, предпочтительно переменные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, данных антител, представленные в табл. 1A и 1B и на фиг. 1, такие как например, выделенные и/или очищенные антитела или полученные рекомбинантным способом антитела.

В данном изобретении любая ссылка на "табл. 1" включает ссылку на таблицу 1A и/или табл. 1B.

На основе антител, представленных в табл. 1 и на фиг. 1, можно получить антитело, или функциональную часть или функциональный эквивалент указанного антитела, содержащее по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, представленного в табл. 1 и на фиг. 1, которое специфично к клеткам ОМЛ. Следовательно, предложено выделенное рекомбинантное и/или синтетическое антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, содержащее по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, представленного в табл. 1. Указанная последовательность CDR предпочтительно представляет собой последовательность CDR3 антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно предложены связывающие соединения, которые содержат по меньшей мере две CDR, более предпочтительно по меньшей мере три CDR, тяжелой и легкой цепей одного и того же антитела, указанного в табл. 1 или на фиг. 1. Следовательно, предпочтительно по меньшей мере две или три CDR тяжелой и легкой цепей антитела AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 или AT14-016 совместно присутствуют в одном связывающем соединении согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, связывающее соединение согласно настоящему изобретению содержит все три CDR тяжелой цепи и все три CDR легкой цепи одного и того же антитела, представленного в табл. 1 или на фиг. 1. Возможно, по меньшей мере одна из указанных последовательностей CDR оптимизирована, в результате чего получают вариант связывающего соединения, предпочтительно для того, чтобы улучшить эффективность, селективность или стабильность связывания. Это, например, осуществляют с помощью процедур мутагенеза, в которых после того, как предпочтительно исследовали стабильность и/или эффективность связывания полученного соединения, выбирают улучшенное ОМЛ-специфическое связывающее соединение. Специалист вполне способен получить варианты, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR согласно настоящему изобретению. Например, осуществляется консервативная замена аминокислоты. Примеры консервативной замены аминокислоты включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток, и замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, например, замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамин на аспарагин. Предпочтительно, предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, содержащее последовательность CDR, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDR, представленной в табл. 1 или на фиг. 1, таким образом, что полезная способность ОМЛ-специфического антитела, представленного в табл. 1 или на фиг. 1, связывать клетки ОМЛ и/или убивать клетки ОМЛ сохраняется или даже улучшается. Варианты связывающих соединений, включающих последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDR, представленной в табл. 1 или на фиг. 1, следовательно, также входят в объем настоящего изобретения. Предпочтительно, указанные связывающие соединения содержат последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны последовательностям CDR1-3 тяжелой и легкой цепей одного и того же антитела, представленного в табл. 1 или на фиг. 1. Предпочтительно, последовательности CDR отличаются не более чем тремя, предпочтительно не бо-

лее чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от исходных последовательностей CDR антитела согласно настоящему изобретению.

Помимо оптимизации последовательностей CDR для улучшения эффективности связывания или стабильности, можно оптимизировать по меньшей мере одну последовательность в по меньшей мере одной из каркасных областей. Это предпочтительно осуществляют для того, чтобы улучшить эффективность связывания или стабильность. Каркасные последовательности, например, оптимизируют путем мутирования молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такую каркасную последовательность, при этом впоследствии предпочтительно исследуют свойства полученного в результате этого антитела - или функциональной части или функционального эквивалента. Таким образом, можно получить улучшенные связывающие соединения. В предпочтительном варианте реализации для каркасных областей в антителах согласно настоящему изобретению используются человеческие зародышевые последовательности. Применение человеческих зародышевых последовательностей минимизирует риск иммуногенности указанных антител, так как данные последовательности с меньшей вероятностью будут содержать соматические изменения, которые уникальны для индивидов, из которых получили указанные каркасные области, и могут вызывать иммуногенный ответ, если их применить у другого человека. Следовательно, дополнительно предложено синтетическое или рекомбинантное антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, содержащее по меньшей мере одну неприродную мутацию в каркасной области. В качестве дополнения или альтернативы, предложено синтетическое или рекомбинантное антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое содержит по меньшей мере одну неприродную мутацию в константной области. Под "неприродной мутацией" понимают, что полученная в результате этого последовательность аминокислот не встречается в природе. Вместо этого, она была получена искусственным путем. В одном варианте реализации Fc-область IgG3 антитела AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT13-022, AT12-020, AT14-014, AT14-015 или AT14-016 по меньшей мере частично заменена на Fc-область IgG1. Это, как правило, повышает стабильность и время полужизни полученного в результате этого иммуноглобулина.

Связывающее соединение согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит человеческую вариабельную область. Более предпочтительно, указанное связывающее соединение содержит человеческую константную область и человеческую вариабельную область. В наиболее предпочтительном случае указанное связывающее соединение представляет собой антитело человека. Применение ОМЛ-специфических антител человека предпочтительнее, чем применение не относящихся к человеку антител. Применение *in vivo* не относящихся к человеку антител для диагностики и/или лечения заболеваний человека затрудняется множеством факторов. В частности, организм человека может узнавать не относящиеся к человеку антитела как чужеродные, что будет приводить к иммуногенному ответу против не относящихся к человеку антител, приводящему к нежелательным побочным действиям и/или быстрому клиренсу указанных антител из кровотока. Антитело человека уменьшает вероятность побочных действий при введении человеку и часто приводит к большему времени полужизни в кровотоке благодаря пониженному клиренсу по сравнению с не относящимися к человеку антителами. В другом варианте реализации связывающее соединение согласно настоящему изобретению представляет собой гуманизированное антитело. В другом варианте реализации связывающее соединение согласно настоящему изобретению представляет собой химерное антитело. В химерном антителе интересующие последовательности, такие как, например, дополнительный интересующий сайт связывания, включены в связывающее соединение согласно настоящему изобретению.

Кроме того, связывающие соединения согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой моноклональные антитела. Моноклональное антитело представляет собой антитело, состоящее из одного молекулярного вида. Моноклональные антитела можно получить в больших количествах с помощью клеток, продуцирующих моноклональные антитела, или посредством технологии рекомбинантных ДНК.

Следовательно, варианты связывающих соединений на основе предпочтительных антител, представленных в табл. 1 и на фиг. 1, также можно получить, применяя методики, известные в данной области, такие как, например, мутагенез. Обычно, допускаются вариации последовательности от 80 до 99%, при которых сохраняется некоторая антигенная специфичность. Связывающие соединения согласно настоящему изобретению, содержащие последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по меньшей мере последовательности CDR любого из антител, представленных в табл. 1 или на фиг. 1, следовательно, также предложены в данном изобретении. Поскольку на антигенную специфичность антитела, как правило, оказывают преобладающее влияние последовательности CDR3, вариант антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDR3 тяжелой цепи, представленной в табл. 1 или на фиг. 1. Указанный вариант антитела предпочтительно содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны последовательностям CDR3 тяжелой и легкой цепей одного и того же антитела, выбранного из группы, состоящей из AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023,

AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016.

Следовательно, дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное анти-тело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит по меньшей мере последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 27-39 и 217-220, и последовательность CDR3 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 66-78 и 229-232. Данные последовательности представляют собой последовательности CDR3 антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016, представленных в табл. 1 и на фиг. 1. Предпочтительно, указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Ранее упоминалось, что связывающее соединение согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит последовательность CDR3 тяжелой и легкой цепей, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательностям CDR3 тяжелой и легкой цепей одного и того же антитела, выбранного из представленных в табл. 1 или на фиг. 1.

Обычно, по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка данной последовательности CDR могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, связывающее соединение согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, в которой не более 3, предпочтительно не более 2, более предпочтительно не более 1 аминокислоты отличается от последовательности CDR3 тяжелой и легкой цепей из того же антитела, выбранного из группы, состоящей из AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1-13 и 209-212; и/или

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 14-26 и 213-216; и/или

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 27-39 и 217-220; и/или

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 40-52 и 221-224; и/или

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 53-65 и 225-228; и/или

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 66-78 и 229-232.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR тяжелой и легкой цепей антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016, представленных в табл. 1А и 1В и на фиг. 1.

Описанные выше последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно происходят из одного и того же антитела, выбранного из представленных в табл. 1 или на фиг. 1. Предпочтительно указанное антитело, или его функциональная часть или эквивалент, содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по

меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, более предпочтительно на 100% идентичны перечисленным выше последовательностям CDR (SEQ ID NO: 1-78 и 209-232).

В предпочтительном варианте реализации последовательности CDR1, и CDR2, и CDR3 тяжелой цепи, а также последовательности CDR1, и CDR2, и CDR3 легкой цепи одного и того же антитела, выбранного из группы, состоящей из антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016, присутствуют в данном связывающем соединении согласно настоящему изобретению.

Предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело AT12-023. Данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ - ТНР-1, как показано в разделе Примеры и на фиг. 7 и 8. Данное антитело, следовательно, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Интересно отметить, что AT12-023 принадлежит к изотипу IgG3 и принадлежит к семейству VH4-34, которое представляет собой семейство последовательностей VH, известных своей потенциальной способностью убивать клетки (Bhat и др., 1997). Антитело AT12-023 также способно эффективно связывать первичные бластные клетки ОМЛ, принадлежащие к по меньшей мере четырем различным типам по ФАБ-классификации (табл. 3). Указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела AT12-023 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 1, 14, 27, 40, 53 и 66, соответственно, представленные в табл. 1. В настоящем изобретении, следовательно, дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 1; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 14; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 27; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 40; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 53; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 66.

Предпочтительно, указанная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Ранее в данном изобретении описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, полученные из антитела AT12-023, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT12-023.

Другое предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело AT12-025. Данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ - ТНР-1, а также полученные из пациента первичные бластные клетки ОМЛ, как показано в разделе Примеры и на фиг. 8 и 10. Данное антитело, следовательно, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Интересно отметить, что AT12-025 принадлежит к изотипу IgG3 и принадлежит к семейству VH4-34, которое представляет собой семейство последовательностей VH, известных своей потенциальной способностью убивать клетки (Bhat и др., 1997). Указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела AT12-025 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 2, 15, 28, 41, 54 и 67, соответственно, представленные в табл. 1. В настоящем изобретении, следовательно, дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или

функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 2; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 15; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 28; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 41; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 54; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 67.

Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT12-025 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT12-025.

Другое предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело AT13-024. Данное антитело является предпочтительным, так как оно способно связывать и убивать полученные из пациента первичные бластные клетки ОМЛ, как показано в разделе Примеры и на фиг. 10. Данное антитело, следовательно, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Интересно отметить, что AT13-024 принадлежит к изотипу IgG3 и принадлежит к семейству VH3-30. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела AT13-024 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 3, 16, 29, 42, 55 и 68, соответственно, представленные в табл. 1. В настоящем изобретении, следовательно, дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 3; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 16; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 29; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 42; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 55; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 68.

Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-024 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных по-

следовательностей CDR AT13-024.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 4; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 17; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 30; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 43; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 56; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 69.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT12-019. Антитело AT12-019, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно эффективно связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT12-019, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT12-019 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT12-019.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 5; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 31; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 44; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 57; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 70.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-022. Интересно отметить, что антитело AT13-022 принадлежит к изотипу IgG3. Антитело AT13-022, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, что делает связывающее соединение, содержащее, последовательности CDR, полученные из AT13-022, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вы-

звать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-022 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-022.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 6; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 19; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 32; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 45; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 58; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 71.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-023. Интересно отметить, что AT13-023 принадлежит к семейству VH4-34, которое представляет собой семейство последовательностей VH, известных своей потенциальной способностью убивать клетки (Bhat и др., 1997). Антитело AT13-023, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-023, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-023 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-023.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере

мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 7; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 20; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 33; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 46; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 59; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 72.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-031. Интересно отметить, что AT13-031 принадлежит к семейству VH4-34, которое представляет собой семейство последовательностей VH, известных своей потенциальной способностью убивать клетки (Bhat и др., 1997). Антитело AT13-031, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ. Более того, данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ -THP-1. Следовательно, связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-031, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-031 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-031.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 8; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 21; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 34; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 47; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 60; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 73.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT12-020. Интересно отметить, что антитело AT12-020 принадлежит к изотипу IgG3. Антитело AT12-020, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT12-020, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухо-

лю миеоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT12-020 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT12-020.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 9; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 22; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 35; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 48; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 61; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 74.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-033. Антитело AT13-033, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ. Более того, данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ - THP-1. Следовательно, связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-033, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миеоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-033 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-033.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 10; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 23; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 36; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 49; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 62; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 75.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-034. Антитело AT13-034, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-034, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-034 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-034.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 11; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 24; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 37; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 50; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 63; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 76.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-035. Антитело AT13-035, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ. Более того, данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ - THP-1. Следовательно, связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-035, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпоч-

тительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-035 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-035.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 12; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 25; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 38; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 51; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 64; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 77.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-036. Антитело AT13-036, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ. Более того, данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ - THP-1. Следовательно, связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-036, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-036 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-036.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 13; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 26; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 39; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 52; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере

ре на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 65; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 78.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT13-037. Антитело AT13-037, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ. Более того, данное антитело является предпочтительным, так как оно способно эффективно связывать и убивать клетки, принадлежащие к линии клеток ОМЛ - THP-1, а также полученные из пациента первичные бластные клетки ОМЛ, как показано в разделе Примеры. Следовательно, связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT13-037, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT13-037 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT13-037.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 209; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 213; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 217; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 221; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 225; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 229.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT14-013. Антитело AT14-013, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать первичные бластные клетки ОМЛ, принадлежащие к по меньшей мере трем различным типам по ФАБ-классификации, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT14-013, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют для уменьшения пролиферации клеток ОМЛ, предпочтительно независимо от апоптоза и/или независимо от АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Предпочтительно, указанное связывающее соединение применяют, чтобы вызвать гибель клеток ОМЛ. В некоторых вариантах реализации такое связывающее соединение применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере

91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT14-013 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT14-013.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 210; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 214; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 218; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 222; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 226; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 230.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT14-014. Интересно отметить, что антитело AT14-014 принадлежит к изотипу IgG3. Антитело AT14-014, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT14-014, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют для уменьшения пролиферации клеток ОМЛ, предпочтительно независимо от апоптоза и/или независимо от АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Предпочтительно, указанное связывающее соединение применяют, чтобы вызвать гибель клеток ОМЛ. В некоторых вариантах реализации такое связывающее соединение применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT14-014 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT14-014.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 211; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 215; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 219; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 223; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 227; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 231.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT14-015. Интересно отметить, что антитело AT14-015 принадлежит к изотипу IgG3. Антитело AT14-015, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT14-015, особенно подходит для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют для уменьшения пролиферации клеток ОМЛ, предпочтительно независимо от апоптоза и/или независимо от АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Предпочтительно, указанное связывающее соединение применяют, чтобы вызвать гибель клеток ОМЛ. В некоторых вариантах реализации такое связывающее соединение применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT14-015 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT14-015.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено выделенное синтетическое или рекомбинантное антитело или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 212; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 216; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 220; и

последовательность CDR1 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 224; и

последовательность CDR2 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 228; и

последовательность CDR3 легкой цепи, включающую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 232.

Данные последовательности представляют собой последовательности CDR антитела AT14-016. Интересно отметить, что антитело AT14-016 принадлежит к изотипу IgG3. Антитело AT14-016, полученное из пациента-человека с ОМЛ, находящегося в полной ремиссии, способно специфично связывать интактные клетки ОМЛ, благодаря чему связывающее соединение, содержащее последовательности CDR, полученные из AT14-016, особенно подходящими для терапии и/или диагностики ОМЛ. Такое связывающее соединение, например, применяют для уменьшения пролиферации клеток ОМЛ, предпочтительно независимо от апоптоза и/или независимо от АЗКЦ, КЗЦ или фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Предпочтительно, указанное связывающее соединение применяют, чтобы вызвать гибель клеток ОМЛ. В некоторых вариантах реализации такое связывающее соединение применяют в виде конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC), таким образом, что токсичное соединение будет направлено на клетки ОМЛ, или его применяют, чтобы вызвать КЗЦ и/или АЗКЦ. В качестве альтернативы или дополнения, такое связывающее соединение можно применять для того, чтобы пометить клетки ОМЛ для специфического фагоцитоза связанными с опухолью миелоидными клетками, такими как

макрофаги или дендритные клетки, такие клетки могут впоследствии вызвать ОМЛ-специфический иммунный ответ. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Выше описано, что по меньшей мере 1, 2 или 3 аминокислотных остатка в перечисленных последовательностях CDR AT14-016 могут отличаться, при этом сохраняя тот же тип активности связывания (по типу, не обязательно по величине). Следовательно, описанные выше последовательности CDR1, -2 и -3 тяжелой и легкой цепей предпочтительно включают последовательности CDR, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от перечисленных последовательностей CDR AT14-016.

Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную последовательность легкой цепи, представленную в табл. 1 или на фиг. 1, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична указанным последовательностям. В табл. 1 показано, что вариабельные последовательности тяжелых цепей антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 79-91 и 233-236, соответственно. Вариабельные последовательности легких цепей антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 92-104 и 237-240, соответственно. Следовательно, также предложено антитело, или его функциональная часть, или эквивалент, согласно настоящему изобретению, содержащее вариабельную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 79-91 и 233-236, и/или содержащее вариабельную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 92-104 и 237-240, или последовательности, которые по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, или даже на 100% идентичны любой из данных последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи. Чем выше идентичность, тем больше антитело похоже на антитело, изображенное на фиг. 1. Предпочтительно, связывающее соединение согласно настоящему изобретению содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи любого из антител, представленных на фиг. 1, вместе с вариабельной последовательностью легкой цепи из того же антитела, или последовательности тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 86%, или по меньшей мере на 87%, или по меньшей мере на 88%, или по меньшей мере на 89%, или по меньшей мере на 90%, или на 91%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 94%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 96%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны указанным последовательностям.

Например, антитело AT12-023 содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 79, и вариабельную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 92, показанные в табл. 1. Следовательно, предпочтительно предложено связывающее соединение согласно настоящему изобретению, содержащее вариабельную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 86%, или по меньшей мере на 87%, или по меньшей мере на 88%, или по меньшей мере на 89%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 91%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 94%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 96%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 79. Предпочтительно, указанное связывающее соединение также содержит вариабельную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 86%, или по меньшей мере на 87%, или по меньшей мере на 88%, или по меньшей мере на 89%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 91%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 94%, или

на 90%, или по меньшей мере на 91%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 94%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 96%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 236. Предпочтительно, указанное связывающее соединение также содержит вариабельную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 86%, или по меньшей мере на 87%, или по меньшей мере на 88%, или по меньшей мере на 89%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 91%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 94%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 96%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 240.

В одном особенно предпочтительном варианте реализации предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое способно связывать snRNP200. SnRNP200, также известный как U5-snRNP, представляет собой белковый комплекс, который является частью сплайсосомы во всех эукариотических клетках. Обычно, snRNP200 расположен в ядре. Тем не менее, в настоящем изобретении предложили неожиданный вывод, что snRNP200 также присутствует на поверхности клеток ОМЛ. Данный антиген связывается по меньшей мере антителами AT12-023, AT13-031 и AT13-037, и функциональными частями и функциональными эквивалентами перечисленных антител. Следовательно, snRNP200 представляет собой важную мишень для направленной против ОМЛ терапии, и snRNP200-специфические антитела согласно настоящему изобретению, следовательно, являются особенно подходящими для противодействия данным клеткам.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена выделенная синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов или ее функциональный эквивалент, кодирующая по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению. Предпочтительно длина молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере 30 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 75 нуклеотидов. Молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, например, выделяют из В-клетки, которая способна продуцировать антитело согласно настоящему изобретению. Указанная В-клетка предпочтительно продуцирует антитело AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037 AT14-013, AT14-014, AT14-015 или AT14-016. В предпочтительном варианте реализации предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению.

В данном изобретении формулировка "выделенная синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов или функциональный эквивалент указанной молекулы, кодирующая по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению", также относится к "молекуле нуклеиновой кислоты или ее функциональному эквиваленту согласно настоящему изобретению".

В данном изобретении молекула нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению предпочтительно включает цепь нуклеотидов, более предпочтительно ДНК, кДНК или РНК. В других вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включает другие виды структур на основе нуклеиновых кислот, такие как например, спираль ДНК/РНК, пептидо-нуклеиновая кислота (ПНК), закрытая нуклеиновая кислота (ЗНК) и/или рибозим. Такие другие структуры на основе нуклеиновых кислот называют функциональными эквивалентами последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, в объем термина "функциональный эквивалент молекулы нуклеиновой кислоты" входит цепь, содержащая неприродные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и/или не относящиеся к нуклеотидам элементы структуры, которые проявляют такую же функцию, как и природные нуклеотиды.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CDR тяжелой цепи и легкой цепи антител AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016, представлены в табл. 1. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие некоторую CDR тяжелой цепи или легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению, которые отличаются от последовательностей нуклеиновых кислот CDR, представленных в табл. 1, но содержат кодоны нуклеиновых кислот, которые кодируют такие же аминокислоты, как и в указанной CDR тяжелой цепи или легкой цепи, также входят в объем настоящего изобретения. Такие молекулы нуклеиновых кислот, например, включают последовательности нуклеиновых кислот, которые были кодон-оптимизированы для экспрессии в клетке-производителе, таком как, например, *E.coli* или клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO (клетки миеломы мыши) или клетки 293(T), чтобы позволить крупномасштабное производство связывающих соединений согласно настоящему изобретению. Следует отметить, что получение антител можно осуществить с помощью лю-

бой системы продукции рекомбинантных антител; четыре системы клеток-продуцентов, упомянутые в данном изобретении, представляют собой лишь немногие примеры многих систем, которые доступны на сегодняшний день. В данном изобретении термин "кодон" означает триплет нуклеотидов (или его функциональные эквиваленты), которые кодируют определенный аминокислотный остаток. Термин "кодон-оптимизированный" означает, что один или более кодонов из исходной человеческой последовательности нуклеиновой кислоты были заменены на один или более кодонов, которые предпочтительны для определенной системы продукции антител. Данные замещающие кодоны предпочтительно кодируют такой же аминокислотный остаток, как и кодируемый исходным человеческим кодоном, который был заменен. В качестве альтернативы, один или более замещающих кодонов кодируют отличный аминокислотный остаток. Это предпочтительно приводит к консервативной замене аминокислоты, хотя и не обязательно. Обычно, в константных областях и каркасных областях, как правило, допускается одна или более замен аминокислот. В определяющих комплементарность областях предпочтительно используют кодоны, которые кодируют такой же аминокислотный остаток, как и кодируемый исходным человеческим кодоном, который был заменен.

Более того, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие некоторую CDR тяжелой цепи или легкой цепи, которая не идентична, но основана на последовательности CDR антитела, представленного в табл. 1, также входят в объем настоящего изобретения, при условии, что последовательность полученной в результате этого CDR по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDR, представленной в табл. 1.

Следовательно, дополнительно предложена молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент указанной молекулы, или вектор, содержащий последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 105-182 и 241-264. Предпочтительно, полученная в результате этого CDR отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно лишь одной аминокислотой от исходной последовательности CDR антитела согласно настоящему изобретению.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот, или их функциональные эквиваленты, или векторы согласно настоящему изобретению содержат:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CDR1 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 105 -117 и 241-244, и/или

последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 118-130 и 245-248, и/или

последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 131-143 и 249-252, и/или

последовательность, кодирующую CDR1 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 144-156 и 253-256, и/или

последовательность, кодирующую CDR2 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 157-169 и 257-260, и/или

последовательность, кодирующую CDR3 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 170 - 182 и 261-264.

Указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно 100%. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит последовательности, кодирующие CDR1-3 тяжелой цепи, и последовательности, кодирующие CDR1-3 легкой цепи, из одного и того же антитела, при этом указанное антитело выбрано из группы, состоящей из AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 и AT14-016, и последовательности, кодирующие CDR1-3 тяжелой цепи, и последовательности, кодирующие CDR1-3 легкой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны указанным последовательностям.

Дополнительно предложена молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов, которые(ый) содержат(ит):

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CDR1 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 105, и

последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 118, и

последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 131, и

мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 243, и

последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 247, и

последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 251, и

последовательность, кодирующую CDR1 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 255, и

последовательность, кодирующую CDR2 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 259, и

последовательность, кодирующую CDR3 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 263.

Перечисленные последовательности SEQ ID NO представляют собой указанные последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепей антитела AT14-015. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно 100%. Предпочтительно, полученные в результате этого последовательности CDR отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно лишь одной аминокислотой от исходных последовательностей CDR антитела AT14-015.

Дополнительно предложена молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов, которые(ый) содержат(ит):

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CDR1 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 244, и

последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 248, и

последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 252, и

последовательность, кодирующую CDR1 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 256, и

последовательность, кодирующую CDR2 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 260, и

последовательность, кодирующую CDR3 легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 264.

Перечисленные последовательности SEQ ID NO представляют собой указанные последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепей антитела AT14-016. Вновь, указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно 100%. Предпочтительно, полученные в результате этого последовательности CDR отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно лишь одной аминокислотой от исходных последовательностей CDR антитела AT14-016.

Предпочтительная молекула нуклеиновой кислоты или вектор(ы) согласно настоящему изобретению кодирует(ют) по меньшей мере вариабельную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную последовательность легкой цепи антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, указанная молекула нуклеиновой кислоты (молекулы нуклеиновых кислот) или вектор(ы) кодирует(ют) по меньшей мере вариабельную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную последовательность легкой цепи антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации предложена молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов согласно настоящему изобретению, который(е) содержит(ат) последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 183-195 и 265-268, и/или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 196-208 и 269-272. Указанная идентичность последовательностей предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов согласно настоящему изобретению содержит(ат) последовательность, коди-

рующую вариабельную область тяжелой цепи, а также последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, которые сходны с последовательностями, кодирующими вариабельные области тяжелой и легкой цепей одного и того же антитела, представленного в табл. 1. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или вектор(ы) согласно настоящему изобретению содержит(ат) последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 или AT14-016, и последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, одного и того же антитела, или последовательности, которые по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичны указанным последовательностям.

В некоторых вариантах реализации предложены молекулы нуклеиновых кислот, и их функциональные эквиваленты, и векторы, которые кодируют антитело, или его функциональную часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению. Следовательно, дополнительно предложена молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов, который(е) кодирует(ют) антитело AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 или AT14-016, или функциональную часть или функциональный эквивалент указанного антитела. В некоторых вариантах реализации указанная молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или вектор(ы) кодон-оптимизированы для не относящейся к человеку рекомбинантной системы экспрессии.

Дополнительно предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению. В данном изобретении "вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению" также называют "вектором согласно настоящему изобретению". В объем данных терминов входит один или более вектор(ов) согласно настоящему изобретению, содержащие одну или более молекул(у) нуклеиновой(ых) кислоты (кислот), или их функциональный(е) эквивалент(ы), согласно настоящему изобретению. В данном изобретении упоминание единственного числа включает термин "один или более".

Способы конструирования векторов, содержащих одну или более молекул(у) нуклеиновых(ой) кислот(ы), или их функциональный(е) эквивалент(ы), согласно настоящему изобретению хорошо известны в данной области. Лишь некоторые из примеров векторов, подходящих для получения вектора согласно настоящему изобретению, представляют собой ретровирусные и лентивирусные векторы. Такие векторы подходят для различных применений. Например, один или более векторов согласно настоящему изобретению, содержащих терапевтически полезную последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, подходят(ит) для профилактического или терапевтического применения, направленного против ОМЛ. Введение такого(их) вектора(ов) индивиду, предпочтительно нуждающемуся в этом человеку, приводит к экспрессии указанной профилактической или терапевтической последовательности нуклеиновой кислоты *in vivo*, приводящей к по меньшей мере частичному лечению или профилактике ОМЛ. Указанный(е) вектор(ы) также можно использовать для применений, включающих экспрессию *in vitro* интересующей молекулы нуклеиновой кислоты, например, для (коммерческого) производства антитела, или его функциональных эквивалентов, согласно настоящему изобретению. Также, следовательно, предложена выделенная или рекомбинантная клетка или не относящееся к человеку животное, содержащее по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или по меньшей мере один вектор согласно настоящему изобретению.

Молекула нуклеиновой кислоты или вектор согласно настоящему изобретению особенно полезны для получения антител, или их функциональных частей или функциональных эквивалентов, согласно настоящему изобретению, которые специфичны к ОМЛ. Такое получение, например, осуществляют путем введения такой молекулы нуклеиновой кислоты или вектора(ов) в клетку таким образом, что аппарат трансляции нуклеиновых кислот в указанной клетке будет продуцировать кодируемые ими антитела, или их функциональные части или функциональные эквиваленты. В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь согласно настоящему изобретению, экспрессируется в так называемых клетках-продуцентах, таких как, например, клетки *E.coli*, CHO, NSO или 293(T), некоторые из которых пригодны для коммерческого производства антител. Следует отметить, что подходит любая система продукции рекомбинантных антител; эти упомянутые четыре системы клеток-продуцентов представляют собой лишь немногие из примеров многих систем, кото-

рые доступны на сегодняшний день. Ранее в данном изобретении было описано, что в таких случаях предпочтительно применение молекул нуклеиновых кислот, в которых исходные человеческие последовательности, приведенные в данном изобретении, были кодон-оптимизированы для данной клетки-продуцента. Пролиферация указанных клеток-продуцентов позволяет получить линию клеток-продуцентов, способных продуцировать связывающие соединения согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, указанная линия клеток-продуцентов подходит для получения антитела для применения у людей. Следовательно, указанная линия клеток-продуцентов предпочтительно свободна от патогенных агентов, таких как патогенные микроорганизмы. В наиболее предпочтительном случае получают антитела, состоящие из человеческих последовательностей, применяя по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или по меньшей мере один вектор согласно настоящему изобретению.

Следовательно, также предложена клетка, продуцирующая выделенное или рекомбинантное антитело, способная продуцировать связывающее соединение согласно настоящему изобретению. Такая клетка обычно содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или по меньшей мере один вектор согласно настоящему изобретению, который предпочтительно включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодон-оптимизирована для указанной клетки. Продуцирующая антитело клетка в данном изобретении означает клетку, которая способна продуцировать и/или секретировать антитела, или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител, и/или которая способна развиться в клетку, которая будет способна продуцировать и/или секретировать антитела, или функциональные части или функциональные эквиваленты указанных антител. Продуцирующая антитело клетка согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой клетку-продуцента, которая пригодна для коммерческого производства антител. Выше объяснено, что указанная клетка-продуцент предпочтительно подходит для продукции антител для применения у людей. Следовательно, также предложен способ получения антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, указанный способ включает предоставление клетки, предпочтительно продуцирующей антитело клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или вектор согласно настоящему изобретению, и обеспечение возможности трансляции указанной клеткой указанной молекулы нуклеиновой кислоты, или ее функционального эквивалента, или вектора, посредством чего получают указанное антитело, или его функциональную часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению. Способ согласно настоящему изобретению предпочтительно дополнительно включает этап сбора, очистки и/или выделения указанного антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению. Полученные связывающие соединения согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют для терапии человека, возможно после дополнительных этапов очистки, выделения или процессинга.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, которое связано с другим соединением. В одном варианте реализации связывающее соединение согласно настоящему изобретению связано с другой терапевтической молекулой, такой как химиотерапевтическое средство или другое токсичное соединение или радиоактивное соединение, с образованием так называемого "конъюгата антитела с лекарственным средством". В другом варианте реализации молекула, которая связана со связывающим соединением согласно настоящему изобретению, представляет собой иммуномодулирующую молекулу, такую как, например, CD3-специфическое антитело. Такое CD3-специфическое антитело способно связывать Т-клетки и, если оно связано со связывающим соединением согласно настоящему изобретению, оно будет нацеливать Т-клетки на клетки ОМЛ, тем самым усиливая противолейкемический Т-клеточный ответ. Это оказывает еще более сильное направленное против ОМЛ действие. В одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложено биспецифическое или мультиспецифическое связывающее соединение, содержащее ОМЛ-специфическое связывающее соединение согласно настоящему изобретению и иммуномодулирующую молекулу, предпочтительно CD3-специфическое связывающее соединение. В другом предпочтительном варианте реализации предложено направленное против ОМЛ соединение, указанное соединение содержит связывающее соединение согласно настоящему изобретению, которое специфично к клеткам ОМЛ, и токсичную молекулу. В некоторых других вариантах реализации связывающее соединение согласно настоящему изобретению связано с меткой. Это позволяет детектировать миелопролиферативные клетки, такие как клетки ОМЛ, применяя такое меченое связывающее соединение. В других вариантах реализации предложено связывающее соединение согласно настоящему изобретению, которое связано с другим связывающим ОМЛ соединением. В некоторых вариантах реализации такое другое связывающее ОМЛ соединение также представляет собой связывающее соединение согласно настоящему изобретению. Следовательно, предложено соединение, содержащее два связывающих соединения согласно настоящему изобретению, которые связаны друг с другом. Тем не менее, это не обязательно, поскольку связывающее соединение согласно настоящему изобретению также может быть связано с другими связывающими ОМЛ соединениями, такими как известные на сегодняшний день антитела, которые связываются с клетками ОМЛ. Биспецифические соединения согласно настоящему изобретению позволяют, например, добиться боль-

шего связывания с клетками ОМЛ, особенно если два соединенных связывающих соединения специфичны к различным эпитопам на клетках ОМЛ. Такое биспецифическое соединение, таким образом, особенно подходит для применения для терапии или диагностики. Также можно использовать биспецифические соединения согласно настоящему изобретению в анализах, в которых различные клетки ОМЛ связываются с одним и тем же биспецифическим связывающим соединением.

В одном варианте реализации предложено синтетическое или рекомбинантное антитело, или функциональная часть или функциональный эквивалент указанного антитела, которое содержит один фрагмент Fab антитела согласно настоящему изобретению и один фрагмент Fab другого антитела согласно настоящему изобретению. Полученное в результате этого связывающее соединение специфично к клеткам ОМЛ, но каждое плечо Fab, как правило, будет связываться с собственным эпитопом. В некоторых вариантах реализации эпитопы, которые узнаются фрагментами Fab, отличны друг от друга. В другом варианте реализации указанные эпитопы одинаковы. Плечи Fab могут связываться с указанными эпитопами с различной аффинностью. В качестве альтернативы, плечи Fab связываются со своими эпитопами по существу с одинаковой аффинностью, что означает, что K_D для указанных плечей Fab отличаются друг от друга не более чем на 30%, предпочтительно не более чем на 20% или не более чем на 10%.

Указанная другая молекула, например, химиотерапевтический агент или CD3-специфическое антитело, предпочтительно связана со связывающим соединением согласно настоящему изобретению посредством линкера, такого как, например, кислотолabileный гидразоновый линкер, или посредством пептидного линкера, такого как цитруллин-валин, или посредством тиоэфирной связи, или путем катализируемого сортазой трансамидирования, которое подробно описано в WO 2010/087994.

Катализируемое сортазой трансамидирование включает конструирование сайта узнавания сортазой (LPETGG) на тяжелой цепи антитела, предпочтительно на С-концевой части тяжелой цепи, и на молекуле, которую нужно связать с указанным антителом. Указанное антитело и указанная молекула, как правило, дополнительно содержат последовательность GGGGS и метку для проведения очистки, такую как гистидиновая метка. Впоследствии осуществляют опосредованное сортазой трансамидирование, а затем соединение путем клик-химии. При катализируемом сортазой трансамидировании "соединение путем клик-химии" обычно включает соединение химическим путем, например, содержащего алкин реагента и, например, содержащего азид реагента, которые добавляются сортазой благодаря добавлению молекул глицина к мотиву распознавания сортазой на тяжелой цепи антитела и к мотиву распознавания сортазой на молекуле (такой как белок, пептид или антитело), которую нужно связать с антителом. В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложено антитело согласно настоящему изобретению, в котором сайт узнавания сортазой (LPETGG) сконструирован на тяжелой цепи антитела, предпочтительно на С-концевой части тяжелой цепи, указанное антитело предпочтительно дополнительно содержит последовательность GGGGS и метку для очистки, такую как гистидиновая метка.

В другом варианте реализации связывающее соединение согласно настоящему изобретению связано с другой молекулой посредством тиоэфирной связи. В данном случае, в связывающее соединение согласно настоящему изобретению предпочтительно добавлен один или более цистеинов. Цистеины содержат тиольную группу, и, следовательно, включение одного или более цистеинов в связывающее соединение согласно настоящему изобретению, или замена одной или более аминокислот на один или более цистеинов в связывающем соединении согласно настоящему изобретению позволяет соединить указанное связывающее соединение с другой молекулой. Указанный один или более цистеинов предпочтительно внедряют в такое положение в связывающем соединении согласно настоящему изобретению, в котором они значительно не влияют на укладку указанного связывающего соединения и значительно не изменяют антигенсвязывающую или эффекторную функцию. В настоящем изобретении, следовательно, также предложено связывающее соединение согласно настоящему изобретению, в котором по меньшей мере одна аминокислота, отличная от цистеина, была заменена на цистеин.

В одном варианте реализации ОМЛ-специфическое связывающее соединение согласно настоящему изобретению связано с по меньшей мере одним другим ОМЛ-специфическим связывающим соединением согласно настоящему изобретению. Такое биспецифическое или мультиспецифическое связывающее соединение оказывает сильное направленное против ОМЛ действие.

Связывающие соединения согласно настоящему изобретению подходят для применения против миелопролиферативных расстройств, таких как ОМЛ, или острых лейкозий, которые развились из миелодиспластического синдрома, хронической миелоидной лейкемии, миелофиброза или других незлокачественных миелопролиферативных синдромов. Так как некоторые из указанных антител также связываются с немиелоидными лимфопролиферативными злокачественными новообразованиями, такими как множественная миелома и В-неходжкинская лимфома (В-НХЛ), они также подходят для применения для лечения данных расстройств. Связывающие соединения согласно настоящему изобретению, следовательно, особенно подходят для применения в качестве лекарства или агента для профилактики. Предпочтительно применяют связывающие соединения согласно настоящему изобретению, которые состоят из человеческих последовательностей, чтобы уменьшить вероятность нежелательных побочных действий при лечении людей. Такие человеческие последовательности можно выделить из человека или получить синтетическим или рекомбинантным способом на основе последовательности антител человека, возмож-

но, применяя кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют такие же аминокислоты, как и в исходной последовательности нуклеиновой кислоты человека. Следовательно, предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства и/или агента для профилактики. Указанное антитело предпочтительно включает антитело, выбранное из группы, состоящей из АТ12-023, АТ12-025, АТ13-024, АТ12-019, АТ13-022, АТ13-023, АТ13-031, АТ12-020, АТ13-033, АТ13-034, АТ13-035, АТ13-036, АТ13-037, АТ14-013, АТ14-014, АТ14-015 и АТ14-016. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент указанной молекулы, согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению, содержащий такую нуклеиновую кислоту или ее функциональный эквивалент, или клетка согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства и/или агента для профилактики. Когда вводят одну или более молекул(у) нуклеиновых(ой) кислот(ы), или их (ее) функциональные(й) эквивалент(ы), (вектор, содержащий их (ее)) согласно настоящему изобретению, указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой(ых) кислоты (кислот), или ее (их) функциональный(е) эквивалент(ы), будет(ут) транслироваться *in situ* аппаратом хозяина в связывающее соединение согласно настоящему изобретению. Полученные связывающие соединения согласно настоящему изобретению способны предупреждать и/или противодействовать миелопролиферативным расстройствам, таким как ОМЛ, и лимфопролиферативным расстройствам, таким как, например, лимфома, В-НХЛ и множественная миелома. Следовательно, дополнительно предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или вектор или клетка согласно настоящему изобретению для применения в способе по меньшей мере частичного лечения или предупреждения миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства. Ранее в данном изобретении было описано, что такое расстройство можно лечить или предупреждать, применяя цитотоксические связывающие соединения согласно настоящему изобретению. В разделе Примеры продемонстрировали, что по меньшей мере антитела АТ13-033, АТ13-035, АТ13-036, АТ13-037, АТ12-023, АТ12-025 и АТ13-031 обладают цитотоксической активностью. Следовательно, дополнительно предложено антитело, выбранное из группы, состоящей из антител АТ13-033, АТ13-035, АТ13-036, АТ13-037, АТ12-023, АТ12-025 и АТ13-031, и функциональных частей и функциональных эквивалентов указанных антител, или молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов, кодирующих их, для применения в способе по меньшей мере частичного лечения или предупреждения миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства.

Предпочтительно, указанное расстройство представляет собой ОМЛ.

В некоторых вариантах реализации связывающее соединение согласно настоящему изобретению соединяют с терапевтической молекулой, такой как химиотерапевтическое средство, или другое токсичное соединение, или радиоактивное соединение, или иммуномодулирующая молекула, такая как например, CD3-специфическое антитело, с получением так называемого "конъюгата антитела с лекарственным средством" или "Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR Т-клетки)", соответственно, которая способна противодействовать миелопролиферативному или лимфопролиферативному расстройству.

В некоторых вариантах реализации указанное лимфопролиферативное расстройство лечат с помощью одного или более антител, выбранных из группы, состоящей из антител АТ12-019, АТ12-023, АТ12-025, АТ13-024 и АТ13-031, и функциональных частей и функциональных эквивалентов указанных антител. Следовательно, дополнительно предложено антитело, выбранное из группы, состоящей из антител АТ12-019, АТ12-023, АТ12-025, АТ13-024 и АТ13-031, и функциональных частей и функциональных эквивалентов указанных антител, или молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, или один или более векторов, кодирующих их, для применения в способе по меньшей мере частичного лечения или предупреждения лимфопролиферативного расстройства. Предпочтительно, указанное лимфопролиферативное расстройство представляет собой лимфому, В-НХЛ или множественную миелому.

Связывающее соединение согласно настоящему изобретению, или молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент указанной молекулы, согласно настоящему изобретению, или по меньшей мере один вектор, или клетку согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют для по меньшей мере частичного лечения и/или предупреждения ОМЛ. В данном изобретении термин "по меньшей мере частичное лечение и/или предупреждение ОМЛ" включает противодействие росту опухоли ОМЛ и/или облегчение симптомов, возникших в результате присутствия клеток ОМЛ у пациента. Также, следовательно, предложено применение антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, или молекулы нуклеиновой кислоты, или ее функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, или по меньшей мере одного вектора или клетки согласно настоящему изобретению, для получения лекарственного средства и/или агента для профилактики для по меньшей мере частичного лечения и/или предупреждения ОМЛ. Дополнительно предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, со-

гласно настоящему изобретению, или по меньшей мере один вектор или клетка согласно настоящему изобретению, для применения в способе по меньшей мере частичного лечения и/или предупреждения ОМЛ.

Предпочтительные антитела для применения в любом из перечисленных способов представляют собой антитела АТ12-023, АТ12-025, АТ13-024, АТ12-019, АТ13-022, АТ13-023, АТ13-031, АТ12-020, АТ13-033, АТ13-034, АТ13-035, АТ13-036, АТ13-037, АТ14-013, АТ14-014, АТ14-015 и АТ14-016.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена композиция, содержащая антитело, или его функциональную часть или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению. Также предложена композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, а также композиция, содержащая вектор или клетку согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере два антитела, их функциональных части или функциональных эквивалентов согласно настоящему изобретению.

Композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно включает фармацевтическую композицию. Указанная фармацевтическая композиция предпочтительно также содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Лишь некоторые из примеров подходящих носителей, например, включают гемоцианин лимфы улитки (ГЛУ), сывороточный альбумин (например, бычий сывороточный альбумин (БСА) или кроличий сывороточный альбумин (КСА)) и овальбумин. В одном предпочтительном варианте реализации указанный подходящий носитель включает раствор, такой как, например, солевой раствор. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно подходит для применения у человека.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ по меньшей мере частичного лечения и/или предупреждения миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, или ее функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, и/или вектора или клетки согласно настоящему изобретению, и/или композиции согласно настоящему изобретению. В данном изобретении "индивид" или "субъект" представляет собой человека или животного, предпочтительно пациента-человека с ОМЛ. Указанная композиция предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению.

Связывающее соединение и/или композиция согласно настоящему изобретению особенно подходит для введения индивидам с нарушенным иммунитетом с повышенным риском осложнений, таким как индивиды, которых подвергли химиотерапии, особенно младенцы и пожилые люди. Связывающее соединение, или молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент указанной молекулы, или вектор, и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению предпочтительно вводят путем одной или более инъекций. Типичные дозы вводимого связывающего соединения согласно настоящему изобретению находятся в диапазоне от 0,1 до 10 мг на кг массы тела.

Связывающее соединение согласно настоящему изобретению также особенно подходит для применения в диагностике. Например, если подозревают, что индивид, предпочтительно человек, страдает от миелопролиферативного расстройства, такого как ОМЛ, или лимфопролиферативного расстройства, такого как В-НХЛ или множественная миелома, то можно проверить присутствие миелопролиферативных клеток или лимфопролиферативных клеток в образце из указанного индивида, таком как образец крови или ткани, применяя связывающее соединение согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, указанный образец смешивают со связывающим соединением согласно настоящему изобретению, которое будет специфично связываться с миелопролиферативными клетками. Миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки, связанные со связывающим соединением согласно настоящему изобретению, можно выделить из образца и/или обнаружить, применяя любой способ, известный в данной области, например, но не ограничиваясь перечисленными способами: выделение с применением магнитных гранул, покрытых стрептавидином гранул, или выделение путем применения вторичных антител, иммобилизованных на колонке. В качестве альтернативы или дополнения, связывающее соединение согласно настоящему изобретению помечено, чтобы позволить детектирование указанного антитела, например, но не ограничиваясь перечисленными способами мечения, пометить флуоресцентной меткой, пометить ферментативной меткой или пометить радиоактивной меткой. В качестве альтернативы, связывающее соединение согласно настоящему изобретению детектируют, применяя меченое вторичное антитело, которое направлено против указанного связывающего соединения. Если связывание указанного антитела обнаружено, то это свидетельствует о присутствии миелопролиферативных или лимфопролиферативных клеток. В настоящем изобретении, следовательно, предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой кислоты, или ее функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или вектор или клетка согласно настоящему изобретению, для применения для обнаружения миелопролиферативных клеток или лимфопролиферативных клеток. Также предложено антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой

кислоты, или ее функциональный эквивалент, согласно настоящему изобретению, или вектор или клетка согласно настоящему изобретению для применения для диагностики миелопролиферативного расстройства или лимфопролиферативного расстройства. Указанное миелопролиферативное расстройство предпочтительно представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах реализации указанное лимфопролиферативное расстройство представляет собой лимфому, В-НХЛ или множественную миелому. Лимфопролиферативные клетки предпочтительно обнаруживают с помощью одного или более антител, выбранных из группы, состоящей из AT12-019, AT12-023, AT12-025, AT13-024 и AT13-031, и функциональных частей и функциональных эквивалентов указанных антител.

Также предложено применение антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, или применение молекулы нуклеиновой кислоты, или ее функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению, или применение вектора или клетки согласно настоящему изобретению для определения того, содержит ли образец миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки, а также способ обнаружения миелопролиферативных клеток или лимфопролиферативных клеток путем применения антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, согласно настоящему изобретению. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ определения того, присутствуют ли миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки в образце, включающий:

приведение указанного образца в контакт с антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, согласно настоящему изобретению, и

обеспечение возможности связывания указанного антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, с миелопролиферативными клетками или лимфопролиферативными клетками, если они присутствуют, и

определение того, связаны или нет миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки с указанным антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, тем самым позволяя определить, присутствуют или нет миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки в указанном образце.

В предпочтительном варианте реализации указанные миелопролиферативные клетки представляют собой клетки ОМЛ. В другом предпочтительном варианте реализации указанные лимфопролиферативные клетки представляют собой клетки лимфомы, В-НХЛ или множественной миеломы. Лимфопролиферативные клетки предпочтительно обнаруживают с помощью одного или более антител, выбранных из группы, состоящей из AT12-019, AT12-023, AT12-025, AT13-024 и AT13-031, и функциональных частей и функциональных эквивалентов указанных антител.

В дополнительном варианте реализации определяют, страдает ли индивид от миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства. Также, следовательно, предложен способ определения того, страдает ли индивид от миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, включающий:

приведение образца из указанного индивида в контакт с антителом или его функциональной частью или функциональным эквивалентом согласно настоящему изобретению, и

обеспечение возможности связывания указанного антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, с миелопролиферативными клетками или лимфопролиферативными клетками, если они присутствуют, и

определение того, связаны или нет миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки с указанным антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, тем самым позволяя определить, страдает или нет указанный индивид от миелопролиферативного расстройства или лимфопролиферативного расстройства. Предпочтительно указанный индивид представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации указанное миелопролиферативное расстройство представляет собой ОМЛ. В других вариантах реализации указанное лимфопролиферативное расстройство представляет собой лимфому, В-НХЛ или множественную миелому.

Ранее в данном изобретении было описано, что в настоящем изобретении предложен неожиданный вывод, что snRNP200 присутствует на поверхности клеток ОМЛ, тогда как snRNP200 обычно располагается только в ядре. Следовательно, snRNP200 представляет собой важную мишень для направленной против ОМЛ терапии. Более того, антитела AT12-023 и AT13-031, которые специфичны к snRNP200, также связывают клетки В-НХЛ и клетки множественной миеломы. Это свидетельствует о том, что экспрессия snRNP200 также происходит на поверхности клеток В-НХЛ и клеток множественной миеломы. Теперь, когда был сделан данный вывод, стали возможными многие применения. Например, специфичные к snRNP200 связывающие соединения теперь можно применять для лечения или предотвращения миелопролиферативных или лимфопролиферативных расстройств. Следовательно, дополнительно предложено применение snRNP200-специфического связывающего соединения для получения лекарственного средства для лечения или профилактики миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, такого как ОМЛ, В-НХЛ или множественная миелома. Также предложено snRNP200-специфическое связывающее соединение для применения в способе по меньшей мере частичного лечения или предупреждения миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, а также в

способе по меньшей мере частичного лечения и/или предупреждения миелопролиферативного или лимфопротиферативного расстройства, включающем введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества snRNP200-специфического связывающего соединения.

Также стали доступны новые способы детектирования. Поскольку snRNP200 обычно присутствует только в ядре, но, похоже, также присутствует на поверхности миелопротиферативных и лимфопротиферативных клеток, данные клетки теперь можно обнаружить и отличить от здоровых клеток путем определения того, присутствует ли snRNP200 на их поверхности. Следовательно, дополнительно предложен способ определения того, является ли миелоидная клетка или лимфоидная клетка миелопротиферативной клеткой или лимфопротиферативной клеткой, указанный способ включает определение того, присутствует ли snRNP200 на поверхности указанной клетки, при этом присутствие snRNP200 на поверхности указанной клетки свидетельствует о том, что указанная клетка является миелопротиферативной или лимфопротиферативной. Также предложен способ идентификации миелопротиферативных или лимфопротиферативных клеток, включающий обнаружение присутствия snRNP200 на поверхности указанных клеток. В данном изобретении формулировка "экспрессия присутствует около поверхности клетки" или "экспрессия присутствует на поверхности клетки" означает, что по меньшей мере часть snRNP200 присутствует на поверхности или внутри поверхности клетки или связана с ней.

В некоторых вариантах реализации подвергают типированию образец, содержащий клетки из индивида. В некоторых вариантах реализации в таком образце, который обычно содержит лимфоидные клетки и/или миелоидные клетки, исследуют присутствие snRNP200 на поверхности данных клеток. Если похоже, что snRNP200 присутствует на поверхности клеток, то указанный образец относят к типу образцов, содержащих миелопротиферативные или лимфопротиферативные клетки. Следовательно, дополнительно предложен способ типирования образца, содержащего миелоидные клетки, или образца, содержащего лимфоидные клетки, из индивида, указанный способ включает определение того, присутствует ли snRNP200 на поверхности клеток из указанного образца. А если это так, то, это свидетельствует о том, что миелопротиферативные клетки или лимфопротиферативные клетки присутствуют в указанном образце.

В некоторых вариантах реализации указанный индивид страдает, или подозревают, что он страдает, от миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства. Тем не менее, это не обязательно, поскольку такой способ типирования также может быть частью общего скринингового анализа, например, для проверки состояния здоровья.

Указанный образец может представлять собой любой образец, который содержит миелоидные и/или лимфоидные клетки, например, такой как образец костного мозга, образец ткани или образец лимфатической жидкости. Предпочтительно, указанный образец содержит моноклеарные клетки периферической крови, поскольку образец крови легко получить с незначительным дискомфортом для индивида.

В настоящем изобретении предложен вывод, состоящий в том, что по меньшей мере подгруппа пациентов, которые страдают от миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства, продуцирует антитела, которые специфичны к snRNP200. Присутствие таких антител в образце из индивида, следовательно, свидетельствует о наличии миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства. Следовательно, дополнительно предложен способ определения того, страдает ли индивид от миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства, включающий определение того, содержит ли образец из указанного индивида антитела, которые специфичны к snRNP200. В некоторых вариантах реализации такой способ включает следующие этапы:

- приведение образца из указанного индивида в контакт с snRNP200 или его эпитопом;
- обеспечение возможности связывания указанного snRNP200 или его эпитопа с snRNP200-специфическими антителами из указанного образца, если они присутствуют; и
- определение того, связан или нет указанный snRNP200 или его эпитоп с snRNP200-специфическими антителами, при этом связывание указанного snRNP200 или его эпитопа с snRNP200-специфическими антителами свидетельствует о том, что указанный индивид страдает от миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства.

Скрининговые анализы, упомянутые в данном изобретении, можно осуществить, применяя такие способы, как, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологические анализы (RIA), анализы вестерн-блот и анализы путем иммуногистохимического окрашивания. Данные анализы хорошо известны в данной области и, следовательно, не требуют дополнительного объяснения. Вариации или модификации ELISA, RIA, анализа вестерн-блот и анализа путем иммуногистохимического окрашивания также известны в данной области.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ определения того, повышен ли шанс пациента, страдающего от миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства, на положительный исход лечения антителом, его функциональной частью или функциональным эквивалентом, согласно настоящему изобретению, по сравнению со средним шансом в популяции пациентов, страдающих от миелопротиферативного или лимфопротиферативного расстройства, указанный способ включает определение того, присутствует ли snRNP200 на поверхности миелопротиферативных клеток или лим-

фопрролиферативных клеток из указанного пациента. Если это так, то snRNP200-специфические антитела, такие как AT12-023, AT13-031 и AT13-037, особенно подходят для противодействия такому миелопрролиферативному или лимфопрролиферативному расстройству. Следовательно, если известно, что миелопрролиферативные или лимфопрролиферативные клетки из индивида экспрессируют snRNP200 на своей поверхности, то шанс на успешное лечение повышен. Такой способ согласно настоящему изобретению предпочтительно включает следующие этапы:

приведение образца, содержащего миелопрролиферативные клетки или лимфопрролиферативные клетки, из указанного индивида в контакт с антителом или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, которое специфично к snRNP200;

обеспечение возможности связывания указанного антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, с миелопрролиферативными клетками или лимфопрролиферативными клетками из указанного образца; и

определение того, связано или нет указанное snRNP200-специфическое антитело, или его функциональная часть или функциональный эквивалент, с миелопрролиферативными клетками или лимфопрролиферативными клетками из указанного образца, при этом связывание указанного snRNP200-специфического антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, с миелопрролиферативными клетками или лимфопрролиферативными клетками из указанного образца свидетельствует о том, что у указанного пациента повышен шанс на положительный исход лечения антителом, его функциональной частью или функциональным эквивалентом, согласно настоящему изобретению, по сравнению со средним шансом в популяции пациентов, страдающих от миелопрролиферативного или лимфопрролиферативного расстройства.

Указанное лечение предпочтительно включает применение антитела AT12-023, AT13-031 или AT13-037, или функциональных частей или функциональных эквивалентов указанных антител, поскольку по меньшей мере данные антитела способны связывать snRNP200. Следовательно, дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению, или антитело для применения согласно настоящему изобретению, или применение или способ согласно настоящему изобретению, где указанное антитело представляет собой AT12-023, AT13-031, AT13-037, или функциональную часть или функциональный эквивалент указанных антител.

Если предполагается применение антитела AT12-023, AT13-031 и/или AT13-037, то предпочтительно заблаговременно определить, содержатся ли у данного пациента злокачественные клетки, которые экспрессируют snRNP200 на своей поверхности. В некоторых вариантах реализации, следовательно, предложен способ определения того, является ли пациент, страдающий от миелопрролиферативного расстройства или лимфопрролиферативного расстройства, кандидатом для лечения антителом AT12-023, AT13-031 или AT13-037, или функциональной частью или функциональным эквивалентом указанного антитела, указанный способ включает определение того, присутствует ли snRNP200 на поверхности миелопрролиферативных клеток или лимфопрролиферативных клеток из указанного пациента.

В некотором способе согласно настоящему изобретению указанное миелопрролиферативное расстройство предпочтительно представляет собой ОМЛ, и указанные миелопрролиферативные клетки предпочтительно представляют собой клетки ОМЛ. Более того, указанное лимфопрролиферативное расстройство предпочтительно представляет собой лимфому, В-неходжкинскую лимфому или множественную миелому, и указанные лимфопрролиферативные клетки предпочтительно представляют собой клетки лимфомы, В-неходжкинской лимфомы или множественной миеломы.

Приведенные выше процедуры для обнаружения миелопрролиферативных или лимфопрролиферативных клеток с применением связывающих соединений согласно настоящему изобретению, например, особенно подходят для определения того, проявляет ли ответ ТПЛ пациент, страдающий от миелопрролиферативного расстройства или лимфопрролиферативного расстройства, который получил терапевтическое лечение, такой как, например, пациент с ОМЛ, которого лечили от ОМЛ, например, пациент с ОМЛ, который получил иммунотерапию, такую как трансплантация стволовых клеток или инфузия донорских лимфоцитов. До сегодняшнего дня не существовало средств диагностики для тестирования наличия эффективного ответа ТПЛ у подвергнутого лечению пациента. Такое средство диагностики остро необходимо, например, так как:

1) оно позволит раннюю идентификацию реципиентов аллогенной ТСК с высокой степенью риска рецидива, в момент времени до возникновения рецидива, что позволит раньше принять меры, такие как постепенное снижение количества иммуносупрессоров или инфузии донорских лимфоцитов;

2) оно позволит титровать такие инфузии донорских лимфоцитов до тех пор, пока не появятся противотоксические антитела; и

3) оно даст надежду реципиентам аллогенной ТСК в то время как они часто страдают от одного из многих связанных с ТСК осложнений, когда можно продемонстрировать наличие эффективного ответа ТПЛ.

В настоящее время пациенты должны ждать и наблюдать, происходит рецидив или нет, и не существует способов прогнозирования рецидива заболевания. Доступность теста для определения того, проявляет ли пациент ответ ТПЛ, следовательно, сильно улучшит клиническое ведение пациентов, которым

провели ТСК, окажет влияние на прогноз и качество их жизни. Следовательно, дополнительно предложено применение связывающего соединения согласно настоящему изобретению для определения того, свидетельствует ли образец о наличии ответа ТПЛ. Также предложено применение связывающего соединения согласно настоящему изобретению для определения того, проявляет или нет пациент с ОМЛ ответ ТПЛ, и применение связывающего соединения согласно настоящему изобретению для определения того, эффективно ли лечение, направленное против миелопролиферативного или лимфопролиферативного заболевания, такое как, например, направленная против ОМЛ терапия, направленная против В-НХЛ терапия или направленная против множественной миеломы терапия. Это, например, осуществляют путем определения того, содержит ли образец (например, образец крови или ткани) из пациента (который, например, получил ТСК, или ИДЛ, или любую другую форму иммунотерапии) миелопролиферативные или лимфопролиферативные клетки, например, клетки ОМЛ, клетки В-НХЛ или клетки множественной миеломы. Отсутствие миелопролиферативных или лимфопролиферативных клеток свидетельствует о том, что указанный пациент проявляет ответ ТПЛ. Следовательно, дополнительно предложен способ определения того, проявляет ли пациент, страдающий от миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, который получил иммунотерапию, направленную против указанного расстройства, ответ ТПЛ, указанный способ включает приведение образца из указанного пациента в контакт с антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, согласно настоящему изобретению, и обеспечение возможности связывания указанного антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, с миелопролиферативными или лимфопролиферативными клетками, если они присутствуют, и определение того, связаны ли нет миелопролиферативные клетки или лимфопролиферативные клетки с указанным антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, с помощью чего определяют проявляет ли нет указанный индивид ответ ТПЛ, при этом отсутствие миелопролиферативных или лимфопролиферативных клеток свидетельствует об ответе ТПЛ, а присутствие миелопролиферативных или лимфопролиферативных клеток свидетельствует об отсутствии ответа ТПЛ или о недостаточном (неэффективном) ответе ТПЛ. В некоторых вариантах реализации указанное лимфопролиферативное расстройство представляет собой лимфому, В-НХЛ или множественную миелому. В некоторых вариантах реализации указанное миелопролиферативное расстройство представляет собой ОМЛ. Следовательно, также предложен способ определения того, проявляет ли пациент с ОМЛ, который получил направленную против ОМЛ иммунотерапию, ответ ТПЛ, указанный способ включает приведение образца из указанного пациента с ОМЛ в контакт с антителом или его функциональной частью или функциональным эквивалентом согласно настоящему изобретению; обеспечение возможности связывания указанного антитела, или его функциональной части или функционального эквивалента, с клетками ОМЛ, если они присутствуют; и определение того, связаны ли нет клетки ОМЛ с указанным антителом, или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, что позволяет определить, проявляет ли нет указанный индивид ответ ТПЛ, при этом отсутствие клеток ОМЛ свидетельствует об ответе ТПЛ, а наличие ответа ОМЛ свидетельствует об отсутствии ответа ТПЛ или о недостаточном (неэффективном) ответе ТПЛ. Предпочтительно указанный индивид представляет собой человека. В качестве альтернативы, связывающие соединения согласно настоящему изобретению, которые помечены детектируемой молекулой, такой как, например, соединение меди, вводят пациенту с ОМЛ, который получил направленную против ОМЛ иммунотерапию, такую как ТСК или ИДЛ, и впоследствии определяют, связано ли указанное меченое анти тело с клетками ОМЛ из указанного пациента *in vivo*, например, применяя ПЭТ-сканирование. Отсутствие связанных связывающих соединений свидетельствует об ответе ТПЛ, а присутствие связанных связывающих соединений свидетельствует об отсутствии ответа ТПЛ или о недостаточном (неэффективном) ответе ТПЛ.

Также можно определить количество антитела, принадлежащего к семейству VH4-34, до и после проведения направленной против ОМЛ иммунотерапии. Если количество антитела, принадлежащего к семейству VH4-34, которое представляет собой семейство последовательностей VH, известных своей потенциальной способностью убивать клетки (Bhat и др., 1997), значительно увеличилось после иммунотерапии, то это свидетельствует о том, что присутствует ответ ТПЛ. Следовательно, дополнительно предложен способ определения того, проявляет ли пациент с ОМЛ, который получил направленную против ОМЛ иммунотерапию, ответ ТПЛ, указанный способ включает определение количества антитела, принадлежащего к семейству VH4-34, до и после проведения направленной против ОМЛ иммунотерапии, и определение того, произошло ли значительное увеличение количества антитела, принадлежащего к семейству VH4-34, после иммунотерапии. А если это так, то приходят к выводу, что у указанного пациента наблюдается ответ ТПЛ. Если это не так, то приходят к выводу, что ответ ТПЛ отсутствует или не достаточен.

Настоящее изобретение дополнительно объяснено в следующих примерах. Данные примеры не ограничивают объем настоящего изобретения, но предоставлены лишь для пояснения настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Последовательности антител АТ12-023, АТ12-025, АТ13-024, АТ12-019, АТ13-022, АТ13-023, АТ13-031, АТ12-020, АТ13-033, АТ13-034, АТ13-035, АТ13-036, АТ13-037, АТ14-013, АТ14-014, АТ14-015 и АТ14-016.

Фиг. 2. 36-летняя пациентка с ОМЛ, у которой наблюдалась полная ремиссия после первого цикла индукционной химиотерапии, и которая получила миелоаблативную (МА) аллогенную трансплантацию стволовых клеток (ТСК) от HLA-совместимого родного брата в качестве консолидирующей терапии. Тем не менее, произошел рецидив ОМЛ через 5 месяцев после трансплантации. Повторная индукционная химиотерапия снова привела к полной ремиссии и к тяжелой (IV степени) реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) в печени и к I степени РТПХ в коже. Наблюдение, что у нее продолжалась полная ремиссия в течение более чем трех лет, теперь означает, что у нее развился эффективный ответ трансплантата против лейкемии. В-лимфоциты выделяли из продукта флеботомии, полученного приблизительно через 1,5 года после одного цикла повторной индукционной химиотерапии.

Фиг. 3.

а) Супернатант из одной из миникультур (20 или 40 клеток на лунку), связывающийся с линией клеток ОМЛ - ТНР-1.

б) В-клетки из данной миникультуры высевали в виде растворов, содержащих 1 клетку/лунку, и супернатанты снова подвергали скринингу для обнаружения связывания с ТНР-1.

ТНР-1 экспрессируют HLA-DR, который в данном скрининговом эксперименте использовали в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональное антитело, специфичное к вирусу гриппа.

Фиг. 4. Два примера идентифицированных ОМЛ-специфических антител. АТ12-023 (а) и АТ13-031 (б) связываются с линиями клеток ОМЛ ТНР-1 и МоноМас6, но не со здоровыми моноклеарными клетками периферической крови (МКПК), эндотелиальными клетками (эндотелиальными клетками пупочной вены человека: HUVEC), линией Т-клеток Jurkat, первичными фибробластами, гепатоцитами (линией клеток печеночно-клеточной карциномы: HepG2) или линией клеток аденокарциномы толстого кишечника HT-29. MRSA-mAb F1 представляет собой полученное внутри лаборатории МАТ IgG3 человека, которое использовали в качестве контрольного антитела.

Фиг. 5. Антитела, полученные из донора 59, связываются с линиями клеток ОМЛ - ТНР-1 и МоноМас6-и с первичными лейкоэмическими бластными клетками, выделенными из пациентов с впервые диагностированной ОМЛ (в диапазоне ФАБ-классификаций М0 - М4). См. также табл. 3 для более подробного обзора.

Фиг. 6. Некоторые из указанных антител также связываются с другими гематологическими злокачественными новообразованиями. Здесь показано связывание АТ12-023 (антител, выделенных из супернатанта клона В-клетки) и АТ13-031 (рекомбинантного антитела) с клетками В-неходжкинской лимфомы (В-НХЛ), свежевыделенными из пациента с лимфомой. Указанные антитела не связывались с незлокачественными В-клетками (не показано в данном эксперименте). Антитело к вирусу саркомы Рауса (BCR) - паливизумаб -использовали в качестве отрицательного контроля, а ритуксимаб, антитело к CD20, специфично связывающее В-клеточную лимфому, - в качестве положительного контроля. Более подробное описание антитела, связывающегося с другими гематологическими злокачественными новообразованиями, см. в табл. 4.

Фиг. 7. Клетки ТНР-1 культивировали в среде отдельно или с добавлением антител при концентрации 5 мкг/мл в день 0. В присутствии АТ12-023 выявили значительное ингибирование роста клеток ТНР-1. Изображены суммарные количества клеток в культуре.

Фиг. 8. При добавлении антител АТ12-023 и АТ12-025 в культуру в день 0 сильно уменьшалась жизнеспособность клеток ТНР-1. Жизнеспособность изображена в виде доли клеток, дважды отрицательных по маркерам гибели клеток - аннексину V и 7AAD.

Фиг. 9. Для того чтобы определить количество клеток ТНР-1, специфическим образом уничтоженных антителом АТ12-023, мы использовали анализ высвобождения ацетооксиметилового эфира кальцеина (кальцеина-АМ). Вкратце, перед тем, как клетки ТНР-1 инкубировали с АТ12-023, указанные клетки ТНР-1 нагружали кальцеином-АМ, который высвобождался, когда клетки погибали и клеточная мембрана становилась нестабильной. Считывали количество лизированных клеток после 4 ч инкубации и определяли соотношение между ним и фоновой гибелью нагруженных кальцеином клеток, измеренной с помощью постороннего антитела.

Фиг. 10.

а) Помимо уничтожения клеток ТНР-1, АТ12-025 также вызывает гибель первичных опухолевых клеток, аналогично АТ13-024. Лейкемические бластные клетки, выделенные из пациента с ОМЛ-М5 в момент постановки диагноза, инкубировали с АТ12-025 или АТ13-024 (5 мкг/мл) в течение 24 ч при 37°C, после чего клетки окрашивали 7AAD и аннексином V, чтобы определить количество мертвых клеток (положительных по двум маркерам: 7AAD и аннексину V).

б) Кроме того, в качестве маркера для определения умирающих клеток можно использовать лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

Лейкемические бластные клетки, выделенные из пациента с ОМЛ-М0, инкубировали с АТ13-024 или с антителом к ВСР паливизумабом в течение 18 ч, после чего измеряли высвобождение ЛДГ. В данных двух экспериментах показали, что АТ13-024, но не паливизумаб, вызывало гибель лейкемических бластных клеток, и что данное свойство не было ограничено одним типом ОМЛ, но также включало различные типы по ФАБ-классификации (от М0 до М5).

Фиг. 11. У донора 58 была диагностирована ОМЛ-М5, для лечения которой она получила три цикла химиотерапии. У нее сохранялась полная ремиссия в течение приблизительно года, после чего произошел рецидив ОМЛ. Она получила один цикл повторной индукционной химиотерапии, а затем аллогенную трансплантацию стволовых клеток в условиях пониженной интенсивности (ТСКПИ) от совместимого неродственного донора (СНД). У нее развилась I степень РТПХ в печени и на данный момент сохраняется полная ремиссия в течение почти 4 лет, подразумевая, что у нее развился эффективный ответ трансплантата против лейкемии. В-клетки выделяли из продукта флеботомии, полученного из данной пациентки приблизительно через 3 года после ТСК.

Фиг. 12. Антитела, полученные из донора 58, связываются с линиями клеток ОМЛ ТНР-1 и MonoMac6. Паливизумаб, доступное для приобретения специфичное к ВСР антитело, использовали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 13. История болезни третьего пациента с эффективным ответом ТПЛ. У донора 101 была диагностирована ОМЛ промежуточного риска (отсутствовали цитогенетические или молекулярные отклонения от нормы; ОМЛ-М5 по ФАБ-классификации) в возрасте 49 лет. Он получил два курса химиотерапии и один курс консолидирующей химиотерапии, а затем аутологичную ТГСК, так как у него не было доступного НЛА-совместимого родственного донора стволовых клеток. Через четырнадцать месяцев после первой диагностики произошел рецидив его заболевания. Полной ремиссии у него добились после одного цикла химиотерапии цитарабином в высокой дозе, после которой он получил аллогенную ТГСК в условиях пониженной интенсивности от совместимого неродственного донора (ТСКПИ-СНД). Через шесть недель у него развилась острая РТПХ в коже, печени и кишечнике (стадия I; степень II), которая хорошо отвечала на терапию кортикостероидами. В-клетки выделяли из продукта флеботомии, полученного из данного пациента через 38 месяцев после аллогенной ТГСК. На сегодняшний день у него сохраняется длительная ремиссия.

Фиг. 14. Антитела, полученные из донора 101, связываются с линиями клеток ОМЛ - ТНР-1 и Molm13, но не с фибробластами, моноцитами, В-клетками и Т-клетками. Полученное внутри лаборатории антитело человека против CD30 использовали в качестве отрицательного контроля. АТ14-013 проявило незначительную реакционную способность с фибробластами, по сравнению с его связыванием с линиями клеток ОМЛ. См. обзор связывающих способностей антител, полученных из донора 101, в табл. 7 и 8.

Фиг. 15. ОМЛ-специфическое антитело АТ14-013 (донор 101) связывает первичные лейкемические бластные клетки, выделенные из пациентов с впервые диагностированной ОМЛ (М0 - М5 по ФАБ-классификации). Отрицательный контроль: полученное внутри лаборатории антитело к CD30. Обзор способностей антител, полученных из донора 101, связывать первичные бластные клетки ОМЛ см. в табл. 7.

Фиг. 16. Антитело АТ13-037 вызывает гибель первичных бластных клеток. Лейкемические бластные клетки, выделенные из пациента с ОМЛ при постановке диагноза (BL-038; ОМЛ-М5), инкубировали с антителами, очищенными из супернатантов исходного клона В-клетки (sAT13-037), или с рекомбинантным антителом (rAT13-037) при концентрации 5 мкг/мл в течение 4 ч при 37°C, после чего клетки окрашивали с помощью маркера гибели клеток Dapi. Для количественного определения гибели клеток добавляли стандартное количество гранул. Рекомбинантное антитело, специфичное к вирусу гриппа, - rAT10-002 - использовали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 17. Цитотоксические антитела индуцировали неапоптотический путь гибели:

а) Визуализация методом фазового контраста клеток ТНР-1. Клетки ТНР-1 инкубировали с нецитотоксическим ОМЛ-специфическим антителом АТ13-023 (слева) или с цитотоксическим ОМЛ-специфическим антителом АТ13-037 (справа). Взаимодействие визуализировали, применяя замедленную визуализацию, и продемонстрировали набухание целевых клеток, после чего клетки погибали. Кадры были получены через 4 ч инкубации, где голубые стрелки указывают на большие клетки, которые погибли.

б) Двойное окрашивание DiOC6 и йодидом пропидия (PI) показало, что цитотоксические антитела не вызывают апоптоз. Клетки ТНР-1 инкубировали с цитотоксическим ОМЛ-специфическим антителом АТ12-023, с диклофенаком (который вызывает апоптоз в клетках ТНР-1) или только со средой. Клетки, перетерпевающие апоптоз, сначала утрачивают трансмембранный потенциал митохондрий (утрата окрашивания DiOC6), после чего они становятся проницаемыми (PI-положительными), что можно наблюдать после инкубации клеток ТНР-1 с диклофенаком. У клеток ТНР-1, которых инкубировали с АТ12-023, выявили повышенную проницаемость мембран (PI+), но у них сохранился трансмембранный потенциал митохондрий (DiOC6+), что свидетельствует об индукции неапоптотического пути гибели клеток.

с) Для того чтобы подтвердить неапоптотическую природу вызванного пути гибели, мы исследовали

участие каспаз в индукции гибели клеток. Гибель клеток ТНР-1 под воздействием ОМЛ-специфических антител не предотвращалась при добавлении неспецифических ингибиторов каспаз Q-VD-OPh (слева) или Z-VAD-fmk (справа).

Фиг. 18. Гибель клеток, вызванная ОМЛ-специфическими антителами, также происходила при 4°C, что предполагало вовлечение пассивного процесса. Это соблюдалось для всех антител, за исключением АТ13-031, которое было цитотоксическим лишь при 37°C (не показано). Отрицательные контроли включали ОМЛ-специфические нецитотоксические антитела АТ13-034, АТ12-019, АТ13-022, АТ13-023 и АТ13-024.

Фиг. 19.

а) Инкубация целевых клеток с цитохалазином D не ингибировала связывание с указанными антителами. Клетки ТНР-1 инкубировали с цитохалазином D, после чего добавляли ОМЛ-специфические антитела АТ12-023, АТ13-031 и АТ13-037.

(b) Предварительная инкубация целевых клеток со стабилизирующим мембраны агентом цитохалазином D не защищала клетки ТНР-1 от гибели под воздействием ОМЛ-специфических цитотоксических антител.

Фиг. 20. Проверка мишени АТ12-023, АТ13-031 и АТ13-037:

а) Лизат мембран ТНР-1 инкубировали с АТ12-023 и АТ13-031, с антителом, специфичным к вирусу гриппа, АТ10-002, или с маркером отдельно. Анализ вестерн-блот с антителом мыши к snRNP200 человека (и HMGB1 в качестве отрицательного контроля) выявил специфическое связывание АТ12-023 и АТ13-031 с snRNP200.

б) ОМЛ-специфическими антителами АТ12-019, АТ12-023, АТ13-031 и АТ13-037 или доступными для приобретения snRNP200-специфическими антителами snRNP200 453 и snRNP200 454 покрывали планшет ELISA, инкубировали с конструкцией snRNP200-FLAG для захвата и с антителом к FLAG, меченным HRP, для обнаружения. АТ12-023, АТ13-031 и АТ13-037 специфично связывали snRNP200, и при этом не связывали отрицательные контроли и, например, АТ12-019.

Фиг. 21. Клетки ТНР-1 экспрессируют snRNP200 на мембране. Клетки ТНР-1 и клетки Jurkat окрашивали с помощью доступного для приобретения антитела человека к snRNP200 мыши. Внутриклеточное окрашивание клеток Jurkat и клеток ТНР-1 выявило окрашивание ядра, как и ожидали (слева). Тем не менее, окрашивание мембранного snRNP200 наблюдалось только в клетках ТНР-1 (справа).

Примеры

Пример 1.

Материалы и методы.

Материалы из пациентов и здоровых людей.

Протоколы исследований были одобрены Медицинской комиссией по вопросам этики Академического медицинского центра. Все участники подписали информированное согласие. Мы выбрали двух пациентов, которые получили аллогенную трансплантацию стволовых клеток (миелоаблативную трансплантацию от родственного донора для донора 59 и трансплантацию стволовых клеток от совместимого неродственного донора в условиях пониженной интенсивности для донора 58) для лечения ОМЛ, и у которых, на основании их историй болезни, можно было предположить развитие сильных ответов трансплантата против лейкемии. Каждый из двух указанных реципиентов ТСК пожертвовал по 500 мл периферической крови: продукты одной из многих флеботомий, которым их подвергли, чтобы избежать посттрансфузионной гиперферритинемии. Кроме того, пациенты, госпитализированные в нашу клинику с впервые диагностированной ОМЛ, согласились сдать по 2-5 мл костного мозга или крови, содержащих бластные клетки ОМЛ, для их применения в анализах связывания антител. Здоровый костный мозг пожертвовали пациенты, подвергнутые торакотомии для проведения операции на сердце в нашем институте. Клетки В-неходжкинской лимфомы получили как остаточный материал от биоптатов из пациентов с впервые диагностированной В-неходжкинской лимфомой. Данные клетки В-неходжкинской лимфомы использовали для анализа связывания наших антител, описанного ниже. Остаточный материал эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES), свежевыделенных на Кафедре офтальмологии (АМС, Амстердам, Нидерланды), непосредственно использовали в анализах связывания, описанных ниже. Для обеспечения чистоты клетки также окрашивали антителами к CD14 человека и осуществляли селекцию CD14⁺ клеток.

Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови и костного мозга здоровых индивидов и пациентов с ОМЛ путем разделения в градиенте плотности фикола. Дополнительные маркеры, такие как CD45, CD33, CD34, CD14, CD3 и CD19, использовали для выделения определенных популяций клеток (бластных клеток ОМЛ, моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, соответственно, полученных из зарегистрированных доноров крови).

Выделение В-клеток.

Мы получили В-клетки из периферической крови путем разделения в градиенте плотности фикола и магнитной сортировки (MACS) с помощью микрогранул с CD22 (Miltenyi Biotec). Впоследствии мы подвергли данные клетки сортировке по маркерам CD27⁻ или CD27⁺ CD19⁺CD3⁺IgM⁺IgA⁻ (непримированные клетки или несущие IgG клетки памяти, соответственно) и CD19⁺CD3⁻CD27⁺IgG⁺IgA⁻

(несущие IgM клетки памяти) на устройстве для проведения сортировки клеток с возбуждением флуоресценции FACS Aria (Becton Dickinson).

Культура клеток.

Мы поддерживали В-клетки (2×10^5 клеток/мл) в культуральной среде IMDM (Gibco), содержащей 8% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche), дополненной рекомбинантным IL-21 мыши (50 нг/мл, собственного производства), и подвергали совместному культивированию на у-облученных (50 грей) L-клетках (фибробластах) мыши, стабильно экспрессирующих CD40L (CD40L-L-клетки, 10^5 клеток/мл). Культуры исследовали обычным способом на наличие микоплазмы с помощью ПЦР (результаты не представлены).

Ретровирусная трансдукция.

Ретровирусную трансдукцию осуществляли, как описано в Kwakkenbos и др., Nat Med, 2010. Вкратце, непримированные В-клетки и несущие IgG и несущие IgM В-клетки памяти культивировали и активировали в течение 36 ч на CD40L-L-клетках в присутствии IL-21 мыши (mIL-21). Затем ретровирусные конструкции с BCL6 и Bcl-xL, которые содержали маркерный ген, кодирующий GFP, использовали для трансдукции В-клеток, как описано ранее (Diehl и др., J Immunol, 2008), с одним дополнением, состоящим в том, что мы центрифугировали клетки и вирус при комнатной температуре в течение 60 мин при $360 \times g$ (1800 об/мин). Эффективность трансдукции находилась в диапазоне 69-90%.

Культивирование целевых линий клеток.

Целевые линии клеток ОМЛ THP-1 (Американская коллекция типовых культур (ATCC); плотность от 2×10^5 клеток/мл до 1×10^6 клеток/мл) и Mono-Mac6 (любезно предоставленные Dr. Hamann с Кафедры экспериментальной иммунологии, плотность от 2×10^5 клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл) поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco), содержащей 10% ЭБС (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche). Культуральную среду для Mono-Mac6 обогащали заменимыми аминокислотами (Invitrogen), 1 мМ пируватом натрия (Invitrogen) и 10 мкг/мл инсулина человека (Sigma). Линию клеток ОМЛ Molm13 поддерживали при плотности от 5×10^5 клеток/мл до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco), содержащей 20% ЭБС (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche). Линии клеток печени HepG2 и Huh7 и линию клеток толстого кишечника HT29 (любезно предоставленные из Tytgat Institute, AMC, Амстердам, Нидерланды) культивировали в культуральной среде DMEM (Gibco), содержащей 8% ЭБС (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche). Линию клеток Jurkat острой Т-клеточной лейкемии (ATCC) поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco), содержащей 10% ЭБС (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche), при плотности от 1×10^5 клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл. Первичные фибробласты кожи (любезно предоставленные Лейденским университетом, Нидерланды) культивировали с пересеванием дважды в неделю в культуральной среде DMEM (Gibco), содержащей 10% ЭБС (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche). Клетки пересевали не более 10 раз. Линии клеток диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL) OCI-Ly1 и OCI-Ly7 (DSMZ и ATCC, соответственно) поддерживали в культуральной среде IMDM (Gibco), содержащей 8% ЭБС (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche). Указанные культуры поддерживали при плотности $0,5-2 \times 10^6$ клеток/мл.

Наконец, линии клеток множественной миеломы (MM) U266 и NCI-H929 поддерживали и культивировали, как описано для клеток THP-1.

Получение ОМЛ-специфических клонов.

Трансдуцированные непримированные В-клетки и несущие IgG и несущие IgM В-клетки памяти из каждого пациента высевали при концентрации 20 или 40 клеток на лунку (далее их называют микрокультурами) и растили с добавлением IL-21 и CD40L. Супернатанты выращенных микрокультур В-клеток затем подвергали скринингу на связывание антител с линиями клеток лейкемии (THP-1, MonoMac6 и линиями клеток, представленными в табл. 4), с линиями клеток печени и толстого кишечника, и некоторые супернатанты также подвергали скринингу на наличие антител, связывающихся с первичными бластными клетками, выделенными из пациентов с ОМЛ M0, M1, M4 и M5, посредством FACS, применяя IgG человека, меченые PE (Southern Biotech), или IgG H+L человека, меченые AF647 (Life Technologies), в качестве вторичного антитела. Некоторые антитела собственного производства использовали для отрицательного контроля антител, такие как антитело к CD30 (экспрессируется на активированных В- и Т-лимфоцитах), антитело к CD33 (экспрессируется на моноцитах, миелоидных клетках-предшественниках и клетках миелоидной лейкемии), D25 (против BCP; описано в WO 2008/147196), AT10-002, AT10-004 (против вируса гриппа; описаны в WO 2013/081463) и F1 (против MRSA; описано в WO 2011/008092). Кроме того, использовали некоторые доступные для приобретения антитела, такие как ритуксимаб (против CD20), паливизумаб (против BCP), панитумумаб (против EGFR) и HLA-DR. Выбирали микрокультуры, которые связывались с линиями клеток ОМЛ, но не с линиями клеток печени и толстого кишечника, и высевали их при концентрации 1 клетка/лунку, и их супернатанты снова исследовали на специфичность к линиям клеток ОМЛ. Клоны с супернатантами, специфично связывающимися линии клеток ОМЛ, но не линии клеток печени или толстого кишечника, или здоровые клетки МКПК и клетки костного мозга, выбирали для секвенирования. Клоны растили при стандартных условиях культивирования в присутствии эмбриональной бычьей сыворотки с низким содержанием иммуноглобулинов (FBS Low IgG, Hy-

Clone) и антител, очищенных из супернатантов данных культур, как описано ниже для рекомбинантных антител.

Клонирование ОМЛ-специфических антител.

Для получения рекомбинантных антител мы выделили общую РНК с помощью набора RNeasy® mini (Qiagen), получили кДНК, провели ПЦР и клонировали переменные области тяжелой и легкой цепей в клонирующий вектор pCR2.1 TA (Invitrogen). Для того чтобы исключить мутации, введенные обратной транскриптазой или ДНК-полимеразой, мы провели несколько независимых экспериментов по клонированию. Для получения рекомбинантных МАТ мы клонировали переменные области тяжелой и легкой цепей из каждого антитела в одной рамке считывания с IgG1 или IgG3 человека и константные области каппа в вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen) и осуществили временную трансфекцию клеток 293T. Мы очистили рекомбинантные антитела из культурального супернатанта с помощью белка А или G, в зависимости от подтипа Ig каждого клона.

Активность *in vitro* ОМЛ-специфических антител.

Для того чтобы измерить влияние *in vitro* ОМЛ-специфических антител на клетки ОМЛ мы использовали несколько подходов. Сначала клетки ТНР-1 (2×10^4) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Costar). Антитела к ОМЛ или контрольные антитела добавляли в день 1 при концентрации 5-10 мкг/мл. Количество клеток на лунку считали ежедневно. Индукцию ОМЛ-специфическими антителами гибели как клеток ТНР-1, так и первичных лейкоэмических клеток измеряли параллельно путем одновременного окрашивания в аликвоте клеток аннексина V (BD Pharmingen) и 7-аминоактиномицина D (7-AAD; Beckman Coulter), дважды отрицательные клетки представляли собой жизнеспособные клетки. Кроме того, мы использовали анализ специфического лизиса. Целевые клетки (ТНР-1) метили кальцеином-АМ (Becton Dickinson) - зеленым флуоресцентным красителем, который высвобождался из цитоплазмы, когда клетки погибали. Вкратце, 2 миллиона клеток ТНР-1 инкубировали с 2 мл 2 мкМ кальцеина-АМ в течение 30 мин при 37°C. Антитела к ОМЛ или контрольные антитела добавляли на 4 ч, после чего измеряли зеленую флуоресценцию, применяя флуоресцентный спектрофотометр для прочтения планшетов. Долю специфического лизиса рассчитывали как (экспериментальное значение – низкий контроль)/(высокий контроль - низкий контроль)×100, где низкий контроль означает самопроизвольное высвобождение кальцеина-АМ из незатронутых клеток и высокий контроль означает максимальное количество высвобожденного кальцеина-АМ, когда все клетки лизированы. Дополнительно к анализу высвобождения кальцеина-АМ мы применяли анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) для измерения активности ОМЛ-специфических антител в отношении уничтожения целевых клеток. ЛДГ высвобождается поврежденными клетками, из их цитозоля. Лейкемические бластные клетки, выделенные при постановке диагноза из пациента с ОМЛ-М0, инкубировали с АТ13-024 при максимальной концентрации, равной 10 мкг/мл на 10000 бластных клеток. Высвобождение ЛДГ измеряли после добавления Реакционной смеси и Останавливающего раствора (Roche Diagnostics/Applied Science), следуя протоколу производителя, на спектрофотометре для прочтения планшетов ELISA. Процент цитотоксичности рассчитывали как:

(экспериментальное значение - низкий контроль)/(высокий контроль - низкий контроль)×100,

где низкий контроль означает самопроизвольное высвобождение ЛДГ из незатронутых клеток и высокий контроль означает максимальное количество высвобожденного ЛДГ, когда все клетки лизированы.

Для того чтобы количественно оценить гибель целевых клеток, вызванную ОМЛ-специфическими антителами, мы использовали анализ лизиса лейкоэмических клеток на основе FACS, описанный ранее (Schmiedel и др., 2013). Вкратце, калибровочные гранулы FACS (Accudrop Fluorescent Beads, BD Biosciences) добавляли к клеткам в соотношении 50/50, после чего стандартное количество гранул захватывали с помощью FACS. Так как калибровочные гранулы гарантировали равные анализируемые объемы, количество мертвых или исчезнувших клеток затем можно было рассчитать, как описано далее:

$100 - ((\text{Dapi-отрицательные клетки при соответствующем лечении} / \text{Dapi-отрицательные клетки в контроле}) \times 100)$.

Наконец, чтобы различить апоптический и неапоптический пути гибели клеток, вызванной нашими антителами, мы осуществляли совместное окрашивание целевых клеток йодидом 3,3-дигексилосакарбоцианина (DiOC6) и йодидом пропидия (PI). DiOC6 представляет собой проникающий в клетку зеленый флуоресцентный липофильный краситель, который избирательно проникает в митохондрии живых клеток, когда его используют в низких концентрациях. Апоптические клетки утратят трансмембранный потенциал митохондрий (утрата окрашивания DiOC6) до того, как клеточная мембрана станет проницаемой (PI-положительные клетки); некротические клетки станут PI-положительными до того, как они утратят трансмембранный потенциал митохондрий (и станут DiOC6-отрицательными). Способы, применяемые для окрашивания, были основаны на описанных в Hugh J. M и др., 2004. Вкратце, клетки ТНР-1 окрашивали с помощью 40 нМ DiOC6 (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Добавляли PI, после чего образцы незамедлительно анализировали с помощью проточной цитометрии.

Проточная цитометрия.

Окрашенные клетки анализировали на проточных цитометрах FACS Aria (BD), FACSCanto (BD), FACS LSRFortessa X-20 (BD) и Guava (Millipore), и результаты проточной цитометрии обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star).

Фазово-контрастная визуализация.

Клетки ТНР-1 добавляли в двухкамерную систему с покровными стеклами (LabTek). Применяя микроскоп для фазово-контрастной визуализации (собственного производства), выбрали по четыре интересующих поля в каждой камере. Программное обеспечение установили на режим съемки каждого интересующего поля через минуту. Непосредственно перед запуском добавляли связывающее ТНР-1 нецитотоксическое антитело AT13-023 и связывающее ТНР-1 цитотоксическое антитело AT13-037 в соответствующие лунки при концентрации 10 мкг/мл.

Проверка мишени: иммунопреципитация и проточная цитометрия.

Клетки ТНР-1 лизировали и предварительно очищали с помощью постороннего антитела (полученного внутри лаборатории антитела к BCP - D25) и гранул, чтобы удалить неспецифически связанные белки. Предварительно очищенный лизат затем инкубировали с мечеными с помощью гранул ОМЛ-специфическими антителами или с антителом, специфичным к вирусу гриппа, AT10-002, в качестве отрицательного контроля (3 ч при 4°C). Инкубированные с антителом лизаты промывали пять раз, связанные белки элюировали из лизата ТНР-1, а затем разделяли путем электрофореза (ЭФ) в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ/ДСН). Белки подвергали блоттингу и окрашивали с помощью красителя Пунцовый S, чтобы обнаружить общий белок. Блот блокировали в БСА и инкубировали с антителами мыши к snRNP200 (Millipore, клон 3B6.1) или с антителами кролика к HMGB1 (Abcam) для анализа методом вестерн-блот. Внутриклеточное окрашивание snRNP200 осуществляли после фиксации и пермеабиллизации клеток ТНР-1 с помощью метанола (Sigma) и пермеабилзирующего буфера, содержащего Тритон X-100 (Sigma), ЭДТА (Gibco) и БСА (Roche), с последующей инкубацией с антителом кролика против snRNP200 человека (Sigma) в течение ночи при 4°C.

Подтверждение мишени: snRNP200 ELISA.

Клетки HEK 293T трансфицировали вектором экспрессии, содержащим полноразмерную открытую рамку считывания snRNP200 с N-концевой меткой FLAG. Через 2 дня после трансфекции клетки собирали и лизировали в лизирующем буфере, содержащем ингибиторы протеаз. Лизат очищали и измеряли концентрацию белка. ОМЛ-специфическими антителами AT12-019, AT12-023, AT13-031 и AT13-037 или доступными для приобретения snRNP200-специфическими антителами (Bethyl labs) затем покрывали планшет ELISA. Лизат добавляли при концентрации 3 мкг/мл для захвата. После обильной промывки захваченный snRNP200-flag обнаруживали с помощью моноклонального антитела мыши к flag, меченого пероксидазой хрена (HRP) (Sigma-Aldrich, клон M2).

Результаты.

Получение ОМЛ-специфических антител.

В нашем проекте мы применяем уникальную методику, которая была недавно разработана в нашей лаборатории (WO 2007/067046; включена в данную заявку посредством ссылки), которая позволяет осуществить селекцию встречающихся в природе специфичных к лейкомии В-клеток и антител, продуцируемых данными клетками. Мы использовали данную методику для получения линий специфичных к лейкомии В-клеток из двух пациентов с ОМЛ, у которых развились эффективные ответы ТПЛ параллельно с тяжелой РТПХ в печени и коже. С помощью нашей методики иммортализации В-клеток стало возможным определение ответов В-клеток из пациентов с лейкомией и создание специфичных к лейкомии линий В-клеток, которые позволяют проводить функциональные исследования продуцируемых данными линиями клеток антител и позволяют получить большие количества антител по сравнению с другими способами, известными в данной области, с диагностическим и терапевтическим потенциалом.

Сначала мы применили нашу методику, описанную в WO 2007/067046, для проведения ряда пробных экспериментов, в рамках которых мы выделили и иммортализовали В-лимфоциты из тщательно выбранной пациентки (донора 59), у которой развился эффективный ответ ТПЛ после обширной РТПХ в печени и коже. У данной пациентки была диагностирована ОМЛ в возрасте 36 лет. У нее наблюдалась полная ремиссия после первого из двух курсов индукционной химиотерапии, после которого она получила миелоаблативную ТСК от HLA-совместимого родственного донора в качестве консолидирующей терапии. Лишь через 5 месяцев после ТСК, вскоре после плавной отмены иммуносупрессивной терапии, у нее произошел рецидив ОМЛ. С помощью одного цикла высокой дозы цитарабина вновь добились у нее полной ремиссии, после которой у нее спонтанно, до запланированной инфузии донорских лимфоцитов, развилась степень III РТПХ в печени и степень II РТПХ в коже. Ее успешно лечили высокими дозами кортикостероидов, но во время постепенной отмены терапии произошло два рецидива печеночной РТПХ. В конце концов, терапия кортикостероидами была успешно прекращена приблизительно за 6 месяцев до начала описанных экспериментов (через 1,5 года после рецидива ОМЛ), и на данный момент у нее продолжается полная ремиссия лейкомии в течение более трех лет (фиг. 2).

Из данной пациентки мы получили клоны В-клеток, применяя нашу методику иммортализации В-клеток. Вкратце, МКПК выделяли из периферической крови путем центрифугирования в градиенте фиколла, и В-лимфоциты отсортировывали с помощью FACS. Выделенные В-лимфоциты затем культиви-

ровали с добавлением IL21 и CD40L и трансдуцировали их BCL6 и BCL-xL, при этом эффективность трансдукции составляла приблизительно 70%. Применяя данную методику были получены уникальные клоны В-клеток, которые одновременно экспрессируют В-клеточный рецептор и секретируют моноклональные антитела. Иммутизированные CD27- непримированные В-клетки и CD27⁺ IgG⁺ В-клетки памяти высевали при концентрациях 20 или 40 клеток на лунку и растили с добавлением IL21 и CD40L. Супернатанты выращенных микрокультур В-клеток затем подвергали скринингу на наличие антител, связывающихся с линиями клеток лейкемии, печени и толстого кишечника, посредством FACS, применяя IgG человека, меченые PE, в качестве вторичного детектируемого антитела.

Так как у данной пациентки была диагностирована ОМЛ-M5 согласно Франко-американо-британской (ФАБ) классификации (Bennett и др., 1976), мы выбрали для данных скрининговых тестов линию клеток ТНР-1, которая морфологически и фенотипически примерно аналогична ОМЛ-M5 (Tsuchiya и др., 1988). Кроме того, так как данная пациентка страдала от обширной РТПХ в печени, мы провели скрининг для идентификации связывающихся с печенью клонов В-клеток, применяя линию клеток печени НерG2. В качестве отрицательного контроля, и для того, чтобы исключить перекрестно-связывающиеся клоны В-клеток, мы использовали линии клеток толстого кишечника HT-29 и LSTR. Микрокультуры с наибольшим связыванием с любой из данных линий клеток затем сортировали, и отдельные клетки помещали в 96-луночные форматы, растили, и супернатанты данных выращенных клонов снова подвергали скринингу для выявления связывания с линиями клеток лейкемии (фиг. 3).

Свойства ОМЛ-специфических антител.

Применяя данный подход мы получили из данной одной пациентки восемь линий В-клеток, продуцирующих антитела, которые связываются с ТНР-1 (фиг. 3), но не с линиями клеток печени или толстого кишечника, фибробластами, эндотелиальными клетками (эндотелиальными клетками пупочной вены человека, или HUVEC), здоровыми МКПК или клетками костного мозга (табл. 2 и фиг. 4). Данные антитела представляли собой AT12-019, AT12-023, AT12-025, AT13-022, AT13-023, AT13-024, AT13-031 и AT12-020.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей данных антител представлены в табл. 1 и на фиг. 1.

Интересно отметить, что указанные антитела принадлежат к изотипам IgG1 и IgG3, и в некоторых из последовательностей их ДНК выявили соматические гипермутации. Антитела AT12-023, AT12-025, AT13-023 и AT13-031 принадлежат к семейству VH4-34, которое представляет собой семейство последовательностей VH, известных своей потенциальной способностью убивать клетки (Bhat и др., 1997). Данные антитела происходят от донора, что подтвердили с помощью анализов микрохимеризма.

Затем мы определили широту связывания в рамках спектра подтипов ОМЛ, и протестировали связывание полученных ОМЛ-специфических клонов В-клеток с другими типами ОМЛ по ФАБ-классификации. Выбранные специфичные к лейкемии клоны также связывались с линией клеток ОМЛ-M5 MonoMac6 (табл. 3) (см. обзор линий клеток ОМЛ в Drexler и Minowada, 1998).

Наши ОМЛ-специфические антитела также связывались со свежeweделенными из впервые диагностированных пациентов бластными клетками ОМЛ (табл. 3 и фиг. 5).

Более того, некоторые антитела также связывались с линиями клеток других гематопоэтических злокачественных новообразований, такими как линии клеток диффузной В-крупноклеточной лимфомы (OCI-Ly1 и OCI-Ly7) и линии клеток множественной миеломы (U266 и NCI-H929), и/или с полученными из пациента гематологическими опухолевыми клетками (табл. 4 и фиг. 6).

Активность *in vitro* ОМЛ-специфических антител.

Тестируя специфичность ОМЛ-связывающих антител, мы сделали поразительное наблюдение. Три из восьми антител спонтанно вызывали гибель лейкемических клеток, с которыми они связывались. Клетки ТНР-1 уничтожались антителами AT12-023 и AT12-025, а первичные бластные клетки ОМЛ, выделенные из пациентов, у которых была диагностирована ОМЛ, уничтожались антителами AT12-025 и AT12-024 (табл. 5 и фиг. 7-10).

На фиг. 7 показано быстрое уничтожение клеток ТНР-1 антителом AT12-023. Умирающие бластные клетки экспрессируют 7-AAD и аннексин V. Удивительно, что хотя совместное культивирование ТНР-1 с AT12-025 сначала не влияло на суммарные количества клеток в культурах (фиг. 7), данное антитело, похоже, также вызывало гибель клеток ТНР-1, хотя и с небольшой задержкой по сравнению с AT12-023 (фиг. 8). Наблюдение, состоящее в том, что некоторые из указанных антител напрямую убивают лейкемические клетки, весьма впечатляет и, насколько нам известно, об этом не сообщалось ранее.

Подтверждение наших открытий путем получения линий ОМЛ-специфических В-клеток из второго пациента.

Приблизительно от 0,05 до 0,1% В-клеток из первого пациента, которые мы подвергли скринингу, оказались ОМЛ-специфическими. Для того чтобы подтвердить наши открытия, мы выбрали вторую пациентку с рецидивом ОМЛ, у которой добились длительной ремиссии после аллогенной ТСК (донор 58; фиг. 11). Также у данной пациентки развилась РТПХ в коже и печени, от которой ее лечили пероральным введением стероидов. После того, как было прекращено лечение стероидами, приблизительно через один год после ТСК, выделяли МКПК, В-клетки иммутизировали и линии В-клеток подвергали скринингу для обнаружения связывания с линиями клеток ОМЛ, как описано выше. Из данной пациентки получили

пять клонов В-клеток, которые связываются с линиями клеток ОМЛ - ТНР-1 и МоноМас6 (фиг. 12), но не с линиями клеток печени или кишки, фибробластами или здоровыми МКПК (табл. 6). Данные клоны продуцируют антитела АТ13-033, АТ13-034, АТ13-035, АТ13-036 и АТ13-037. Интересно отметить, что все данные антитела принадлежат к изотипу IgG3. Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей данных антител также представлены в табл. 1 и на фиг. 1. Полученные результаты подтверждают достижимость нашего проекта; несмотря на низкую встречаемость В-клеток, на которые мы нацелились, мы смогли выделить их и получить надежные продуцирующие антитела линии В-клеток, которые были специфичны к ОМЛ.

Обсуждение.

Данные предварительные результаты весьма впечатляют, так как, насколько нам известно, мы первые получили несколько человеческих нехимерных специфичных к лейкемии клонов В-лимфоцитов из пациентов, у которых развился сильный продолжительный ответ ТПЛ против ОМЛ. Наблюдение, состоящее в том, что некоторые из данных антител спонтанно проявляют активность, способную убивать лейкемические бластные клетки *in vitro*, весьма впечатляет и очень перспективно. Кроме того, наблюдение, состоящее в том, что у некоторых из указанных антител зародышевая последовательность, и что они принадлежат к подклассу IgG3, к типу антител, который может индуцироваться без помощи Т-клеток, заслуживает дополнительного внимания, так как данные открытия демонстрируют, что 'природные' антитела, полученные независимым от Т-клеток способом, влияют на ответы ТПЛ у пациентов, которым провели ТСК. Важно отметить, что полученные результаты представляют доказательства концепции того, что применяя данную методику мы можем выбирать специфичные к лейкемии клоны В-клеток.

Пример 2.

ОМЛ-специфические антитела из третьего пациента.

Для того чтобы дополнительно подтвердить наш подход и показать, что данный направленный против ОМЛ ответ возникает не только у пациентов-женщин, мы также выбрали пациента-мужчину. У данного пациента (фиг. 13), донора 101, была диагностирована ОМЛ промежуточного риска (без цитогенетических или молекулярных отклонений от нормы; ФАБ-классификация ОМЛ-М5) в возрасте 49 лет. Он получил два курса химиотерапии (цитарабин, идарубицин, амсакрин) и один курс консолидирующей химиотерапии (бусульфид, циклофосфамид), а затем аутологичную ТГСК, так как у него не было доступного НЛА-совместимого родственного донора стволовых клеток. Через четырнадцать месяцев после первой диагностики произошел рецидив его заболевания. Полной ремиссии у него добились после одного цикла химиотерапии цитарабином в высокой дозе, после которой он получил аллогенную ТГСК в условиях пониженной интенсивности от совместимого неродственного донора (ТСКПИ-СНД). Через шесть недель у него развилась острая РТПХ в коже, печени и кишечнике (стадия I; степень II), которая хорошо отвечала на терапию кортикостероидами. В-клетки выделяли из продукта флеботомии, полученного из данного пациента через 38 месяцев после ТСК.

Применяя такие же способы, как описанные в примере 1, из данного пациента получили четыре клон В-клеток, которые связываются с линиями клеток ОМЛ - ТНР-1 и/или Molm13 (фиг. 14 и табл. 7), но не с линиями (эмбриональных) клеток печени или кишки, фибробластами или здоровыми МКПК (табл. 8). Данные клоны продуцируют антитела АТ14-013 (IgG1), АТ14-014 (IgG3), АТ14-015 (IgG3) и АТ14-016 (IgG3). Интересно отметить, что, снова, большинство антител принадлежало к изотипу IgG3. В последовательностях вариабельных областей тяжелой и легкой цепей данных антител выявили большие количества соматических гипермутаций, и они представлены в табл. 1В и на фиг. 1. Клон АТ14-013 проявил лишь незначительную реакционную способность в отношении линии клеток печеночно-клеточной карциномы Huh7, но не в отношении линии клеток печеночно-клеточной карциномы HepG2 или здоровых зародышевых клеток печени. Также наблюдали незначительную реакционную способность в отношении фибробластов, тем не менее, связывание данного антитела с данными тканеспецифичными клетками, по сравнению со связыванием с первичными лейкемическими бластными клетками, было пренебрежимо мало (фиг. 14).

Также исследовали, могут ли четыре антитела из донора 101 связываться с первичными бластными клетками ОМЛ (материалы и методы: см. пример 1). На фиг. 15 и в табл. 7 показано, что антитело АТ14-013, похоже, связывается с первичными бластными клетками, принадлежащими к по меньшей мере трем различным типам по ФАБ-классификации (ОМЛ-М0, М4 и М5). Антитела АТ14-015 и АТ14-016 способны связываться с первичными бластными клетками ОМЛ типа М4 по ФАБ-классификации.

Пример 3.

Активность *in vitro* ОМЛ-специфических антител из доноров 59, 58 и 101.

В примере 1 определили широту связывания указанных антител из донора 59 в рамках спектра подтипов ОМЛ (табл. 3). Применяя такие же способы, широту связывания также определили и для антител из донора 58. Результаты представлены в табл. 9А: все пять антител из донора 58 (АТ13-033, АТ13-034, АТ13-035, АТ13-036 и АТ13-037) связывались с линией клеток ОМЛ-М5-ТНР-1, а также с линией клеток ОМЛ-М5-МоноМас6. Данные ОМЛ-специфические антитела не проявляли значительного связывания со свежeweделенными бластными клетками ОМЛ из пациентов с впервые диагностированной ОМЛ М0, М1 или М4 по ФАБ-классификации. АТ13-034 было способно лишь слабо связываться с бластными клетка-

ми М0. Это свидетельствует о том, что данные антитела специфичны (по меньшей мере) к бластным клеткам ОМЛ М5.

В примере 1 также определили, что антитела АТ12-023 и АТ12-025 из донора 59 убивали клетки ТНР-1 (табл. 5 и фиг. 7-9). Впоследствии мы исследовали, могут ли другие антитела из донора 59, а также антитела из донора 58, также убивать клетки ТНР-1, применяя такие же материалы и методы, как и в примере 1. В табл. 9В - 10 показано, что дополнительно к АТ12-023 и АТ12-025, также антитело АТ13-031 (донор 59), как и антитела АТ13-033, АТ13-035, АТ13-036 и АТ13-037 (донор 58), похоже, способны убивать клетки ТНР-1.

Также исследовали способность вызывать гибель первичных бластных клеток ОМЛ (материалы и методы: см. пример 1). Аналогично некоторым из указанных антител, полученных из донора 59, некоторые из указанных антител, полученных из донора 58, также были способны вызывать гибель первичных клеток ОМЛ. Это показано на фиг. 16 для антитела АТ13-037 в обеих формах (очищенный супернатант В-клеток (sAT13-037) и полученное рекомбинантным способом антитело (rAT13-037); оба в конформации IgG3). Указанные лейкоэмические клетки получали из костного мозга пациента с впервые диагностированной ОМЛ, ФАБ-классификация ОМЛ-М5.

Пример 4.

Активность *in vitro* антител против ОМЛ проявляется быстро и вовлекает неапоптический путь гибели клеток.

Для того чтобы исследовать путь, посредством которого некоторые из приведенных выше антител вызывали гибель целевых клеток, мы визуализировали гибель целевых клеток путем микроскопии в режиме замедленной съемки (фиг. 17а). Мы наблюдали, что в течение нескольких минут после инкубации с антителом АТ13-037, клетки начинали разбухать, а затем погибали. Это позволило предположить, что антитела согласно настоящему изобретению активировали пути, отличные от классических путей апоптоза, так как апоптотические клетки сжимаются, а не разбухают. Для того чтобы дополнительно исследовать это, мы осуществили двойное окрашивание маркерами гибели клеток DiOC6 и йодидом пропидия (PI). Клетки, в которых индуцирован путь апоптоза, сначала утрачивают митохондриальный заряд (что можно визуализировать по утрате связывания DiOC6) до того, как повышается проницаемость мембраны клетки (визуализируют путем окрашивания йодидом пропидия (PI)), тогда как клетки, подвергнутые некрозу, утрачивают целостность мембраны (становятся PI-положительными), но не сразу утрачивают трансмембранный потенциал митохондрий. Так как известно, что диклофенак вызывает апоптоз клеток ТНР-1, мы использовали диклофенак в качестве положительного контроля. Обработанные диклофенаком апоптотические клетки ТНР-1 становились DiOC6-отрицательными (утрачивали трансмембранный потенциал митохондрий), но сохраняли целостность мембраны клетки. При инкубации с ОМЛ-специфическим цитотоксическим антителом АТ12-023 трансмембранный потенциал митохондрий сохранялся (DiOC6-положительные клетки), при этом проницаемость мембран клеток ТНР-1 повышалась (PI-положительные клетки). Таким образом, клетки ТНР-1, обработанные ОМЛ-специфическим антителом, становились PI-положительными, при этом сохраняя трансмембранный потенциал митохондрий (фиг. 17b, справа), что указывало на активацию неапоптотического пути гибели. В действительности, гибель клеток ТНР-1 при обработке цитотоксическим ОМЛ-специфическим антителом невозможно было предотвратить путем инкубации клеток с неспецифическими ингибиторами каспаз Z-VAD-fmk или QVD-OPh (фиг. 17c).

Гибель клеток опосредовалась нарушением мембраны целевой клетки.

Неапоптотические пути гибели включают некроптоз и онкоз. Некроптоз аналогичен апоптозу, это активный путь гибели клеток, который зависит от активации определенных молекулярных путей, включая активацию взаимодействующей с рецептором протеинкиназы 3 (RIPK3). Для того чтобы исследовать, зависела ли вызванная ОМЛ-специфическим антителом гибель клеток от активации внутриклеточных молекулярных путей, мы проверили, зависела ли вызванная антителом цитотоксичность от температуры. Мы обнаружили, что при данных условиях эксперимента цитотоксические активности по меньшей мере антител АТ13-033, АТ13-035, АТ13-036, АТ13-037, АТ12-023 и АТ12-025 были одинаково эффективны при 4°C при сравнении с их активностями при 37°C (фиг. 18), позволяя предложить, что по меньшей мере данные антитела вызывали гибель клеток посредством пассивного процесса. Следует отметить, что цитотоксическая активность антитела АТ13-031 была значительно более эффективной при 37°C по сравнению с таковой при 4°C. Тем не менее, поскольку антитело АТ13-031 вызывает гибель клеток ОМЛ в присутствии ингибиторов апоптоза (таких как неспецифические ингибиторы каспаз Q-VD-OPh или Z-VAD-fmk), было ясно, что антитело АТ13-031 также способно уменьшать пролиферацию клеток ОМЛ независимо от апоптоза.

Онкоз представляет собой способ гибели клеток, который характеризуется набуханием клеток, посредством селективного повреждения мембраны, приводящего к повышенной проницаемости мембраны и, в конечном итоге, к гибели клеток. Были описаны вызывающие онкоз антитела, которые опосредуют гибель клеток путем образования больших пор в мембране посредством дестабилизации мембраны (Hernandez и др., 2011). Цитохалазин D представляет собой ингибитор полимеризации актина, который может стабилизировать цитоскелет. Обработка целевой линии клеток ТНР-1 цитохалазином D не предотвращала связывание антитела с данными клетками (фиг. 19а), тем не менее, она предотвращала гибель

целевых клеток (фиг. 19b). Таким образом, стабилизация мембраны защищает целевые клетки от цитотоксической активности наших антител.

Пример 5.

Одна из мишеней, которые узнаются нашими антителами, представляет собой snRNP200.

Затем мы решили определить мишень, которая узнается некоторыми ОМЛ-специфическими антителами. Для этого мы использовали иммунопреципитацию лизатов мембран клеток ТНР-1 с антителами AT12-023 и AT13-031. Мы обнаружили явную полосу белка на уровне 250 кДа, которую отправили на анализ методом масс-спектрометрии, который показал, что целевым антигеном является snRNP200, и это можно было подтвердить с помощью анализа методом вестерн-блот (фиг. 20a). Мы разработали анализ ELISA, чтобы убедиться, что snRNP200 является мишенью некоторых из указанных антител против ОМЛ. С помощью данного анализа ELISA мы обнаружили, что, дополнительно к AT12-023 и AT13-031, AT13-037 специфично узнавало snRNP200 (фиг. 20b). Другие ОМЛ-специфические антитела, такие как AT12-019, не узнавали snRNP200 как целевой антиген.

snRNP200 является частью сплайсосомы во всех эукариотических клетках и, следовательно, ожидается, что он должен быть расположен в ядре. Для того чтобы подтвердить, что клетки ОМЛ экспрессируют данный белок на своей поверхности, мы окрашивали мембраны клеток ТНР-1 доступным для приобретения антителом к snRNP200. На фигуре 21 показано, что данное антитело к snRNP200 в действительности связывается с мембраной клеток ОМЛ, но не с линией клеток Jurkat. Как и ожидали, так как snRNP200 представляет собой ядерный белок, то оно не связывалось с внутриклеточным содержимым линий клеток Jurkat и ТНР-1 (фиг. 21).

Все эукариотические клетки содержат белок snRNP200 (также известный как U5-snRNP) в ядре, который является частью сплайсосомы (Kattah, 2010). Сплайсосома состоит из множества белков. Было описано, что по меньшей мере один из данных белков, U1-snRNP, экспрессировался на апоптотических клетках у пациентов с системной красной волчанкой (SLE) и смешанным заболеванием соединительной ткани (СЗСТ), приводя к аутоиммунным реакциям (Kattah, 2010).

Мы предполагаем, что экспрессия snRNP200 клетками ОМЛ запустила аллоиммунный ответ (ответ трансплантата против лейкемии), который поддерживал длительную ремиссию у пациентов. Следовательно, данный белок теперь можно применять в качестве новой мишени для лечения ОМЛ. Более того, поскольку антитела AT12-023 и AT13-031 специфично узнают snRNP200, а также узнают клетки В-НХЛ, snRNP200 теперь также можно применять в качестве мишени для лечения В-НХЛ.

Таблица 1А

Предпочтительные направленные против ОМЛ антитела согласно настоящему изобретению
(нумерация CDR согласно Kabat и др. 1991)

SEQ ID NO.	Антитело	Название	Последовательность
1	AT12-023	CDR1 тяжелой цепи	GYYSWS
2	AT12-025	CDR1 тяжелой цепи	GYYSWS
3	AT13-024	CDR1 тяжелой цепи	SYGMH
4	AT12-019	CDR1 тяжелой цепи	SYAMS
5	AT13-022	CDR1 тяжелой цепи	SYGMH
6	AT13-023	CDR1 тяжелой цепи	GYFWT
7	AT13-031	CDR1 тяжелой цепи	GYYSWS
8	AT12-020	CDR1 тяжелой цепи	TYSMN

9	AT13-033	CDR1 тяжелой цепи	NYGMH
10	AT13-034	CDR1 тяжелой цепи	SHAIH
11	AT13-035	CDR1 тяжелой цепи	SYGMH
12	AT13-036	CDR1 тяжелой цепи	SYSMN
13	AT13-037	CDR1 тяжелой цепи	TYGMH
14	AT12-023	CDR2 тяжелой цепи	EINHSGSTNYPNPSLKS
15	AT12-025	CDR2 тяжелой цепи	EINHSGSTNYPNPSLKS
16	AT13-024	CDR2 тяжелой цепи	FIRYDGSNKYFADSVRG
17	AT12-019	CDR2 тяжелой цепи	TIRASGGSTSYADSVKG
18	AT13-022	CDR2 тяжелой цепи	ISYDGSNKYYADSVKG
19	AT13-023	CDR2 тяжелой цепи	ETVHSGGTNYPNPSLKS
20	AT13-031	CDR2 тяжелой цепи	EINHSGSTNYPNPSLKS
21	AT12-020	CDR2 тяжелой цепи	SISSSGYIYYADSVKG
22	AT13-033	CDR2 тяжелой цепи	VISHDGSKTYYGHSVKG
23	AT13-034	CDR2 тяжелой цепи	LIWYDGSNNYYADSVKG
24	AT13-035	CDR2 тяжелой цепи	VISYDGSNKYYADSVKG
25	AT13-036	CDR2 тяжелой цепи	SISSSSTYIYYADSVKG
26	AT13-037	CDR2 тяжелой цепи	VIWYDGSNTYYADSVKG
27	AT12-023	CDR3 тяжелой цепи	GRSTSPLDYYYYYMDV
28	AT12-025	CDR3 тяжелой цепи	GSMARPKPFDY
29	AT13-024	CDR3 тяжелой цепи	DPQERIYYSDTSGYLDY
30	AT12-019	CDR3 тяжелой цепи	SPAMIRGVRGGDYFDY

31	AT13-022	CDR3 тяжелой цепи	DGKGIVVIYYYYGMDV
32	AT13-023	CDR3 тяжелой цепи	GLNSPFDY
33	AT13-031	CDR3 тяжелой цепи	GPRGMYSSSSGDY
34	AT12-020	CDR3 тяжелой цепи	DGTFSYYYMDV
35	AT13-033	CDR3 тяжелой цепи	AGLNYYGNLLSNFYFYGMDV
36	AT13-034	CDR3 тяжелой цепи	ARDGCTGGSCCYFDN
37	AT13-035	CDR3 тяжелой цепи	AKDSYYYGSGRRWGYFYDY
38	AT13-036	CDR3 тяжелой цепи	ARRREVGRDGYSLYPRGYHYGMDV
39	AT13-037	CDR3 тяжелой цепи	ARGRGYSAQGNRNRAYFYDY
40	AT12-023	CDR1 легкой цепи	QGDFLRSYYAS
41	AT12-025	CDR1 легкой цепи	RASQSISRVLN
42	AT13-024	CDR1 легкой цепи	RASQSISSWLA
43	AT12-019	CDR1 легкой цепи	RASQAFSSYL
44	AT13-022	CDR1 легкой цепи	SGDKLGDKYAC
45	AT13-023	CDR1 легкой цепи	RASQGIRNVLG
46	AT13-031	CDR1 легкой цепи	RASQGIRNDLG
47	AT12-020	CDR1 легкой цепи	RASQDISSSLA
48	AT13-033	CDR1 легкой цепи	TGTSSDIGGYNYVS
49	AT13-034	CDR1 легкой цепи	RASQSISSNLG
50	AT13-035	CDR1 легкой цепи	QGDSLRSYYAS
51	AT13-036	CDR1 легкой цепи	TGTSSDVGGYNYVS
52	AT13-037	CDR1 легкой цепи	RASQSVSSNLA

53	AT12-023	CDR2 легкой цепи	GKNKRPS
54	AT12-025	CDR2 легкой цепи	AASSLQS
55	AT13-024	CDR2 легкой цепи	KASSLES
56	AT12-019	CDR2 легкой цепи	ATSTLQG
57	AT13-022	CDR2 легкой цепи	QDSKRPS
58	AT13-023	CDR2 легкой цепи	AASSLQS
59	AT13-031	CDR2 легкой цепи	AAVSLQS
60	AT12-020	CDR2 легкой цепи	AASTLQS
61	AT13-033	CDR2 легкой цепи	EVTKRPS
62	AT13-034	CDR2 легкой цепи	GASTRAT
63	AT13-035	CDR2 легкой цепи	GKNNRPS
64	AT13-036	CDR2 легкой цепи	DVNDRPS
65	AT13-037	CDR2 легкой цепи	GAFTRVT
66	AT12-023	CDR3 легкой цепи	NSRDRSGNHLV
67	AT12-025	CDR3 легкой цепи	QQSYSTPRT
68	AT13-024	CDR3 легкой цепи	QQYNTYPYT
69	AT12-019	CDR3 легкой цепи	QQYYSYPPT
70	AT13-022	CDR3 легкой цепи	QAWDSSTVVF
71	AT13-023	CDR3 легкой цепи	LQHNSHPRT
72	AT13-031	CDR3 легкой цепи	LQHNSYPRT
73	AT12-020	CDR3 легкой цепи	QQYYSYPPT
74	AT13-033	CDR3 легкой цепи	SSYAGSNDLL

75	AT13-034	CDR3 легкой цепи	QQYNNWPRLT
76	AT13-035	CDR3 легкой цепи	NSRDSSGNHVV
77	AT13-036	CDR3 легкой цепи	SSYTRSNVTI
78	AT13-037	CDR3 легкой цепи	QQYNDRPPYT
79	AT12-023	Тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRSTSPLDYYYYYMDVWAKGTTVTVSS
80	AT12-025	Тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSMARPKPFDYWGQGLTVTVSS
81	AT13-024	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYFADSVRGRFTISRDN KNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPQERIYYSDTSGYLDYWGQGLTVTVSS
82	AT12-019	Тяжелая цепь	EVHLLSGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIRASGGSTSYADSVKGRFTISRDN RLYLQMNSLTAEDTAVYYCAKSPAMIRGVRGGDYFDYWGQGLTVTVSS
83	AT13-022	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGKIVVIYYYYGMDVWGQGLTVTVSS
84	AT13-023	Тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYFWTWIRQPPGKGLEWIGETVHSGGTNYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSLRLNSVTAADTAVYYCVRGLNSPFDYWGQGLTVTVSS
85	AT13-031	Тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKK QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPRGMYSSSSGDYWGQGLTVTVSS
86	AT12-020	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSGYIYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGTFSYIYYMDVWGKTTVTVSS
87	AT13-033	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAVSGLSFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISHDGSKTYIGHSVKGRFTISRDKS KTMLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKAGLNYYGNLLSNFYFGMDVWGQGLTVTVSS
88	AT13-034	Тяжелая цепь	QVHLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASEFTFSSHAIHWVRQAPGKGLEWVALIWDGSNNYYADSVKGRFTISRDSK NTVHLQMNSLRVEDTAVYYCARDGCTGGSCCYFDNWWGQGLTVTVSS
89	AT13-035	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSYYYGSGRRWGYFDYWGQGLTVTVSS
90	AT13-036	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSTYIYYADSVKGRFTISRDN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRREVGRDGYSLYPRGYHYGMDVWGQGLTVTVSS
91	AT13-037	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQIKSLRAEDTAVYYCARGRGYSAQGNRNRAYYFDYWGQGLTVTVSS
92	AT12-023	Легкая цепь	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGFRLRSYASWYQQKPGQAPVLFVFGKNGKRPSPGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQ AEDEADYYCNSRDRSGNHLVFGGGTKLTVL
93	AT12-025	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRDVTITCRASQISIRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQSYSTPRTFGPGTKVDIK
94	AT13-024	Легкая цепь	DIQMTQSPSTLSASVGRDVTITCRASQISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSGTGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQYNTYPYTFGQGTKLEIK
95	AT12-019	Легкая цепь	AIRLTQSPSSVSASTGDRVTITCRASQAFSSYLWYQQKPGKAPNLLIYATSTLQGGVPSRFSGSGSGTDFLTISNLQ SEDFATYYCQYYSYPTFGQGTKLEIK
96	AT13-022	Легкая цепь	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCAWDSTVVFGGGKTLTVL
97	AT13-023	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRDVTITCRASQGIIRNLGWYQQKPGKAPKCLIIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PEDFATYYCLQHNSHPRTFGQGTKVEIK
98	AT13-031	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRDVTITCRASQGIIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASVLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ QPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKLEIK

99	AT12-020	Легкая цепь	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTTTCRASQDISSSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQS EDFATYYCQYYYSYPPTFGQGTRLEIK
100	AT13-033	Легкая цепь	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDIGGYNYSWYQHHPGKAPKLMIEVTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDEAHYYCSSYAGSNDLLFGGGTKLTVL
101	AT13-034	Легкая цепь	EVVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQISNNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPGRFSGSGSGTEFTLIYSL QSEDFAVYYCQYNNWPRLTFGGGTVKVEIK
102	AT13-035	Легкая цепь	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA QAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVL
103	AT13-036	Легкая цепь	QSALTQPAVSQSPRQSVTISCTGTSSDVGGYNYSWYQQKPGKAPKLMIDVNDRPSGVSRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTRNTVIFGGGTKLTVL
104	AT13-037	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERVILSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQPPRLLIYGAFTRVTVGPVRFSGSGSGTEFTLTISLQ SEDFAVYYCQYNDRPPYTFGGGTVKLEIK
105	AT12-023	CDR1 тяжелой цепи	ggt tac tac tgg agc
106	AT12-025	CDR1 тяжелой цепи	ggt tat tac tgg agc
107	AT13-024	CDR1 тяжелой цепи	agc tat ggc atg cac
108	AT12-019	CDR1 тяжелой цепи	agc tat gcc atg agt
109	AT13-022	CDR1 тяжелой цепи	agc tat ggc atg cac
110	AT13-023	CDR1 тяжелой цепи	ggt tac ttc tgg acc
111	AT13-031	CDR1 тяжелой цепи	ggt tac tac tgg agc
112	AT12-020	CDR1 тяжелой цепи	acc tat agc atg aac
113	AT13-033	CDR1 тяжелой цепи	aat tat ggc atg cac
114	AT13-034	CDR1 тяжелой цепи	tcc cat gcc ata cac
115	AT13-035	CDR1 тяжелой цепи	agc tat ggc atg cac
116	AT13-036	CDR1 тяжелой цепи	agt tat agc atg aac
117	AT13-037	CDR1 тяжелой цепи	acc tat ggc atg cac
118	AT12-023	CDR2 тяжелой цепи	gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt
119	AT12-025	CDR2 тяжелой цепи	gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt
120	AT13-024	CDR2 тяжелой цепи	ttt ata cgg tat gat gga agt aat aaa tac ttt gca gac tcc gtg agg ggc

121	AT12-019	CDR2 тяжелой цепи	act att agg gct agt ggt ggc agc aca agc tac gca gac tcc gtg aag ggc
122	AT13-022	CDR2 тяжелой цепи	ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc
123	AT13-023	CDR2 тяжелой цепи	gaa acc gtt cat agt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt
124	AT13-031	CDR2 тяжелой цепи	gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt
125	AT12-020	CDR2 тяжелой цепи	tcc att agt agt agt ggt tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc
126	AT13-033	CDR2 тяжелой цепи	gtc att tcg cat gat gga agt aag aca tac tat gga cac tcc gtg aag ggc
127	AT13-034	CDR2 тяжелой цепи	ctt ata tgg tat gat gga agt aat aat tat tat gca gac tcc gtg aag ggc
128	AT13-035	CDR2 тяжелой цепи	gtt ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc
129	AT13-036	CDR2 тяжелой цепи	tcc att agt agt agt act act tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc
130	AT13-037	CDR2 тяжелой цепи	gtt ata tgg tat gat gga agt aat aca tac tat gca gac tcc gtg aag ggc
131	AT12-023	CDR3 тяжелой цепи	ggc cgt agt acc agc ccg ctc gac tac tac tac tac atg gac gtc
132	AT12-025	CDR3 тяжелой цепи	ggc tca atg gca aga ccc aag cca ttt gac tac
133	AT13-024	CDR3 тяжелой цепи	gcg aaa gat ccc caa gag cgt att tat tac tct gat act agt ggt tac ctt gac tac
134	AT12-019	CDR3 тяжелой цепи	tct cct gct atg att cgg gga gtt agg ggg ggt gac tac ttt gac tac
135	AT13-022	CDR3 тяжелой цепи	gat ggg aag ggg att gta gtt att tac tac tac tac ggt atg gac gtc
136	AT13-023	CDR3 тяжелой цепи	ggc ctt aac agc ccc ttt gac tac
137	AT13-031	CDR3 тяжелой цепи	ccc cgg ggc atg tat agc agc tcg tcc ggg gac tac
138	AT12-020	CDR3 тяжелой цепи	gat ggg act ttc tcc tac tac tac tac atg gac gtc
139	AT13-033	CDR3 тяжелой цепи	gcc ggg ttg aac tac tat gga aac cta tta tca aac tac ttc tac tac gga atg gac gtc
140	AT13-034	CDR3 тяжелой цепи	gcg aga gat ggt tgt act ggt ggt agc tgc tgc tat ttt gac aac
141	AT13-035	CDR3 тяжелой цепи	gcg aaa gac tcg tat tac tat ggt tcg ggg aga cga tgg ggc tac tac ttt gac tac
142	AT13-036	CDR3 тяжелой цепи	gcg aga agg agg gag gtc ggt aga gat ggc tac agt ttg tac ccc cgg ggg tac cac tac ggt atg gac gtc

143	AT13-037	CDR3 тяжелой цепи	gcg aga ggc cgt gga tat agt gcc caa ggg aat cgg aat agg gct tac tac ttt gac tac
144	AT12-023	CDR1 легкой цепи	caa gga gac ttc ctc aga agc tat tat gca agc
145	AT12-025	CDR1 легкой цепи	cgg gca agt cag agc att age agg tat tta aat
146	AT13-024	CDR1 легкой цепи	cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc
147	AT12-019	CDR1 легкой цепи	cgg gcg agt cag gct ttt agc agt tat tta gtc
148	AT13-022	CDR1 легкой цепи	tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa tat gct tgc
149	AT13-023	CDR1 легкой цепи	cgg gca agt cag ggc att aga aat gtt tta ggc
150	AT13-031	CDR1 легкой цепи	cgg gca agt cag ggc att aga aat gat tta ggc
151	AT12-020	CDR1 легкой цепи	cgg gcg agt cag gat att agc agt tct tta gcc
152	AT13-033	CDR1 легкой цепи	act ggg acc agc agt gac att ggt ggt tat aac tat gtc tcc
153	AT13-034	CDR1 легкой цепи	agg gcc agt cag agc att agc aac aac tta ggc
154	AT13-035	CDR1 легкой цепи	caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc
155	AT13-036	CDR1 легкой цепи	act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc
156	AT13-037	CDR1 легкой цепи	agg gcc agt cag agt gtt agc agc aac tta gcc
157	AT12-023	CDR2 легкой цепи	ggt aaa aac aag cgg ccc tca
158	AT12-025	CDR2 легкой цепи	gct gca tcc agt ttg caa agt
159	AT13-024	CDR2 легкой цепи	aag gcg tct agt tta gaa agt
160	AT12-019	CDR2 легкой цепи	gct aca tcc act ttg caa ggt
161	AT13-022	CDR2 легкой цепи	caa gat agc aag cgg ccc tca
162	AT13-023	CDR2 легкой цепи	gct gca tcc agt ttg caa agt
163	AT13-031	CDR2 легкой цепи	gct gca gtc agt ttg caa agt
164	AT12-020	CDR2 легкой цепи	gct gca tcc act ttg caa agt

165	AT13-033	CDR2 легкой цепи	gag gtc act aag cgg ccc tca
166	AT13-034	CDR2 легкой цепи	ggt gca tcc acc agg gcc act
167	AT13-035	CDR2 легкой цепи	ggt aaa aac aac cgg ccc tca
168	AT13-036	CDR2 легкой цепи	gat gtc aat gat cgg ccc tca
169	AT13-037	CDR2 легкой цепи	ggt gca ttc acg agg gtc act
170	AT12-023	CDR3 легкой цепи	aac tcc cgg gac cgc agt ggt aac cac ctg gtg
171	AT12-025	CDR3 легкой цепи	caa cag agt tac agt acc cct cgc act
172	AT13-024	CDR3 легкой цепи	caa cag tat aat act tac ccg tac act
173	AT12-019	CDR3 легкой цепи	caa cag tat tat agt tac cct ccg act
174	AT13-022	CDR3 легкой цепи	cag gcg tgg gac agc agc act gtg gta ttc
175	AT13-023	CDR3 легкой цепи	cta cag cat aat agt cac ccc cgg acg
176	AT13-031	CDR3 легкой цепи	cta cag cat aat agt tac cct cgg act
177	AT12-020	CDR3 легкой цепи	caa cag tat tat agt tac cct ccg acg
178	AT13-033	CDR3 легкой цепи	agc tca tat gca ggc agc aac gat ttg cta
179	AT13-034	CDR3 легкой цепи	caa caa tat aat aac tgg cct cgg ctc act
180	AT13-035	CDR3 легкой цепи	aac tcc cgg gac agc agt ggt aac cat gtg gta
181	AT13-036	CDR3 легкой цепи	agc tca tat aca aga agc aac act gtg ata
182	AT13-037	CDR3 легкой цепи	cag cag tac aat gac cgg ccc ccg tac act
183	AT12-023	Тяжелая цепь	cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg agg ggc cgt agt acc agc ccg ctc gac tac tac tac tac atg gac gtc tgg gcc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
184	AT12-025	Тяжелая цепь	cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tat tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga ggc tca atg gca aga ccc aag cca ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
185	AT13-024	Тяжелая цепь	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtc gca ttt ata cgg tat gat gga agt aat aaa tac ttt gca gac tcc gtg agg ggc

			cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aaa gat ccc caa gag cgt att tat tac tct gat act agt ggt tac ctt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
186	AT12-019	Тяжелая цепь	gag gtg cac ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat gcc atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca act att agg gct agt ggt agc aca agc tac gca gac tcc gtc aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc cag agc agg ttg tat ctg caa atg aac agt ctg aca gcc gag gac acg gcc gta tat tac tgt gcg aaa tct cct gct atg att cgg gga gtt agg ggg ggt gac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
187	AT13-022	Тяжелая цепь	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aaa gat ggg aag ggg att gta gtt att tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
188	AT13-023	Тяжелая цепь	cag gta cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgc gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac ttc tgg acc tgg gtc cgc cag gcc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg gaa acc gtt att agt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gtc gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg agg ctg aac tct gtg acc gcc ggc gac acg gct gtg tat tac tgt gtg aga ggc ctt aac agc ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc cta gtc acc gtc tcc tca
189	AT13-031	Тяжелая цепь	cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgc gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac tac tgg agc tgg atc cgc cag gcc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac cag tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc ggc gac acg gct gtg tat tat tgt gcg aga ggc ccc cgg ggc atg tat agc agc tgc tcc ggg gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
190	AT12-020	Тяжелая цепь	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt acc tat agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca tcc att agt agt agt agt act aac tac tac gca gac tcc gtc aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gat ggg act ttc tcc tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
191	AT13-033	Тяжелая цепь	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ctc agt ttc agg aat tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agt aag aca tac tat gca cac tcc gtg aag ggc cga ttc acc ata tcc aga gac aaa tcc aag act atg ttg ttt ctc caa atg aac agc ctg aga cct gag gac acg gct gtt tat tac tgt gcg aaa gcc ggg ttg aac tac tat gga aac cta tta tca aac tac ttc tac tac gga atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc aca gtc acc gtc tgc tca
192	AT13-034	Тяжелая цепь	cag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agc tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gaa ttc acc ttc agt tcc cat gcc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ctt ata tgg tat gat gga agt aat aat tat tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac agc gtg cat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gat ggt tgt act ggt agc tgc tgc tat ttt gac aac tgg ggc cag gga acc cta gtc acc gtc tcc tgc
193	AT13-035	Тяжелая цепь	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aaa gac tgc tat tac tat ggt tgc ggg aga cga tgg ggc tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
194	AT13-036	Тяжелая цепь	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agt tat agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca tcc att agt agt agt agt act ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc agg aac tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tat tgt gcg aga agg agg gag gtc ggt aga gat ggc tac agt ttg tac ccc cgg ggc tac cac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
195	AT13-037	Тяжелая цепь	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt acc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctt gag tgg gtg gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat aca tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat ctg caa ata aag agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtc tat tac tgt gcg aga ggc cgt gga tat agt gcc caa ggg aat cgg aat agg gct tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
196	AT12-023	Легкая цепь	tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac ttc ctc aga agc tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc ttt ggt aaa aac aag cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttc acc atc act ggg gct cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc cgg gac cgc agt ggt aac cag ctg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
197	AT12-025	Легкая цепь	gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct cgc act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa
198	AT13-024	Легкая цепь	gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat aag gcg tct agt tta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc act gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat act tac ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

199	AT12-019	Легкая цепь	gcc atc cgg ttg acc cag tct cca tcc tca gtc tct gca tct aca gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag gct ttt agc agt tat tta gtc tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aac ctc ctg atc tac gct aca tcc act ttg caa ggt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aac ctg cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag tat tat agt tac cct ccg act ttt ggc cag ggg acc aag ttg gag atc aaa
200	AT13-022	Легкая цепь	tcc tat gag ctg act cag cca ccc tca gtc tcc ttg tcc cca gga cag aca gcc agc atc acc tgc tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa tat gct tgc tgg tat cag cag aag cca ggg cag tcc cct ttg ctg gtc atc tat caa gat agc aag cgg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc ggg acc cag gct atg gat gag gct gac tat tac tgt cag gcg tgg gac agc agc act gtc gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
201	AT13-023	Легкая цепь	gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att aga aat gtt tta ggc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ttg ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aat agt cac ccc ggc acg ttc ggc caa ggg acc aag ttg gaa atc aaa
202	AT13-031	Легкая цепь	gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att aga aat gat tta tgg tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctg atc tat gct gca gtc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aat agt tac cct ccg act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa
203	AT12-020	Легкая цепь	gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca tct gca tct aca gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag gat att agc agt ttt tta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctg atc tat gct gca tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc tgc ctg cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag tat tat agt tac cct ccg acg ttc ggc caa ggg acc agg ttg gaa atc aaa
204	AT13-033	Легкая цепь	cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gcc tcc ggg tct cct ggt cag tca gtc acc atc tcc tgt act ggg acc agc agt gac att ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cac cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ttg atg att tat gag gtc act aag cgg ccc tca ggg gtc cct gat cgt ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc gtc tct gga ctc cag gct gag gat gag gct cat tat tac tgc agc tca tat gca ggc agc aac gat ttg cta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctg
205	AT13-034	Легкая цепь	gaa gta ttg atg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agc att agc aac aac tta ggc tgg tat cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tac ggt gca tcc acc agg gcc act ggt atc cca ggc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc tac agc ctg cag tct gag gat ttt gca gtt tat tac tgt caa caa tat aat aac tgg cct ggc ctc act ttc ggc gga ggg acc aag ttg gag atc aaa
206	AT13-035	Легкая цепь	tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtc tct ttg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc cgg gac agc agt ggt aac cat ttg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
207	AT13-036	Легкая цепь	cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc ttg tct ggg tct cct aga cag tgc atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa caa ctc cca ggc aca gcc ccc aaa ctc atg att tat gat gtc aat gat cgg ccc tca ggg gtt tct att cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat aca aga agc aac act ttg ata ttc ggc gga ggg acc aaa ctg acc gtc cta
208	AT13-037	Легкая цепь	gaa ata ttg atg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa agg gtc atc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc aac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag cct ccc agc ctc ctc atc tat ggt gca ttc acg agg gtc act ggt gtc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag tct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag tac aat gac cgg ccc ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

Таблица 1В

Предпочтительные направленные против ОМЛ антитела согласно настоящему изобретению
(нумерация CDR согласно Kabat и др. 1991)

SEQ NO.	ID	Антитело	Название	Последовательность
209		АТ14-013	CDR1 тяжелой цепи	SPNWWT
210		АТ14-014	CDR1 тяжелой цепи	DAWMS
211		АТ14-015	CDR1 тяжелой цепи	DFAMS
212		АТ14-016	CDR1 тяжелой цепи	SYAMT
213		АТ14-013	CDR2 тяжелой цепи	EIYYGGRVSYNSALRS
214		АТ14-014	CDR2 тяжелой цепи	HINTKVDGGTTEYAAPVKQ
215		АТ14-015	CDR2 тяжелой цепи	FIRTKANDGTTEYAASVKQ
216		АТ14-016	CDR2 тяжелой цепи	SISGSGGSTYYADSVRG

217	AT14-013	CDR3 тяжелой цепи	AGQKNIGCGYSSCFISWFDT
218	AT14-014	CDR3 тяжелой цепи	TTEAIYDSSGYFHDI
219	AT14-015	CDR3 тяжелой цепи	ASDPFMTTDYYYYYMDV
220	AT14-016	CDR3 тяжелой цепи	AKGYVGCSGGNCSGGAFDI
221	AT14-013	CDR1 легкой цепи	KSSQTILQRSNHLNYLA
222	AT14-014	CDR1 легкой цепи	KSSRSVLYSSNNKNYLA
223	AT14-015	CDR1 легкой цепи	TGTSSDVGGYNSVS
224	AT14-016	CDR1 легкой цепи	GGNNIGSESVH
225	AT14-013	CDR2 легкой цепи	WASTRES
226	AT14-014	CDR2 легкой цепи	WASIRES
227	AT14-015	CDR2 легкой цепи	EVYKRPL
228	AT14-016	CDR2 легкой цепи	YDTRPS
229	AT14-013	CDR3 легкой цепи	HQYYTTPQT
230	AT14-014	CDR3 легкой цепи	QQYSRPPT
231	AT14-015	CDR3 легкой цепи	SSYGGTVLF
232	AT14-016	CDR3 легкой цепи	QVWDNTSDHPVVF
233	AT14-013	Тяжелая цепь	OGRLOESGPGLVKPSETLTLCVSGGSSVSSPNWWTWVRQAPGKGLEWIGEIYYGGRVSYNSALRSRVTISSDRS KEEFSKLRSVTAADTAIYYCAGQKNIGCGYSSCFISWFDTWGQGIATVSS
234	AT14-014	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMSWVRQAPGKGLEWVGHIINTKVDGGTTEYAAPVKGRFTISRD DSKNSLYLHMDSLKTEDTAVYYCTTEAIYDSSGYFHDIWGGSLVTVSS
235	AT14-015	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLAQPGSRSLRSLCTASGFRFGDFAMSWVRQAPGKGLEWVGFIIRTKANDGTTEYAASVKGRFIISRDD SKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCASDPFMTDYYYYYMDVWGGKTTVTSS
236	AT14-016	Тяжелая цепь	EVQVLESGGDSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLKVVSSISGGSTYYADSVRGRFTISRDNSK NTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKGYVGCSGGNCSGGAFDIWGGTVTVSS
237	AT14-013	Легкая цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIACKSSQTILQRSNHLNYLAWYQQKPGQPPKVLIIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTINSLQAEDVAVYYCHQYYTTPQTFGQGTKVEIK
238	AT14-014	Легкая цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSRSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTINSLQAEDVAVYYCQYSRPPTFGQGTKVEIK

239	AT14-015	Легкая цепь	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNSVSWYQHHPGKAPKLMIEVYKRPGLGVPDRFSGKSGNTASLTV SGLQAEDEAYYYCSSYGGTVLFGGGTKLTVL
240	AT14-016	Легкая цепь	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGNNIGSESVHWYQQKPGQAPVVVIYYDTRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDNTSDHPVVFGGGTKLTVL
241	AT14-013	CDR1 тяжелой цепи	agt cct aac tgg tgg act
242	AT14-014	CDR1 тяжелой цепи	gac gcc tgg atg agc
243	AT14-015	CDR1 тяжелой цепи	gat ttt gct atg agt
244	AT14-016	CDR1 тяжелой цепи	agc tat gcc atg acc
245	AT14-013	CDR2 тяжелой цепи	gaa atc tat tat ggt ggg aga gtg agc tac aac tgc gcc ctc agg agt
246	AT14-014	CDR2 тяжелой цепи	cat att aac acc aaa gtt gat ggt ggg aca aca gag tac gct gca ccc gtg aaa ggc
247	AT14-015	CDR2 тяжелой цепи	ttc att aga acc aaa gct aat gat ggg aca aca gaa tac gcc gcg tct gtg aaa ggc
248	AT14-016	CDR2 тяжелой цепи	agt att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg agg ggc
249	AT14-013	CDR3 тяжелой цепи	gcg ggt caa aaa aat att ggc tgt ggt tac agc agt tgc ttt atc agt tgg ttc gac acc
250	AT14-014	CDR3 тяжелой цепи	acc aca gag gcg ata tat gat agt agt ggt tat ttc cat gac tat
251	AT14-015	CDR3 тяжелой цепи	gct agc gat ccc ttc atg act aca gac tat tac tac tac tac atg gac gtc
252	AT14-016	CDR3 тяжелой цепи	gcg aaa gga tat gtg ggg tgt agt ggt ggg aac tgc tac tgc ggg ggt gct ttt gat atc
253	AT14-013	CDR1 легкой цепи	aag tcc agc cag act att tta caa agg tcc aac cat ttg aac tac tta gct
254	AT14-014	CDR1 легкой цепи	aag tcc agc cgg agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct
255	AT14-015	CDR1 легкой цепи	act ggg acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tct gtc tcc
256	AT14-016	CDR1 легкой цепи	ggg ggg aac aac att gga agt gaa agt gtt cac
257	AT14-013	CDR2 легкой цепи	tgg gca tct acc cgg gaa tcc
258	AT14-014	CDR2 легкой цепи	tgg gca tct atc cgg gaa tcc
259	AT14-015	CDR2 легкой цепи	gag gtc tat aag cgg ccc tta
260	AT14-016	CDR2 легкой цепи	tat gat acc gac cgg ccc tca

261	AT14-013	CDR3 легкой цепи	cac caa tat tat act act ccg cag act
262	AT14-014	CDR3 легкой цепи	cag caa tat tct cgt cct ccg acg
263	AT14-015	CDR3 легкой цепи	agc tca tat gga ggc acc gtg cta ttc
264	AT14-016	CDR3 легкой цепи	cag gtg tgg gat aac act agt gat cat cct gtg gta ttc
265	AT14-013	Тяжелая цепь	cag ggg cga ctg cag gag tgg ggc cca gga ctg gtg aag cct tgg gag acc ctg acc ctg acg tgc gct gtg tcc ggt ggc tcc tcc gtc agc agt cct aac tgg tgg act tgg gtc cgc cag gcc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg att gga gaa atc tat tat ggt ggg aga gtg agc tac aac tgg gcc ctg agg agt cga gtc acc att tca tca gac agg tcc aaa gag gag ttc tcc ctg aaa ctg agg tct gtg acc gcc ggc gac acg gcc ata tat tat tgt gcg ggt caa aaa aat att ggc tgt ggt tac agc agt tgc ttt atc agt tgg ttc gac acc tgg gga cag gga att ggc gtc acc gtc tcc tca
266	AT14-014	Тяжелая цепь	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt ttg gta aag cct ggg ggg tcc ctt aga ctg tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt gac gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cat att aac acc aaa gtt gat ggt ggg aca aca gag tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat tca aaa aat tgg ctg tat ctg cag atg gac agc ctg aaa acc gag gac aca gcc gtg tat tac tgt acc aca gag gcg ata tat gat agt agt ggt tat ttc cat gac tat tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca
267	AT14-015	Тяжелая цепь	gag gtg cag ctg gtg gag tgg ggg gga ggc ttg gca cag cca ggg cgg tcc ctg aga ctg tcc tgt aca gct tct gga ttc agg ttt ggt gat ttt gct atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag gga ctg gag tgg gta ggt ttc att aga acc aaa gct aat gat ggg aca aca gaa tac gcc ggc tct gtg aaa ggc aga ttc atc atc tca aga gat gat tcc aaa agt atc gcc tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac aca gcc gtt tat tac tgt gct agc gat ccc ttc atg act aca gac tat tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
268	AT14-016	Тяжелая цепь	gag gtg caa gtg ttg gag tct ggg gga gac tgg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctg tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat gcc atg acc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg aaa tgg gtc tca agt att agt ggt agt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg agg ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat gtg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gla tat tac tgt gcg aaa gga tat gtg ggg tgt agt ggt ggg aac tgc tac tgg ggg ggt gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca gtg gtc acc gtc tct tca
269	AT14-013	Легкая цепь	gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc gcc tgc aag tcc agc cag act att tta caa agg tcc aac cat ttg aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aaa gtg ctg att tat tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac
			cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctg acc aac agc ctg cag gct gag gat gtg gca gtt tat tac tgt cac caa tat tat act act ccg cag act ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa
270	AT14-014	Легкая цепь	gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cgg agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctg att tac tgg gca tct atc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctg acc aac agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tct cgt cct ccg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa
271	AT14-015	Легкая цепь	cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc ggc tcc ggg tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act ggg acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tct gtc tcc tgg tac caa cat cca cca ggc aaa gcc ccc aaa ctg atg att tat gag gtc tat aag cgg ccc tta ggg gtc cct gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac agc gcc tcc ctg acc gtc tct ggg ctg cag gct gag gat gag gct tat tat tac tgc agc tca tat gga ggc acc gtg cta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
272	AT14-016	Легкая цепь	tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tca gtc tca gtg gcc cca gga aag acc gcc cgg att acc tgt ggg ggg aac aac att gga agt gaa agt gtt cac tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg gtg gtc atc tat tat gat acc gac cgg ccc tca ggg atc cct gag cgc ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac acg gcc acc ctg acc atc agc agg gtc gaa gcc ggg gat gag gcc gac tat tac tgt cag gtg tgg gat aac act agt gat cat cct gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

Таблица 2
МАТ специфичны к ОМЛ

МАТ		Линии клеток											Первичные клетки	
Название	Класс Ig	Мел1	Мел2	Мел3	ВJ	ФБ	Киш1	Киш2	Киш3	Vero	HUVEC	НерG2	МКПК	КМ
AT12-019	IgG1 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT13-023	IgG1 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT13-031	IgG1 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT12-020	IgG3 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT12-023	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT12-025	IgG3 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT13-022	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT13-024	IgG3 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Мел¹ - меланома 126.2;

Мел² - меланома BLM;

Мел³ - меланома WBO;

ВJ - линия клеток фибробластов;

ФБ - первичные фибробласты (кожа);

Киш¹-Co1o205;

Киш²-Caco-2;

Киш³-HT29;

Vero - клетки не принадлежащей человеку почки;

МКПК - мононуклеарные клетки периферической крови;

КМ - клетки костного мозга.

Таблица 3

Обзор ОМЛ-специфических МАТ, полученных из пациента с эффективным ответом ТПЛ (донора 59)

МАТ				ОМЛ		Первичная ОМЛ*				
Название	Класс Ig	CD27	СГМ V _H /V _L	ТНР-1	ММ6	М0	М1	М1	М1	М4
AT12-019	IgG1 κ	+	10/9	++	+	+	+	++	+/-	-
AT13-023	IgG1 κ	+	8/4	++		++	+			
AT13-031	IgG1 κ	+	1/1	++	+	-	+	-	-	+/-
AT12-020	IgG3 κ	+	4/2	++						
AT12-023	IgG3 λ	-	Зародышевая/6	+++	++	+	++	++	+/-	++
AT12-025	IgG3 κ	-	1/1	++	++	-	+/-	+	-	-
AT13-022	IgG3 λ	+	Зародышевые	++		++	++			
AT13-024	IgG3 κ	-	6/3	++	++	++	++	++		

ММ6 - МоноМас6;

М0 - донор 77;

М1-доноры 69, 79, 86 соответственно;

М4-донор 78;

СГМ - количество соматических гипермутаций;

* ОМЛ согласно ФАБ-классификации.

Таблица 4

Некоторые МАТ связываются с другими гематологическими опухолями

МАТ		Линии клеток других гематологических опухолей				Первичные опухоли	
Название	Класс Ig	OCI-Ly1	OCI-Ly7	U266	NCI-H929	НХЛ п.о.	ОЛЛ п.о.
AT12-019	IgG1 κ	+	-	-	-	-	-
AT13-023	IgG1 κ						
AT13-031	IgG1 κ	++	+	-	+/-	++	-
AT12-020	IgG3 κ						
AT12-023	IgG3 λ	-	-	+/-	-	++	-
AT12-025	IgG3 κ	-	-	+	-	-	-
AT13-022	IgG3 λ						
AT13-024	IgG3 κ	++	+	-	-	-	-

OCI-Ly1 и OCI-Ly7-линии клеток диффузной В-крупноклеточной лимфомы; U266 и NCI-H929-линии клеток множественной миеломы;

НХЛ и.о. - клетки В-неходжкинской лимфомы, свежесыведенные из пациента, которому впервые поставили данный диагноз;

ОЛЛ п.о. - В-клетки острой лимфатической лейкемии, свежесыведенные из пациента, которому впервые поставили данный диагноз.

Таблица 5

Некоторые МАТ проявляют активность in vitro

МАТ				Уничтожение	
Название	Класс Ig	CD27	СГМ V _H /V _L	ТНР-1	М0/5
AT12-019	IgG1 κ	+	10/9	нет	нет
AT13-023	IgG1 κ	+	8/4		
AT13-031	IgG1 κ	+	1/1		
AT12-020	IgG3 κ	+	4/2		
AT12-023	IgG3 λ	-	Зародышевая/6	да	
AT12-025	IgG3 κ	-	1/1	да	да
AT13-022	IgG3 λ	+	Зародышевые		
AT13-024	IgG3 κ	-	6/3	нет	да

Активность in vitro антител AT13-023, AT13-031, AT12-020 и AT13-022 пока еще не исследовали.

Таблица 6

2^{ой} пациент с ОМЛ, проявивший ответ ТПЛ (донор 58)

МАТ				ОМЛ		Нет связывания с			
Клон	CD27	Класс Ig	СГМ V _H /V _L	ТНР-1	ММ6	МКПК	Саго	НТ-29	НерG2
AT13-033	+	IgG3 λ	18/5	++	++	-	-	-	-
AT13-034	+	IgG3 κ	14/6	++	++	-	-	-	-
AT13-035	-	IgG3 λ	0/0	++	++	-	-	-	-
AT13-036	-	IgG3 λ	4/9	++	++	-	-	-	-
AT13-037	+	IgG3 κ	4/8	++	++	-	-	-	-

СГМ - количество соматических гипермутаций.

Таблица 7

Обзор ОМЛ-специфических МАТ, полученных из 3^{его} пациента с эффективным ответом ТПЛ (донор 101)

МАТ				ОМЛ		Первичная ОМЛ*			
Название	Класс Ig	CD27	СГМ V _H /V _L	ТНР-1	Molm13	M0	M4	M5 ¹	M5 ²
AT14-013	IgG1 κ	+	26/11	+++	+++	+++	++	+/-	+
AT14-014	IgG3 κ	+	9/6	++	++	-	-	-	-
AT14-015	IgG3 λ	+	9/9	++	-	-	+	-	-
AT14-016	IgG3 λ	+	9/5	++	++	-	+	-	-

M1 - донор 77;

M4 - донор BL-046;

M5¹ - донор BL-034,M5² - донор BL-038

*ОМЛ согласно ФАБ-классификации;

СГМ - количество соматических гипермутаций.

Таблица 8

МАТ специфичны к ОМЛ (донор 101)

МАТ		Линии клеток				МКПК				Первичные клетки
Название	Класс Ig	ФБ	Киш	Печ ¹	Печ ²	CD3	CD14	CD19	CD56	Эмбриональные клетки печени
AT14-013	IgG1 κ	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
AT14-014	IgG3 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT14-015	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT14-016	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FB: первичный фибробласты (кожа);

Col: Сасо-2;

Liv¹-линия клеток печени Nuh7;Liv²-линия клеток печени HepG2;

МКПК - моноклеарные клетки периферической крови.

Таблица 9А

Обзор ОМЛ-специфических МАТ, полученных из 2^{ого} пациента с эффективным ответом ТПЛ (донор 58)

МАТ				ОМЛ		Первичная ОМЛ*			
Клон	CD27	Класс Ig	СГМ V _H /V _L	ТНР-1	MM6	M0	M0	M1	M4
AT13-033	+	IgG3 λ	18/5	++	++	-	-	-	-
AT13-034	+	IgG3 κ	14/6	++	++	+/-	-	-	-
AT13-035	-	IgG3 λ	0/0	++	++	-	-	-	-
AT13-036	-	IgG3 λ	4/9	++	++	-	-	-	-
AT13-037	+	IgG3 κ	4/8	++	++	-	-	-	-

MM6 - МоноMac6;

M0 - донор 77, BL-030, соответственно;

M1 - донор 69;

M4 - донор 78;

* ОМЛ согласно ФАБ-классификации;

СГМ - количество соматических гипермутаций.

Таблица 9В

Некоторые МАТ проявляют активность in vitro (донор 59)

МАТ				Уничтожение	
Название	Класс Ig	CD27	СГМ V _H /V _L	ТНР-1	M1
AT12-019	IgG1 κ	+	10/9	нет	нет
AT13-023	IgG1 κ	+	8/4	нет	н/о
AT13-031	IgG1 κ	+	1/1	да*	н/о
AT12-020	IgG3 κ	+	4/2	н/о	н/о
AT12-023	IgG3 λ	-	Зародышевая/6	да	н/о
AT12-025	IgG3 κ	-	1/1	да	да
AT13-022	IgG3 λ	+	Зародышевые	нет	н/о
AT13-024	IgG3 κ	-	6/3	нет	да

* Только при 37°C;

н/о=не определили.

Таблица 10
Некоторые МАТ проявляют активность in vitro (донор 58)

МАТ				Уничтожение
Клон	CD27	Класс Ig	СГМ V _H /V _L	ТНР-1
AT13-033	+	IgG3 λ	18/5	да
AT13-034	+	IgG3 κ	14/6	нет
AT13-035	-	IgG3 λ	0/0	да
AT13-036	-	IgG3 λ	4/9	да
AT13-037	+	IgG3 κ	4/8	да

Библиографический указатель ссылочных материалов

- Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, van Meijer M, Bia JA, Jongeneelen MA, Visser TJ, Bijl N, Geuijen CA, Marissen WE, Radosevic K, Throsby M, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ, de Kruif J, Goudsmit J, Kruisbeek AM. 2004. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 64:8443-50.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451–458.
- Bhat NM, Bieber MM, Hsu FJ, Chapman CJ, Spellerberg M, Stevenson FK, Teng NNH. 1997. Rapid cytotoxicity of human B lymphocytes induced by VH4-34 (VH4.21) gene-encoded monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 108: 151-159
- Biernacki MA, Marina O, Zhang W, Liu F, Bruns I, Cai A, Neuberg D, Canning CM, Alyea EP, Soiffer RJ, Brusic V, Ritz J, Wu CJ. 2010. Efficacious immune therapy in chronic myelogenous leukemia (CML) recognizes antigens that are expressed on CML progenitor cells. *Cancer Research* 70:906–915.
- Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, Lowman HB. 1999. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* 293:865-881.
- Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, Beaumont T, Scheeren FA, Spits H. 2008. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol* 180:4805-4815.
- Drexler HG, Minowada J. 1998. History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma* 31:305–316.

Hernandez AM, Rodriguez N, Gonzalez JE, et al. Anti-NeuGcGM3 Antibodies, Actively Elicited by Idiotypic Vaccination in Nonsmall Cell Lung Cancer Patients, Induce Tumor Cell Death by an Oncosis-Like Mechanism. *J Immunol* 2011;186(6):3735–3744.

Hugh J. M et al, 2004 *Methods in Molecular biology* Vol. 282

Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Reviews*. 2010;233(1):126–145.

Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011;1–17.

Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, Bakker AQ, Van Geelen CMM, Lukens MV, Van Bleek GM, Widjoatmodjo MN, Bogers WMJM, Mei H, Radbruch A, Scheeren FA, Spits H, Beaumont T. 2010. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat Med* 16:123–128.

Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Van Rooijen N, Weissman IL. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138:286-299

Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Haddank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H, German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358:1909–1918.

Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, Volin L, Gürman G, Maertens J, Bordigoni P, Holler E, Ehninger G, Polge E, Gorin N-C, Kolb H-J, Rocha V, EBMT Acute Leukemia Working Party. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell

transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *Journal of Clinical Oncology* 25:4938–4945.

Schmiedel BJ, Werner A, Steinbacher J, et al. Generation and Preclinical Characterization of a Fc-optimized GITR-Ig Fusion Protein for Induction of NK Cell Reactivity Against Leukemia. *Mol Ther*. 2013;21(4):877–886.

Singh R, Cadeddu R-P, Fröbel J, et al. The non-steroidal anti-inflammatory drugs Sulindac sulfide and Diclofenac induce apoptosis and differentiation in human acute myeloid leukemia cells through an AP-1 dependent pathway. *Apoptosis*. 2011;16(9):889–901.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno K, Tada K. 1988. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171–176.

Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, Bernstein ID. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. 2012. *Blood* 119: 6198-208.

Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, Wang J, Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen JD, Lovelace P, Scheeren FA, Chao MP, Weiskopf K, Tang C, Volkmer AK, Naik TJ, Storm TA, Mosley AR, Edris B, Schmid SM, Sun CK, Chua MS, Murillo O, Rajendran P, Cha AC, Chin RK, Kim D, Adorno M, Raveh T, Tseng D, Jaiswal S, Enger PØ, Steinberg GK, Li G, So SK, Majeti R, Harsh GR, van de Rijn M, Teng NN, Sunwoo JB, Alizadeh AA, Clarke MF, Weissman IL. 2012. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6662-7.

Wu CJ, Yang XF, McLaughlin S, Neuberg D, Canning C, Stein B, Alyea EP, Soiffer RJ, Dranoff G, Ritz J. 2000. Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 106:705–714.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело человека, которое способно связываться с клетками острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) и которое содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 209;

последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 213;

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 217;

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 221;

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 225; и

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 229,

или его антигенсвязывающий фрагмент.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно п.1, отличающееся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент принадлежит к изотипу IgG.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой однодоменное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело, унитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из пп.1-3, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 233, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 237.

5. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, который связан с детектируемой меткой.

6. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, который связан с химиотерапевтическим средством, токсичной группой, иммуномодулирующей молекулой или радиоактивным соединением.

7. Мультиспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и CD3-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

8. Мультиспецифическое антитело по п.7, которое представляет собой биспецифическое антитело.

9. Т-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR), которая способна связываться с компонентом поверхности клеток острой миелоидной лейкемии (ОМЛ), причем указанная Т-клетка содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 209;

последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 213;

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 217;

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 221;

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 225; и

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 229.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4.

11. Молекула нуклеиновой кислоты согласно п.10, содержащая последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 265.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 269.

14. Молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из пп.10-13, которая содержит кДНК, пептидо-нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК) или спираль ДНК/РНК.

15. Вектор для клонирования и/или экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из пп.10-14.

16. Выделенная клетка для получения рекомбинантным способом антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 или 13 или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 или 13.

17. Не являющееся человеком животное для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.12 или 13 или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.12 или 13.

18. Композиция для обнаружения ОМЛ, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из пп.1-4 или молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 или 13, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.12 или 13, или клетку согласно п.16.

19. Композиция для лечения ОМЛ, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из пп.1-4 или молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.12 или 13, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.12 или 13, или клетку согласно п.16.

20. Композиция согласно п.19, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

21. Композиция согласно любому из пп.18-20, которая содержит по меньшей мере два антитела или их антигенсвязывающих фрагментов согласно любому из пп.1-4.

22. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4 или конъюгата по п.5 или 6 для лечения или предупреждения миелопролиферативного расстройства.

23. Применение молекулы нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулы нуклеиновой ки-

слоты согласно п.12 или 13 для лечения миелопролиферативного расстройства.

24. Применение вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно п.12 или 13 для лечения миелопролиферативного расстройства.

25. Применение клетки согласно п.16 для лечения миелопролиферативного расстройства.

26. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4 или конъюгата по п.5 или 6 для диагностики миелопролиферативного расстройства.

27. Применение по любому из пп.22-26, где указанное миелопролиферативное расстройство представляет собой острую миелоидную лейкемию (ОМЛ).

28. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4 или конъюгата по п.5 или 6 для определения того, содержит ли образец миелопролиферативные клетки.

29. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4, включающий предоставление клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 или 13, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 и молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 или 13, и обеспечение возможности трансляции указанной клеткой указанной молекулы нуклеиновой кислоты или вектора.

30. Способ по п.29, дополнительно включающий сбор, очистку и/или выделение указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4.

31. Способ определения присутствия миелопролиферативных клеток в образце, включающий: приведение указанного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно любому из пп.1-4 или конъюгатом по п.5 или 6, и

обеспечение возможности связывания указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата с миелопролиферативными клетками, если они присутствуют, и

определение того, связаны или нет миелопролиферативные клетки или лимфолиферативные клетки с указанным антителом или его фрагментом или конъюгатом, где связывание указывает на присутствие миелопролиферативных клеток в указанном образце.

32. Применение согласно п.28, отличающееся тем, что указанные миелопролиферативные клетки представляют собой клетки ОМЛ.

33. Способ по п.31, отличающийся тем, что указанные миелопролиферативные клетки представляют собой клетки ОМЛ.

34. Способ лечения миелопролиферативного расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из пп.1-4 или конъюгата по п.5 или 6.

35. Способ определения присутствия миелопролиферативного расстройства у индивида, включающий:

приведение образца из указанного индивида в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно любому из пп.1-4 или конъюгатом по п.5 или 6, и

обеспечение возможности связывания указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата с миелопролиферативными клетками, если они присутствуют, и

определение того, связаны или нет миелопролиферативные клетки с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом, где связывание указывает на присутствие миелопролиферативного расстройства у указанного индивида.

36. Способ согласно п.34 или 35, отличающийся тем, что указанное миелопролиферативное расстройство представляет собой ОМЛ, и при этом указанные миелопролиферативные клетки представляют собой клетки ОМЛ.

Панель антител к ОМЛАИММTherapeutics

Примечание: Нумерация CDR согласно Kabat и др.(1991)

AT12-023 (11C9-22C11)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV4-34*01 F

IGHD2-2*01 F

IGHJ6*03 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLQQWCGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF

CDR1 GYYWS

Fw2 WIRQPPGKGLEWIG

CDR2 EINHSGSTNYPNPSLKS

Fw3 RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

CDR3 GRSTSPLDYYYYYMDV

Fw4 WAKGTTVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tac tac tgg agc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg agg

CDR3 ggc cgt agt acc agc ccg ctc gac tac tac tac tac tac atg gac gtc

Fw4 tgg gcc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGLV3-19*01 F

IGLJ3*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 SSELTDPAVSVLGGQTVRITC

CDR1 QGDFLRSYYAS

Fw2 WYQQKPGQAPVLFVIF

CDR2 GKNKRPS

Fw3 GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC

CDR3 NSRDRSGNHLV

Fw4 FGGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc

CDR1 caa gga gac ttc ctc aga agc tat tat gca agc

Fw2 tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc ttt

CDR2 ggt aaa aac aag cgg ccc tca

Fw3 ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct
cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt

CDR3 aac tcc cgg gac cgc agt ggt aac cac ctg gtg

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT12-025 (14D3-12D5)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV4-34*01 F
IGHD1-1*01 F
IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGGSFS
CDR1 GYYWS
Fw2 WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 EINHSGSTNYNPSLKS
Fw3 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
CDR3 GSMARPKPFDY
Fw4 WGQGTLLVTSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tat tac tgg agc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga

CDR3 ggc tca atg gca aga ccc aag cca ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGKV1-39*01 F
IGKJ3*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
CDR1 RASQSISRVLN
Fw2 WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 AASSLQS
Fw3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
CDR3 QQSYSTPRT
Fw4 FGFGTKVDIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gca agt cag agc att agc agg tat tta aat

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat

CDR2 gct gca tcc agt ttg caa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg
caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt

CDR3 caa cag agt tac agt acc cct cgc act

Fw4 ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa

AT13-024 (15H3-10F7)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV3-30*02 F
IGHD3-22*01 F
IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 FIRYDGSNKYFADSVRG
Fw3 RFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAK
CDR3 DPQERIYYSDTSGYLDY
Fw4 WQGGLTVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcg tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 ttt ata cgg tat gat gga agt aat aaa tac ttt gca gac tcc gtg agg ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gct
gag gac acg gct gtg tat tac tgt

CDR3 gcg aaa gat ccc caa gag cgt att tat tac tct gat act agt ggt tac ctt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGKV1-5*03 F
IGKJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC
CDR1 RASQSISSWLA
Fw2 WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 KASSLES
Fw3 GVPSTRFSGTSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
CDR3 QQYNTYPYT
Fw4 FGQGTKLEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat

CDR2 aag gcg tct agt tta gaa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc act gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg
cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc

CDR3 caa cag tat aat act tac ccg tac act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

AT12-019 (1B3-15B2)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV3-23*01 F
IGHD3-10*01 F
IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVHLLSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYAMS
Fw2 WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 TIRASGGSTSYADSVKG
Fw3 RFTISRDNQSRLYLQMNSLTAEDEVYCAK
CDR3 SPAMIRGVRGGDYFDY
Fw4 WGQGTLLTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gag gtg cac ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttt agc

CDR1 agc tat gcc atg agt

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca

CDR2 act att agg gct agt ggt ggt agc aca agc tac gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc cag agc agg ttg tat ctg caa atg aac agt ctg aca gcc
gag gac acg gcc gta tat tac tgt gcg aaa

CDR3 tct cct gct atg att cgg gga gtt agg ggg ggt gac tac ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGKV1-8*01 F
IGKJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 AIRLTQSPSSVSASTGDRVITIC
CDR1 RASQAFSSYL
Fw2 WYQKPGKAPNLLIY
CDR2 ATSTLQG
Fw3 GVPSRFSGSGSDFTLTISNLSQSEDFATYYC
CDR3 QQYYSYPPT
Fw4 FGQGTKLEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gcc atc cgg ttg acc cag tct cca tcc tca gtc tct gca tct aca gga gac aga gtc acc atc act
tgt

CDR1 cgg gcg agt cag gct ttt agc agt tat tta gtc

Fw2 tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aac ctc ctg atc tac

CDR2 gct aca tcc act ttg caa ggt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aac ctg
cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cag tat tat agt tac cct ccg act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ttg gag atc aaa

AT13-022 (8H11-6P4)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV3-30*03 F

IGHD2-15*01 F

IGHJ6*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS

CDR1 SYGMH

Fw2 WVRQAPGKGLEWVAV

CDR2 ISYDGSNKYYADSVKG

Fw3 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

CDR3 DGKGIVVIYYGYGMDV

Fw4 WGQGTTVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt

CDR2 ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct
gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aaa

CDR3 gat ggg aag ggg att gta gtt att tac tac tac tac ggt atg gac gtc

Fw4 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGLV3-1*01 F

IGLJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 SYELTQPPSVSVSPGQTASITC

CDR1 SGD KLGDKYAC

Fw2 WYQKPGQSPVLVIY

CDR2 QDSKRPS

Fw3 GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

CDR3 QAWDSSTVVF

Fw4 GGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 tcc tat gag ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga cag aca gcc agc atc acc tgc

CDR1 tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa tat gct tgc

Fw2 tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gtg ctg gtc atc tat

CDR2 caa gat agc aag cgg ccc tca

Fw3 ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc ggg acc
cag gct atg gat gag gct gac tat tac tgt

CDR3 cag gcg tgg gac agc agc act gtg gta ttc

Fw4 ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT13-023 (19G7-8L15)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV4-34*12 F
IGHD2-2*01 F
IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF
CDR1 GYFWT
Fw2 WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 ETVHSGGTNYNPSLKS
Fw3 RVTISVDTSKNQPSLRRLNSVTAAADTAVYYCVR
CDR3 GLNSPFDY
Fw4 WGQGTLLVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gta cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tac ttc tgg acc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa acc gtt cat agt gga ggc acc aac tac aac cgg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gtc gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg agg ctg aac tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gtg aga

CDR3 ggc ctt aac agc ccc ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc cta gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGKV1-17*01 F
IGKJ1*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
CDR1 RASQGIRNVLG
Fw2 WYQKPGKAPKCLIIY
CDR2 AASSLQS
Fw3 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 LQHNSHPRT
Fw4 FGQGTKVEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gca agt cag ggc att aga aat gtt tta ggc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag tgc ctg atc tat

CDR2 gct gca tcc agt ttg caa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg
cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 cta cag cat aat agt cac ccc cgg acg

Fw4 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa

AT13-031 (6G6-2I10)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV4-34*01 F

IGHD6-6*01 F

IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSF

CDR1 GYYWS

Fw2 WIRQPPGKGLEWIG

CDR2 EINHSGSTNYNPSLKS

Fw3 RVTISVDTSKKQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

CDR3 GPRGMYSSSSGDY

Fw4 WGQGTLTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tac tac tgg agc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aag cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tat tgt gcg aga ggc

CDR3 ccc cgg ggc atg tat agc agc tcg tcc ggg gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGKV1-17*01 F

IGKJ2*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC

CDR1 RASQGIRNDLG

Fw2 WYQQKPGKAPKRLIY

CDR2 AAVSLQS

Fw3 GVPSRFRSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC

CDR3 LQHNSYPRT

Fw4 FGQGTKLEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gca agt cag ggc att aga aat gat tta ggc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag cgc ctg atc tat

CDR2 gct gca gtc agt ttg caa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg
cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 cta cag cat aat agt tac cct cgg act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

AT12-020 (1B3-13C8)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV3-21*01 F
IGHD1-26*01 F
IGHJ6*03 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 TYSMN
Fw2 WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 SISSSSGYIYYADSVKG
Fw3 RFTISRDNAXNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
CDR3 DGTFSYIYYMDV
Fw4 WGKGTTIVTSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 acc tat agc atg aac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca

CDR2 tcc att agt agt agt agt ggt tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc
gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga

CDR3 gat ggg act ttc tcc tac tac tac tac atg gac gtc

Fw4 tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGKV1-8*01 F
IGKJ1*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 AIRMTQSPSSFSASTGDRVITTC
CDR1 RASQDISSSLA
Fw2 WYQQXPGKAPKLLIY
CDR2 AASTLQS
Fw3 GVPSRFSGSGSDFTLTISCLQSEDFATYYC
CDR3 QQYYSYPPT
Fw4 FGQGTRLEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca ttc tct gca tct aca gga gac aga gtc acc atc act
tgt

CDR1 cgg gcg agt cag gat att agc agt tct tta gcc

Fw2 tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctg atc tat

CDR2 gct gca tcc act ttg caa agt

Fw3 gga gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc tgc ctg
cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cag tat tat agt tac cct ccg acg

Fw4 ttc ggc caa ggg acc agg ttg gaa atc aaa

AT13-033 (7H10-2A4)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV3-30*03 F
IGHD4-23*01 ORF
IGHJ6*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAVSGLSFR
CDR1 NYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 VISHDGSKTYYGHSVKG
Fw3 RFTISRDKSKTMLFLQMNSLRPEDTAVYYCAK
CDR3 AGLNYYGNLLSNFYFYGM DV
Fw4 WGQGTITVTSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gtc tct gga ctc agt ttc agg

CDR1 aat tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 gtc att tcg cat gat gga agt aag aca tac tat gga cac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc ata tcc aga gac aaa tcc aag act atg ttg ttt ctc caa atg aac agc ctg aga cct
gag gac acg gct gtt tat tac tgt gcg aaa

CDR3 gcc ggg ttg aac tac tat gga aac cta tta tca aac tac ttc tac tac gga atg gac gtc

Fw4 tgg ggc caa ggg acc aca gtc acc gtc tcg tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGLV2-8*01 F
IGLJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QSALTQPPSASGSPGQSVTISC
CDR1 TGTSSDIGGYNYVS
Fw2 WYQHHPGKAPKLMYY
CDR2 EVTKRPS
Fw3 GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEAHYYC
CDR3 SSYAGSNDLL
Fw4 FGGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gcg tcc ggg tct cct ggt cag tca gtc acc atc tcc tgt

CDR1 act ggg acc agc agt gac att ggt ggt tat aac tat gtc tcc

Fw2 tgg tac caa cac cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ttg atg att tat

CDR2 gag gtc act aag cgg ccc tca

Fw3 ggg gtc cct gat cgt ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc gtc tct gga ctc
cag gct gag gat gag gct cat tat tac tgc

CDR3 agc tca tat gca ggc agc aac gat ttg cta

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctg

AT13-034 (7H10-4F9)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV3-33*01 F

IGHD2-15*01 F

IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVHLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASEFTFS

CDR1 SHAIH

Fw2 WVRQAPGKGLEWVA

CDR2 LIWYDGSNNYYADSVKG

Fw3 RFTISRDSKNTVHLQMNSLRVEDTAVYYC

CDR3 ARDGCTGGSCCYFDN

Fw4 WGQGTLVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 cag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg acg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcg tct gaa ttc acc ttc agt

CDR1 tcc cat gcc ata cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 ctt ata tgg tat gat gga agt aat aat tat tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acg gtg cat ctg caa atg aac agc ctg aga gtc
gag gac acg gct gtg tat tac tgt

CDR3 gcg aga gat ggt tgt act ggt ggt agc tgc tgc tat ttt gac aac

Fw4 tgg ggc cag gga acc cta gtc acc gtc tcc tcg

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGKV3-15*01 F

IGKJ4*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC

CDR1 RASQSIENNIG

Fw2 WYQKPGQAPRLLIY

CDR2 GASTRAT

Fw3 GIPGRFSGSGSTEFTLTISLQSEDFAVYYC

CDR3 QQYNNWPRLT

Fw4 FGGGTKVEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 gaa gta gtg atg acg cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc
tgc

CDR1 agg gcc agt cag agc att agc aac aac tta ggc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tac

CDR2 ggt gca tcc acc agg gcc act

Fw3 ggt atc cca ggc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc tac agc ctg
cag tct gag gat ttt gca gtt tat tac tgt

CDR3 caa caa tat aat aac tgg cct cgg ctc act

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa

AT13-035 (19C7-2F8)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV3-30*03 F
IGHD3-10*01 F
IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG
Fw3 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3 AKDSYYYGSGRRWGYFDY
Fw4 WQGTLVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 gtt ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct
gag gac acg gct gtg tat tac tgt

CDR3 gcg aaa gac tcg tat tac tat ggt tcg ggg aga cga tgg ggc tac tac ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGLV3-19*01 F
IGLJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 SSELTDPAVSVLGGQTVRITC
CDR1 QGDSLRSYYAS
Fw2 WYQQKPGQAPVLIY
CDR2 GKNRPS
Fw3 GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC
CDR3 NSRDSSGNHVV
Fw4 FGGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc

CDR1 caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc

Fw2 tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat

CDR2 ggt aaa aac aac cgg ccc tca

Fw3 ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct
cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt

CDR3 aac tcc cgg gac agc agt ggt aac cat gtg gta

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT13-036 (12C2-5F6)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV3-21*01 F
IGHD5-24*01 ORF
IGHJ6*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYSMN
Fw2 WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 SISSSTYIYYADSVKG
Fw3 RFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3 ARREVGGRDGYSLYPRGYHYGMDV
Fw4 WGQGTITVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agt tat agc atg aac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca

CDR2 tcc att agt agt agt agt act tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc agg aac tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc
gag gac acg gct gtg tat tat tgt

CDR3 gcg aga agg agg gag gtc ggt aga gat ggc tac agt ttg tac ccc cgg ggg tac cac tac ggt atg
gac gtc

Fw4 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGLV2-14*01 F
IGLJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QSALTQPASVSGSPRQSITISC
CDR1 TGTSSDVGGYNYVS
Fw2 WYQQLPGKAPKLMY
CDR2 DVNDRPS
Fw3 CVSIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
CDR3 SSYTRSNVTI
Fw4 FGGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct aga cag tcg atc acc atc tcc tgc

CDR1 act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc

Fw2 tgg tac caa caa ctc cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat

CDR2 gat gtc aat gat cgg ccc tca

Fw3 ggg gtt tct att cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc
cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc

CDR3 agc tca tat aca aga agc aac act gtg ata

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aaa ctg acc gtc cta

AT13-037 (3G11-5E3)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV3-33*01 F

IGHD5-12*01 F

IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGERSLRLSCAASGFTFS

CDR1 TYGMH

Fw2 WVRQAPGKGLEWVA

CDR2 VIWYDGSNTYYADSVKG

Fw3 RFTISRDN SKNTLYLQIKSLRAEDTAVYYC

CDR3 ARGRGYS AQGNRRNRAYYFDY

Fw4 WQGGTLTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcg tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 acc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctt gag tgg gtg gca

CDR2 gtt ata tgg tat gat gga agt aat aca tac tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat ctg caa ata aag agc ctg aga gcc
gag gac acg gct gtc tat tac tgt

CDR3 gcg aga ggc cgt gga tat agt gcc caa ggg aat cgg aat agg gct tac tac ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGKV3-15*01 F

IGKJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EIVMTQSPATLSVSPGERVILSC

CDR1 RASQSVSSNLA

Fw2 WYQQKPGQPPRLLIY

CDR2 GAFTRVT

Fw3 GVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYC

CDR3 QQYNDRPPYT

Fw4 FGQGTKLEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gaa ata gtg atg acg cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg gaa agg gtc atc ctc tcc
tgc

CDR1 agg gcc agt cag agt gtt agc agc aac tta gcc

Fw2 tgg tac cag cag aaa cct ggc cag cct ccc agg ctc ctc atc tat

CDR2 ggt gca ttc acg agg gtc act

Fw3 ggt gtc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg
cag tct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt

CDR3 cag cag tac aat gac cgg ccc ccg tac act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

AT14-013 (2K23-1K13)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV4-4*02 F

IGHD6-19*01 F

IGHJ5*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QGRLQESGPGLVKPSSETLTITCAVSGGSSVS

CDR1 SPNWWT

Fw2 WVRQAPGKGLEWIG

CDR2 EIYYGGRVSYNSALRS

Fw3 RVTISSDRSKEEFSLKLRSVTAADTAIYYC

CDR3 AGQKNIGCGYSSCFISWFDT

Fw4 WGQGIATVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag ggg cga ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tgc gag acc ctg acc ctc acg tgc
gct gtg tcc ggt ggc tcc tcc gtc agc

CDR1 agt cct aac tgg tgg act

Fw2 tgg gtc cgc cag gcc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg att gga

CDR2 gaa atc tat tat ggt ggg aga gtg agc tac aac tgc gcc ctc agg agt

Fw3 cga gtc acc att tca tca gac agg tcc aaa gag gag ttc tcc ctg aaa ctg agg tct gtg acc gcc
gcg gac acg gcc ata tat tat tgt

CDR3 gcg ggt caa aaa aat att ggc tgt ggt tac agc agt tgc ttt atc agt tgg ttc gac acc

Fw4 tgg gga cag gga att gcg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGKV4-1*01 F

IGKJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATIA

CDR1 KSSQTILQRSNHLNYLA

Fw2 WYQKPGQPPKVLII

CDR2 WASTRES

Fw3 GVPDRFSGSGSTDTFTLTINSLQAEDVAVYYC

CDR3 HQYYTTPQT

Fw4 FGQGTKVEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc gcc
tgc

CDR1 aag tcc agc cag act att tta caa agg tcc aac cat ttg aac tac tta gct

Fw2 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aaa gtg ctc att tat

CDR2 tgg gca tct acc cgg gaa tcc

Fw3 ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg
cag gct gag gat gtg gca gtt tat tac tgt

CDR3 cac caa tat tat act act ccg cag act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa

AT14-014 (6P13-5H5)**Тяжелая цепь****Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGHV3-15*01 F

IGHD3-22*01 F

IGHJ4*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS

CDR1 DAWMS

Fw2 WVRQAPGKGLEWVG

CDR2 HINTKVDGGTTEYAAPVKG

Fw3 RFTISRDDSKNSLYLHMDSLKTEDTAVYYC

CDR3 TTEAIYDSSGYFHDY

Fw4 WGQGSLLTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt ttg gta aag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc act ttc agt

CDR1 gac gcc tgg atg agc

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc

CDR2 cat att aac acc aaa gtt gat ggt ggg aca aca gag tac gct gca ccc gtg aaa ggc

Fw3 aga ttc acc atc tca aga gat gat tca aaa aat tcg ctg tat ctg cac atg gac agc ctg aaa acc
gag gac aca gcc gtg tat tac tgt

CDR3 acc aca gag gcg ata tat gat agt agt ggt tat ttc cat gac tat

Fw4 tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь**Рекомбинированная из генных сегментов:**

IGKV4-1*01 F

IGKJ1*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

CDR1 KSSRSVLYSSNNKNYLA

Fw2 WYQQKPGQPPLLIY

CDR2 WASIRES

Fw3 GVPDRFSGSGGTDFLTINSLQAEDVAVYYC

CDR3 QQYSRPPT

Fw4 FGQGTKVEIK

НУКЛЕОТИДНАЯ:Fw1 gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac
tgc

CDR1 aag tcc agc cgg agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct

Fw2 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac

CDR2 tgg gca tct atc cgg gaa tcc

Fw3 ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg
cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt

CDR3 cag caa tat tct cgt cct ccg acg

Fw4 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa

AT14-015 (1L18-7H16)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV3-49*04 F
IGHD4-11*01 F
IGHJ6*03 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVQLVESGGGLAQPGRSRLSCTASGFRFG
CDR1 DFAMS
Fw2 WVRQAPGKGLEWVG
CDR2 FIRTKANDGTTEYAASVKG
Fw3 RFIISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC
CDR3 ASDPFMTTDYYYMDV
Fw4 WGKGTITVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tcg ggg gga ggc ttg gca cag cca ggg cgg tcc ctg aga ctc tcc tgt
aca gct tct gga ttc agg ttt ggt

CDR1 gat ttt gct atg agt

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag gga ctg gag tgg gta ggt

CDR2 ttc att aga acc aaa gct aat gat ggg aca aca gaa tac gcc gcg tct gtg aaa ggc

Fw3 aga ttc atc atc tca aga gat gat tcc aaa agt atc gcc tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc
gag gac aca gcc gtt tat tac tgt

CDR3 gct agc gat ccc ttc atg act aca gac tat tac tac tac tac atg gac gtc

Fw4 tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGLV2-8*01 F
IGLJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 QSALTQPPSASGSPGQSVTISC
CDR1 TGTSSDVGGYNSVS
Fw2 WYQHHPGKAPKLMY
CDR2 EVYKRPL
Fw3 GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEAYYYC
CDR3 SSYGGTVLF
Fw4 GGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gcg tcc ggg tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc

CDR1 act ggg acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tct gtc tcc

Fw2 tgg tac caa cat cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat

CDR2 gag gtc tat aag cgg ccc tta

Fw3 ggg gtc cct gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc gtc tct ggg ctc
cag gct gag gat gag gct tat tat tac tgc

CDR3 agc tca tat gga ggc acc gtg cta ttc

Fw4 ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT14-016 (1P22-8F16)

Тяжелая цепь

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGHV3-23*01 F

IGHD2-15*01 F

IGHJ3*02 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 EVQVLESGGDSVQPGGSLRLSCAASGFTFS

CDR1 SYAMT

Fw2 WVRQAPGKGLKWVS

CDR2 SISGSGGSTYYADSVRG

Fw3 RFTISRDN SKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYC

CDR3 AKGYVGCSGGNCYSGGAFDI

Fw4 WGQGTIVTVSS

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 gag gtg caa gtg ttg gag tct ggg gga gac tcg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttt agc

CDR1 agc tat gcc atg acc

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg aaa tgg gtc tca

CDR2 agt att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg agg ggc

Fw3 cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat gtg cag atg aac agc ctg aga gcc
gag gac acg gcc gta tat tac tgt

CDR3 gcg aaa gga tat gtg ggg tgt agt ggt ggg aac tgc tac tcg ggg ggt gct ttt gat atc

Fw4 tgg ggc caa ggg aca gtg gtc acc gtc tct tca

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Рекомбинированная из генных сегментов:

IGLV3-21*01 F

IGLJ2*01 F

АМИНОКИСЛОТНАЯ:

Fw1 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC

CDR1 GENNIGSESVH

Fw2 WYQQKPGQAPVVVIY

CDR2 YDTRPS

Fw3 GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC

CDR3 QVWDNTSDHPVVF

Fw4 GGGTKLTVL

НУКЛЕОТИДНАЯ:

Fw1 tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tca gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc cgg att acc tgt

CDR1 ggg ggg aac aac att gga agt gaa agt gtt cac

Fw2 tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg gtg gtc atc tat

CDR2 tat gat acc gac cgg ccc tca

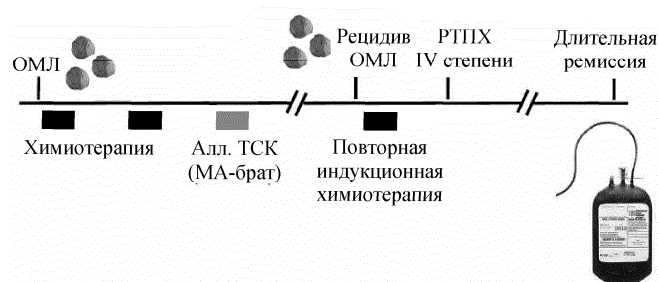
Fw3 ggg atc cct gag cgc ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac acg gcc acc ctg acc atc agc agg gtc
gaa gcc ggg gat gag gcc gac tat tac tgt

CDR3 cag gtg tgg gat aac act agt gat cat cct gtg gta ttc

Fw4 ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

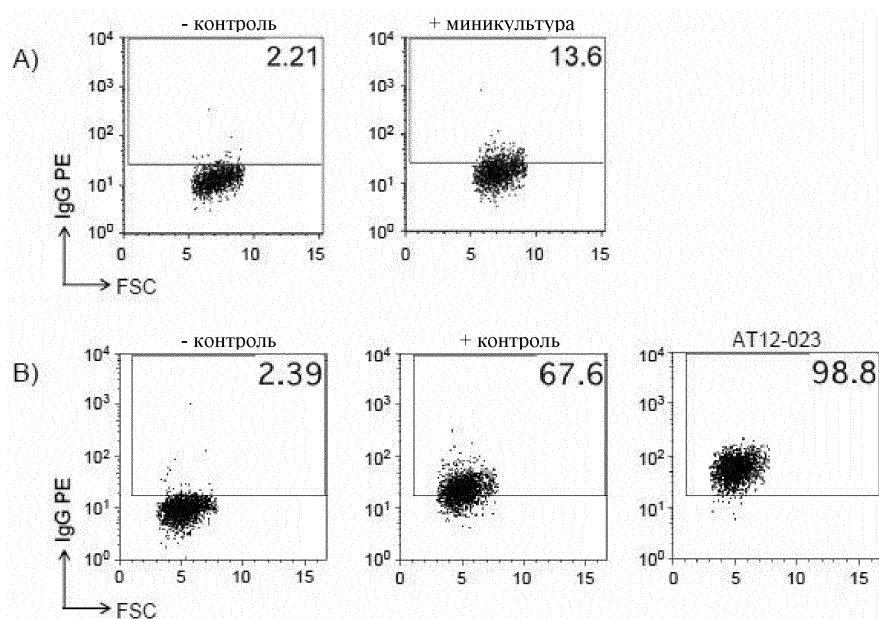
Фиг. 1

История болезни донора 59



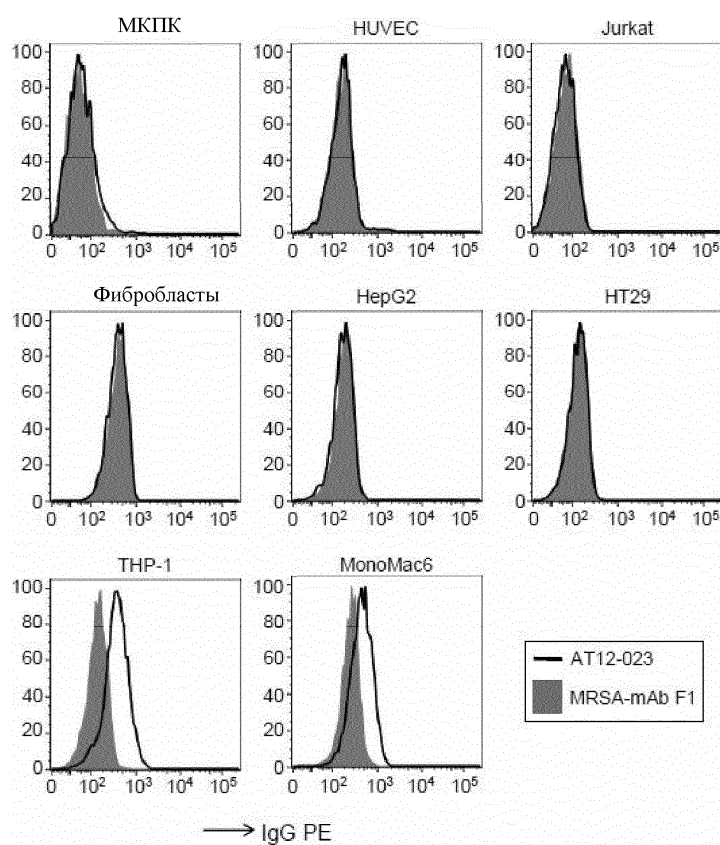
Фиг. 2

Связывание супернатанта миникультуры с клетками ОМЛ



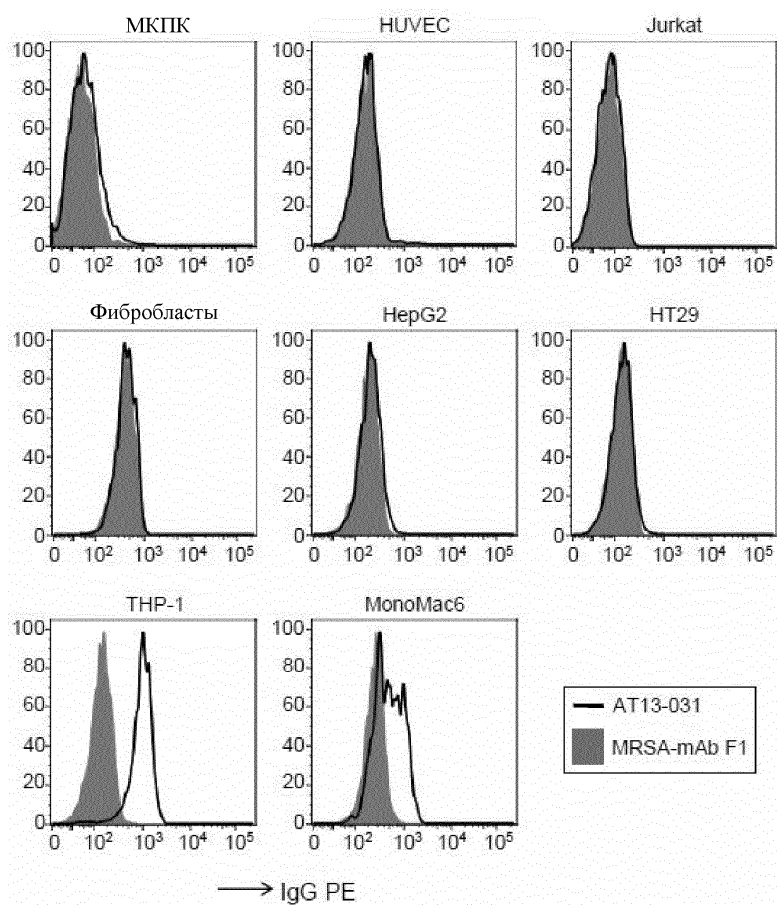
Фиг. 3

Антитела не связываются с посторонними линиями клеток



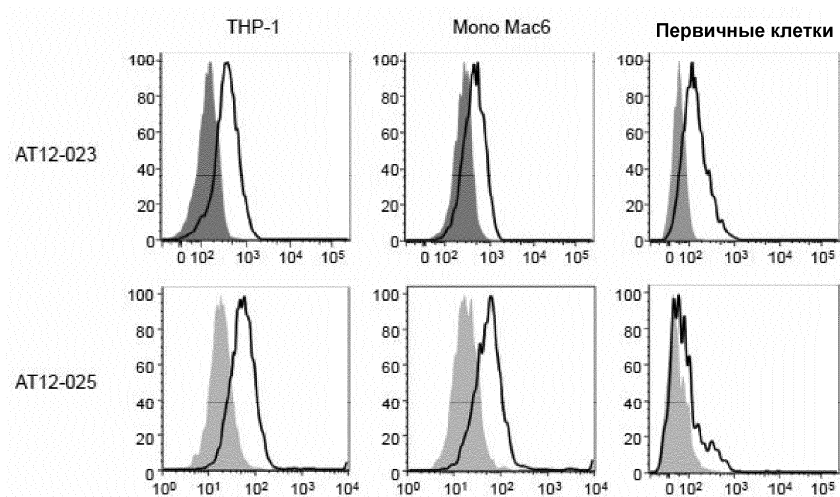
Фиг. 4А

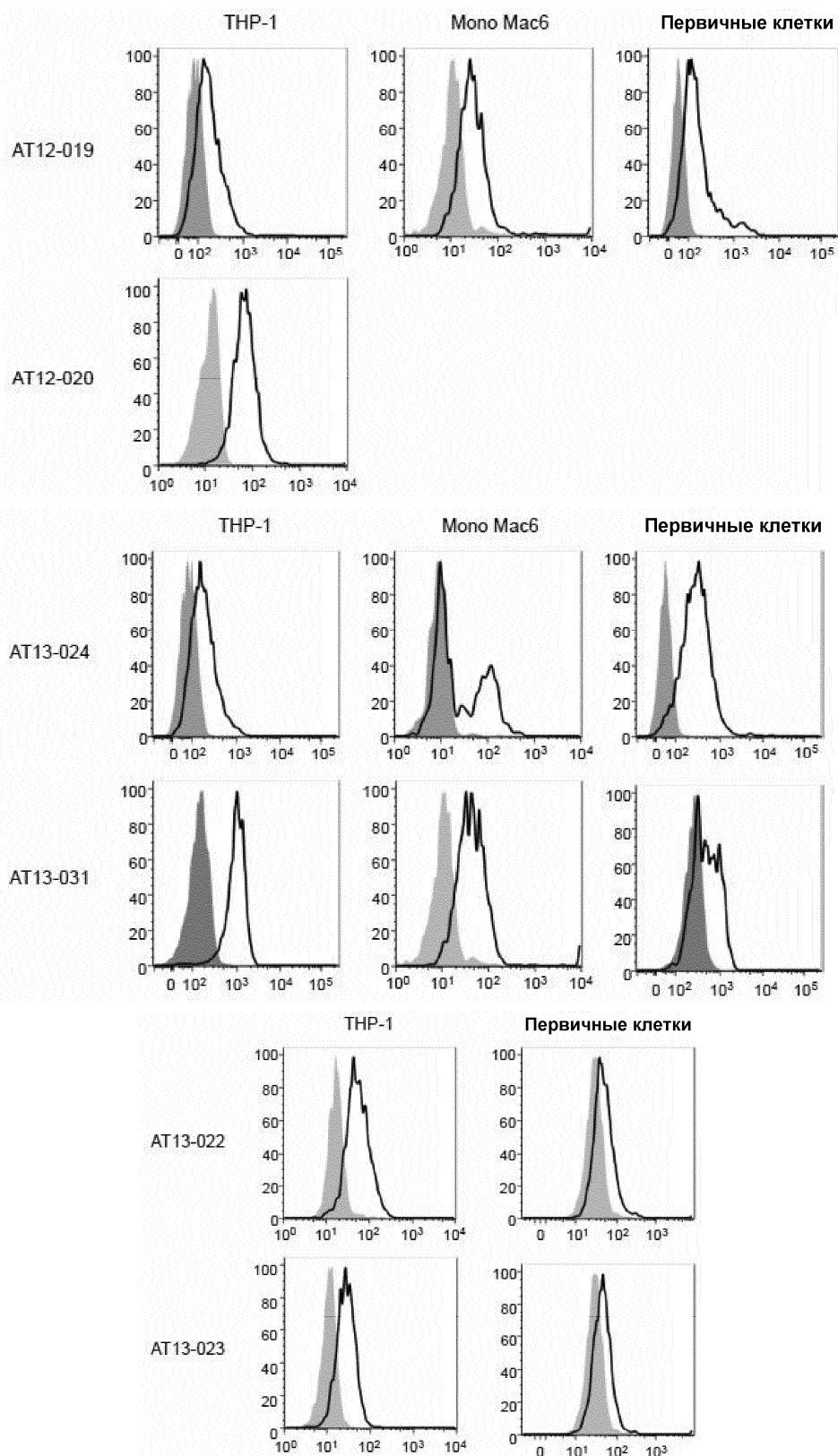
Антитела не связываются с посторонними линиями клеток



Фиг. 4В

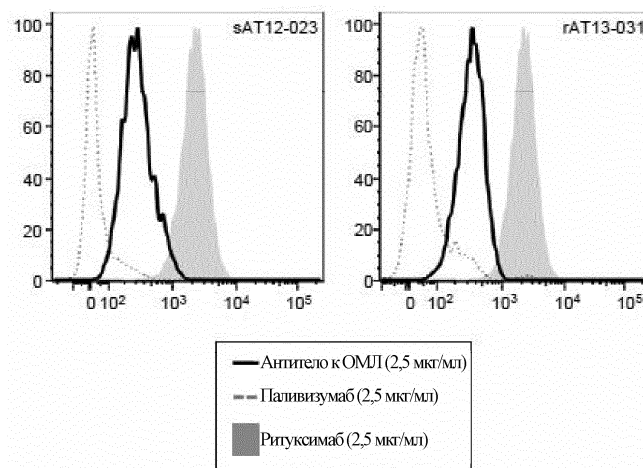
Клоны, полученные из донора 59



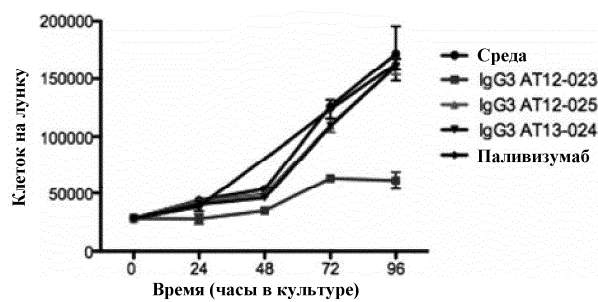


Фиг. 5

Связывание с В-неходжкинской лимфомой

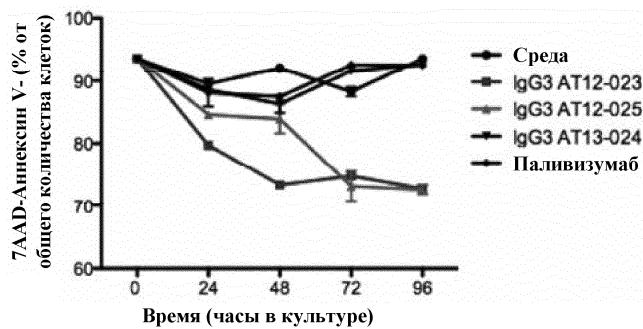


Фиг. 6

Активность *in vitro* AT12-023

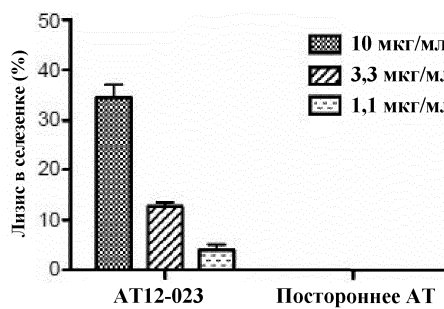
Фиг. 7

AT12-023 и AT12-025 уменьшают жизнеспособность ТНР-1



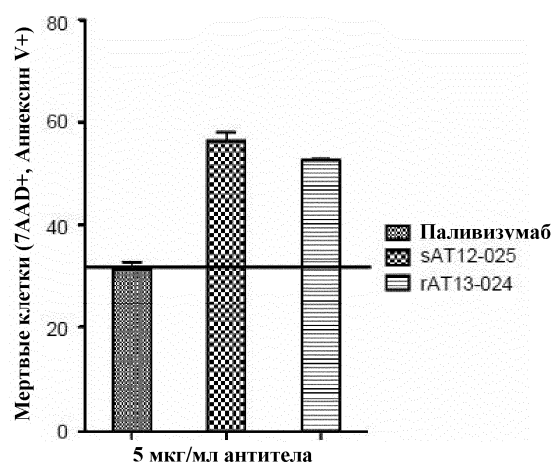
Фиг. 8

Цитотоксичность AT12-023 против ТНР-1



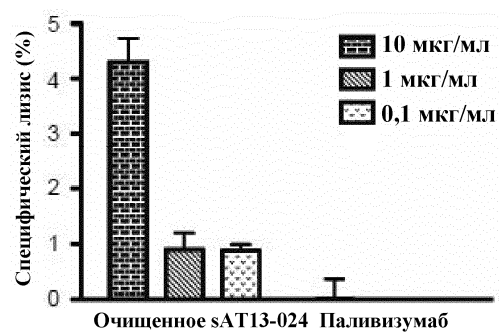
Фиг. 9

Уничтожение первичных бластных клеток (ОМЛ M5)



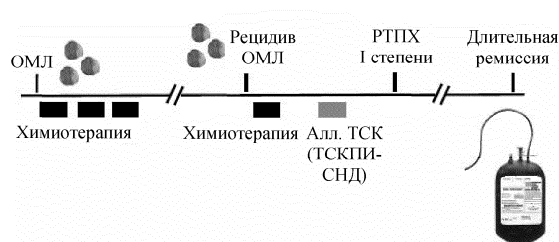
Фиг. 10А

Уничтожение первичных бластных клеток (ОМЛ M0)



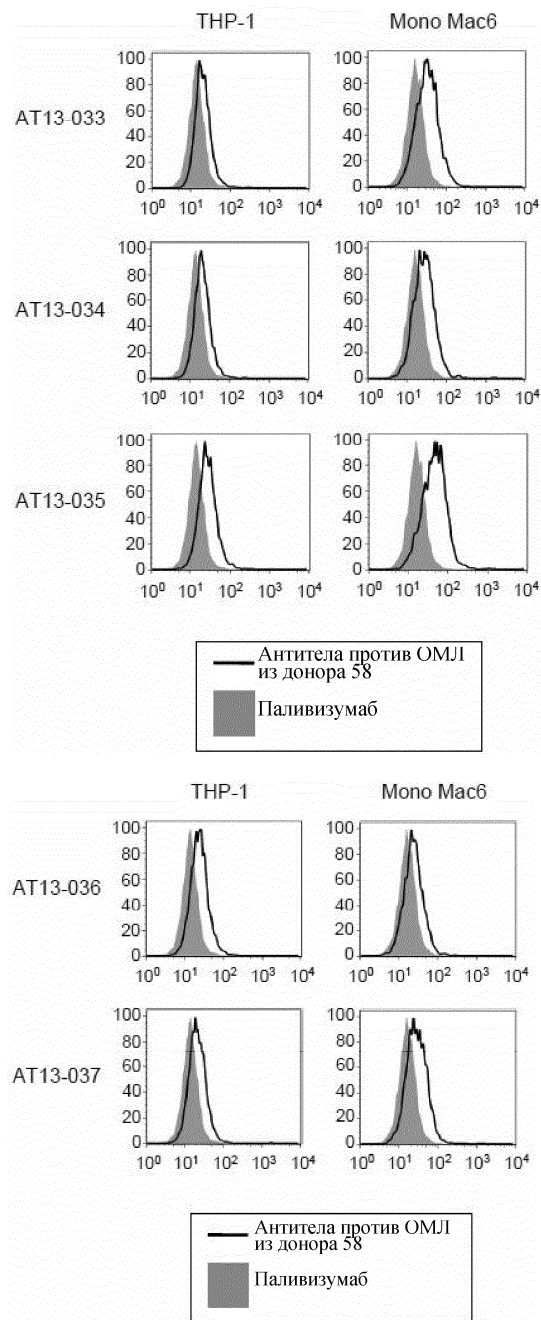
Фиг. 10В

История болезни донора 58



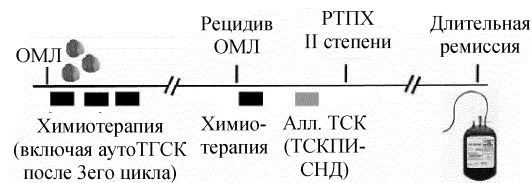
Фиг. 11

Антитела, полученные из донора 58

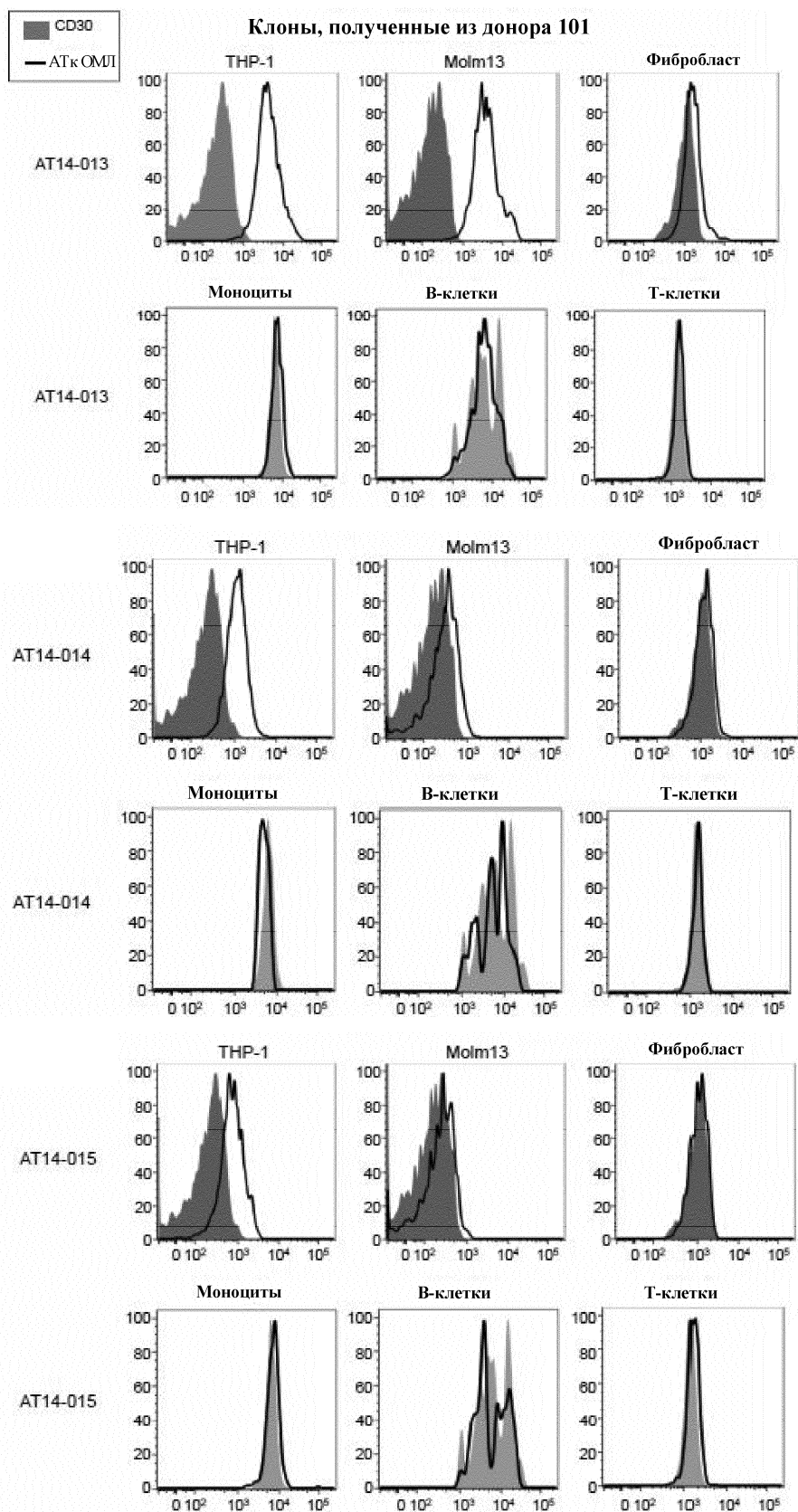


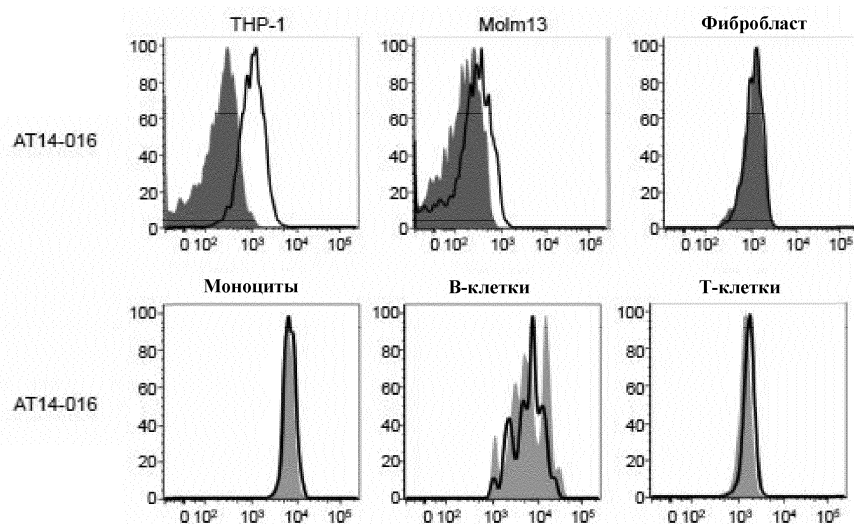
Фиг. 12

История болезни донора 101



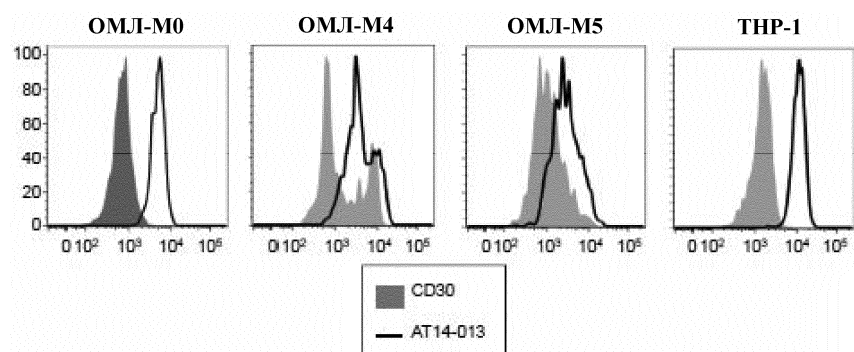
Фиг. 13





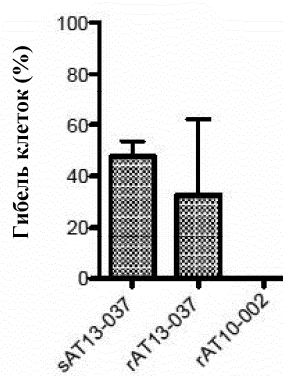
Фиг. 14

AT14-013 связывает первичные бластные клетки ОМЛ



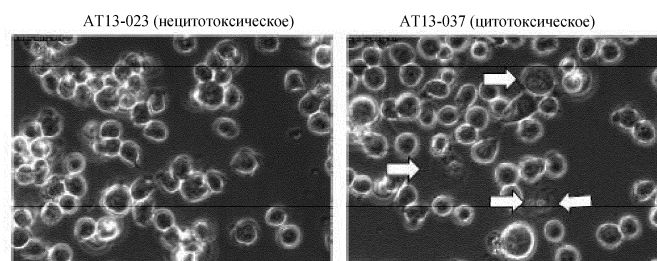
Фиг. 15

Уничтожение первичных бластных клеток (ОМЛ M5)



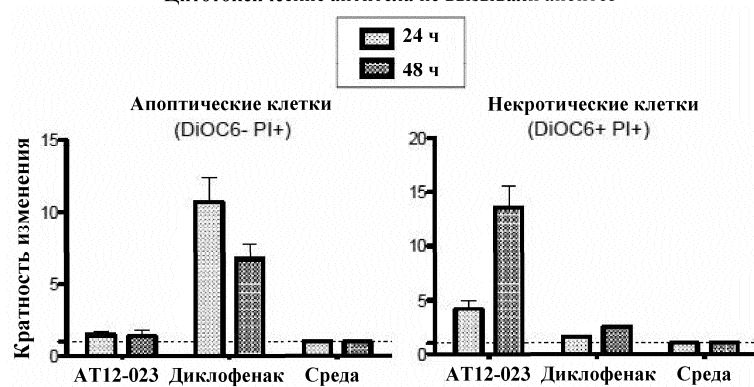
Фиг. 16

Цитотоксические ОМЛ-специфические антитела вызывали гибель клеток ТНР-1
(визуализация методом фазового контраста)



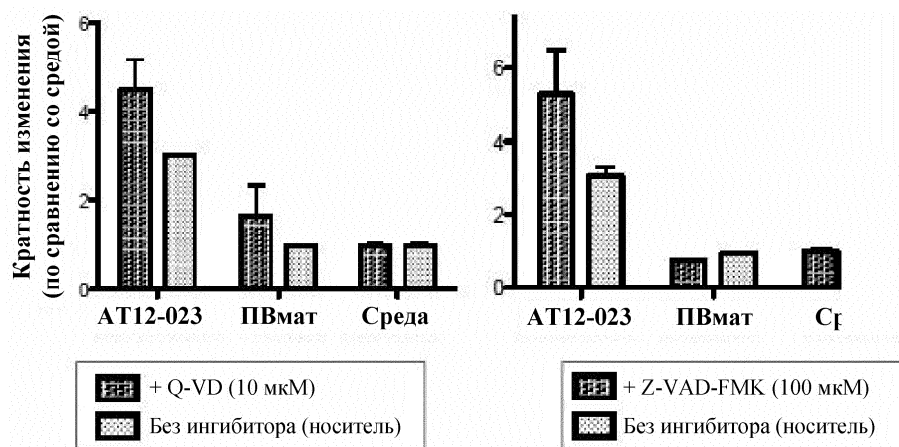
Фиг. 17А

Цитотоксические антитела не вызывали апоптоз



Фиг. 17В

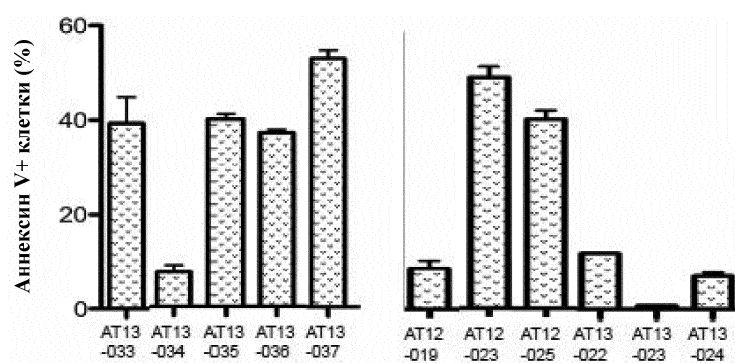
Ингибирование каспаз не блокирует гибель клеток



ПВмат: паливизумаб

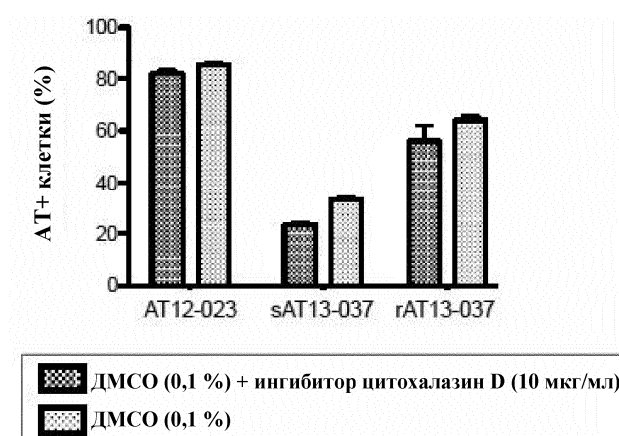
Фиг. 17С

Гибель клеток пассивна: также происходит при 4°C



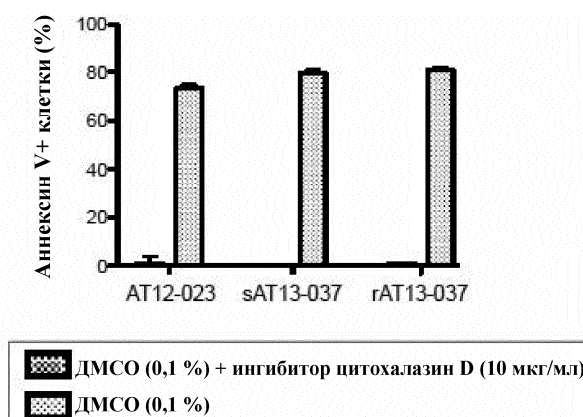
Фиг. 18

Цитохалазин D не предотвращает связывание указанных антител с мембраной целевой клетки



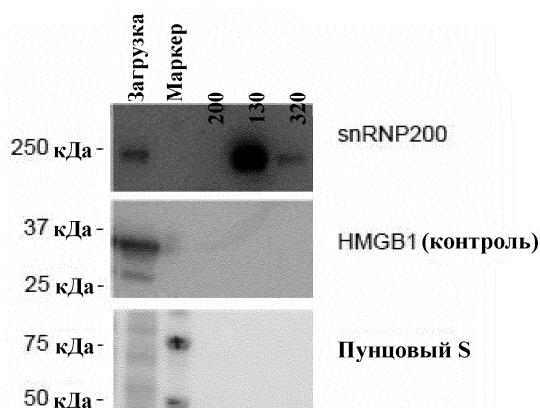
Фиг. 19А

Гибель клеток предотвращают путем стабилизации мембраны целевой клетки

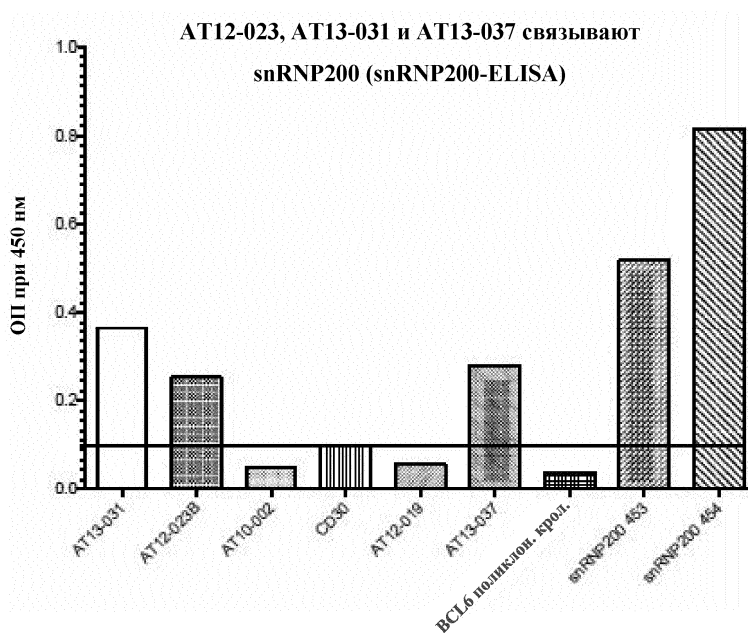


Фиг. 19В

snRNP200:
мишень AT12-023 и AT13-031

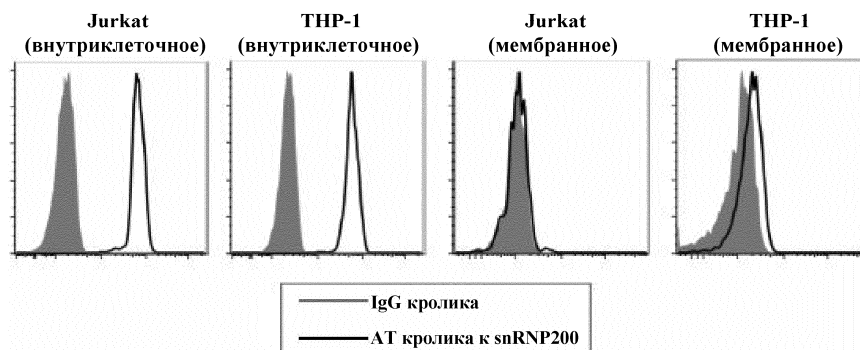


Фиг. 20А



Фиг. 20В

snRNP200 представляет собой ядерный белок, который не экспрессируется на мембране клеток, отличных от клеток ОМЛ



Фиг. 21

