(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2023.05.22
- (22) Дата подачи заявки 2021.03.11

(51) Int. Cl. *C07K 16/30* (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)

- (54) АНТИТЕЛА К SEA-MUC1
- (31) 62/991,077
- (32) 2020.03.18
- (33) US
- (86) PCT/IL2021/050269
- (87) WO 2021/186427 2021.09.23
- (71) Заявитель:

БИОМОДИФАИНГ, ЛЛС (US); РАМОТ АТ ТЕЛЬ-АВИВ ЮНИВЕРСИТИ ЛТД. (IL) **(72)** Изобретатель:

Рубинштайн Дэниел (умер), Врешнер Дэниел (IL)

- (74) Представитель: Нилова М.И. (RU)
- (57) В настоящем изобретении предложены выделенные моноклональные антитела, которые связываются с SEA-доменом MUC1. Настоящее изобретение также относится к применению указанных антител в терапевтических и диагностических способах.

АНТИТЕЛА К *SEA-MUC1*

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителам, специфически направленным против участка соединения альфа- и бета-цепей (который содержит домен SEA) MUC1, гликопротеина, присутствующего на клеточной поверхности клеток человека, и к способам и вариантам их применения в выявлении и лечении рака, а также в выявлении и лечении различных незлокачественных заболеваний и нарушений.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ссылки, которые считаются относящимися в качестве уровня техники к объекту изобретения, раскрытому в настоящем документе, перечислены ниже.

- [1] G. Rivalland, B. Loveland, P. Mitchell, Update on Mucin-1 immunotherapy in cancer: a clinical perspective, Expert Opin Biol Ther, 15 (2015) 1773—1787.
- [2] J. Taylor-Papadimitriou, J.M. Burchell, R. Graham, R. Beatson, Latest developments in MUC1 immunotherapy, Biochem Soc Trans, 46 (2018) 659—668.
- [3] J.M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy, J Mammary Gland Biol Neoplasia, 6 (2001) 355—364.
- [4] W. Fiedler, S. DeDosso, S. Cresta, J. Weidmann, A. Tessari, M. Salzberg, B. Dietrich, H. Baumeister, S. Goletz, L. Gianni, C. Sessa, A phase I study of PankoMab-GEX, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific MUC1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas, Eur J Cancer, 63 (2016) 55—63.
- [5] K. Ryuko, D.J. Schol, F.G. Snijdewint, S. von Mensdorff-Pouilly, R.J. Poort-Keesom, Y.A. Karuntu-Wanamarta, R.A. Verstraeten, K. Miyazaki, P. Kenemans, J. Hilgers, Characterization of a new MUC1 monoclonal antibody (VU-2-G7) directed to the glycosylated PDTR sequence of MUC1, Tumour Biol, 21 (2000) 197—210.

[6] M.A. Tarp, A.L. Sorensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat, Glycobiology, 17 (2007) 197—209.

WO 2021/186427

- [7] D. Zhou, L. Xu, W. Huang, T. Tonn, Epitopes of MUC1 Tandem Repeats in Cancer as Revealed by Antibody Crystallography: Toward Glycopeptide Signature-Guided Therapy, Molecules, 23 (6) (2018) 1326.
- [8] T. Kimura, O.J. Finn, MUC1 immunotherapy is here to stay, Expert Opin Biol Ther, 13 (2013) 35—49.
- [9] N.K. Ibrahim, K.O. Yariz, I. Bondarenko, A. Manikhas, V. Semiglazov, A. Alyasova, V. Komisarenko, Y. Shparyk, J.L. Murray, D. Jones, S. Senderovich, A. Chau, F. Erlandsson, G. Acton, M. Pegram, Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer, Clin Cancer Res, 17 (2011) 6822—6830.
- [10] D.B. Rubinstein, M. Karmely, R. Ziv, I. Benhar, O. Leitner, S. Baron, B.Z. Katz, D.H. Wreschner, MUC1/X protein immunization enhances cDNA immunization in generating anti-MUC1 alpha/beta junction antibodies that target malignant cells, Cancer Res, 66 (2006) 11247—11253.
- [11] E. Pichinuk, I. Benhar, O. Jacobi, M. Chalik, L. Weiss, R. Ziv, C. Sympson, A. Karwa, N.I. Smorodinsky, D.B. Rubinstein, D.H. Wreschner, Antibody targeting of cell-bound MUC1 SEA domain kills tumor cells, Cancer Res, 72 (2012) 3324—3336.
- [12] D.B. Rubinstein, M. Karmely, E. Pichinuk, R. Ziv, I. Benhar, N. Feng, N.I. Smorodinsky, D.H. Wreschner, The MUC1 oncoprotein as a functional target: immunotoxin binding to alpha/beta junction mediates cell killing, Int J Cancer, 124 (2009) 46—54.
- [13] D.V. Gold, Z. Karanjawala, D.E. Modrak, D.M. Goldenberg, R.H. Hruban, PAM4-reactive MUC1 is a biomarker for early pancreatic adenocarcinoma, Clin Cancer Res, 13 (2007) 7380—7387.

3

Подтверждение приведенных в данном документе выше ссылок не означает, что они каким-либо образом относятся к патентоспособности раскрытого в настоящем документе объекта изобретения.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гликопротеин MUC1 сверхэкспрессируется различными эпителиальными злокачественными новообразованиями у человека с высокой заболеваемостью и высокой смертностью, включая карциномы молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, яичника, легкого и толстой кишки, а также злокачественными плазматическими клетками множественной миеломы и миелогенными клетками острого миелогенного лейкоза. Вследствие его преимущественно высокой экспрессии злокачественными клетками, а также вследствие того, что он экспрессируется на клеточной поверхности, а следовательно представляет собой экспонированную молекулу, MUC1 был изучен как мишень для направленной терапии рака и как маркер прогрессирования заболевания [1, 2].

Структурно MUC1 представляет собой трансмембранный молекула гликопротеин (называемый MUC-TM). MUC-TM представляет собой гетеродимер, состоящий из внеклеточного домена, содержащего от 20 до 125 повторов последовательности длиной 20 аминокислот (называемой тандемным повтором с варьирующимся количеством звеньев, VNTR), трансмембранного домена и короткого цитоплазматического хвоста, опосредующего внутриклеточную передачу сигнала (см. фигуру 1A). Молекула MUC1 аутопротеолитически расщепляется внутри модуля SEA, высококонсервативного домена из 120 аминокислот. Это приводит к тому, что большая внеклеточная α-субъединица, содержащая границу массива тандемных повторов, сильным взаимодействием связана нековалентным c трансмембранной содержащей трансмембранный и цитоплазматический домены субъединицей, молекулы. Связывание α-цепи с β-цепью является прерывистым: α-цепь связывается с β-цепью периодическим образом. В то время как β-цепь все время остается на

4

клеточной поверхности, α -цепь c ее VNTR остается связанной c клеткой лишь прерывисто.

В литературе сообщалось о ряде антител к MUC1, подавляющее большинство которых направлено против высокоиммуногенного VNTR α цепи. В то время как антитела к VNTR могут успешно связывать MUC1+ клетки *in vitro*, отщепление α-цепи MUC1, содержащей VNTR, в периферический кровоток *in vivo* сильно снижает способность антител к VNTR клинически воздействовать на MUC1-экспрессирующие опухоли. Отщепление α-цепи от клеточной поверхности опухоли не только значительно уменьшает количество MUC1-мишеней для антител к α-цепи, но, кроме того, свободно циркулирующая α-цепь MUC1 *in vivo* на периферии способна связывать и подвергать нейтрализации антитела к VNTR или антитела к гликозилированному VNTR, таким образом ограничивая их способность даже достигать MUC1-экспрессирующей опухоли.

В качестве возможных путей преодоления потенциальной токсичности нацеливания на MUC1, экспрессируемый нормальными тканями, были предложены антитела, которые распознают специфические по отношению к раку усеченные Огликоформы VNTR, такие как антитела PankoMab-Gex, 5E5, SM3 и VU-2-G7. Однако ограничения в отношении нацеливания на α-цепь VNTR (фиг. 1A), а именно ее отщепления от клеточной поверхности и ее способности связывать терапевтически введенное антитело к MUC1, остаются [3-7].

Вследствие нестабильности их мишени, которая, как уже отмечалось, связывает опухолевую клетку лишь прерывисто по механизму периодического связывания, ни для одного антитела к VNTR MUC1 еще не доказана клиническая эффективность [4, 8, 9]. Следует отметить, что Fiedler et al. сообщали о 16 случаях стабильного заболевания в клиническом испытании специфического по отношению к раку антитела PankoMab-Gex к гликозилированному VNTR [4]. Однако данное исследование представляло собой испытание фазы I антитела к VNTR, где основной целью исследования была безопасность антитела, а не противоопухолевая эффективность, так что наблюдаемые случаи стабильного заболевания не могли быть верно интерпретированы. На

сегодняшний день ни антитела к VNTR MUC1, ни какие-либо антитела к α-цепи MUC1 никогда не демонстрировали эффективность против опухолей у людей.

В отличие от α-цепи и ее VNTR, SEA-домен MUC1, образованный взаимодействием α-субъединицы с внеклеточной частью β-субъединицы, представляет собой стабильный молекулярный фрагмент, зафиксированный на клеточной мембране. Антитела к участку соединения альфа/бета MUC1 раскрыты в Rubinstein et al и в Pichinuk et al [10—12].

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с SEA-доменом MUC1, где указанное антитело содержит:

- а. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 25, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 26, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 27, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 28, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 29, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 30, или
- b. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 31, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 32, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 33, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 34, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 35, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 36, или
- с. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 37, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 38, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 39, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID

- NO. 40, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 41, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 42, или
- d. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 43, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 44, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 45, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 46, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 47, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 48, или
- е. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 49, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 50, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 51, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 52, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 53, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 54, или
- f. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 55, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 56, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 57, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 58, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 59, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 60.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

а. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 1, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 2, или

- b. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 3, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 4, или
- с. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 5, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 6, или
- d. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 7, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 8, или
- е. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 9, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 10, или
- f. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 11, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 12.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит:

- а. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 13, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 14, или ее вариант, или
- b. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 15, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 16, или ее вариант, или
- с. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 17, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 18, или ее вариант, или
- d. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 19, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 20, или ее вариант, или
- е. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 21, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 22, или ее вариант, или
- f. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 23, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 24, или ее вариант.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело представляет собой полное мышиное антитело, полное химерное антитело, полное гуманизированное антитело (например, где части последовательности антитела получены из мышиной последовательности, и часть – из человеческой) или полное антитело человека.

В некоторых вариантах осуществления указанный его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fv, одноцепочечный Fv (scFv), одноцепочечный Fv-Fc (scFv-Fc), Fab', Fab, $F(ab')_2$ или $F(ab)_2$.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент позволяют идентифицировать SEA MUC1 иммуногистохимическом анализе, осуществляемом фиксированных на формальдегидом срезах из свежезамороженных (FF) тканей, и/или на тканях, заключенных в парафин и фиксированных формальдегидом (PEFF), и/или посредством анализа MUC1-экспрессирующих клеток человека посредством сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по настоящему изобретению, описанное в данном документе, или любой его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку-хозяина, трансфицированную вектором экспрессии по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает иммуноконъюгат, содержащий антитело по настоящему изобретению или его

антигенсвязывающий фрагмент и дополнительное цитотоксическое или терапевтическое средство.

В определенных вариантах осуществления указанное цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из алкилирующих лекарственных средств, антрациклинов, производных пиримидина, алкалоидов барвинка, фотодинамических лекарственных средств, платиносодержащих соединений, таксанов, ингибиторов топоизомеразы, средств, инактивирующих рибосомы, средств, которые индуцируют повреждение ДНК, ингибиторов тубулина, противомитотических средств, радиоизотопов, цитотоксических антител и бактериальных токсинов.

В одном варианте осуществления указанное цитотоксическое средство представляет собой экзотоксин Pseudomonas.

В одном варианте осуществления указанный иммуноконъюгат уменьшает объем опухоли при введении субъекту, имеющему рак.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает биспецифическое антитело, содержащее антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, связанные со вторым антителом, связывающим другой антиген-мишень.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую в качестве активного ингредиента выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, или иммуноконьюгат по настоящему изобретению, или биспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении заболевания или нарушения, например, рака.

В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения или облегчения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или иммуноконъюгата, или биспецифического антитела, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В варианте осуществления указанный способ дополнительно включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, дополнительного терапевтического средства.

В одном варианте осуществления указанные заболевание или нарушение представляют собой рак.

В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой MUC1экспрессирующий рак.

В некоторых вариантах осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из карциномы легкого, карциномы предстательной железы, карциномы молочной железы, карциномы яичника, карциномы толстой кишки, карциномы поджелудочной железы, множественной миеломы и острого миелогенного лейкоза.

Известно, что все перечисленные типы рака экспрессируют MUC1 на своих злокачественных клетках.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления указанное аутоиммунное или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из без ограничения ревматоидного артрита, псориатического артрита, системной красной волчанки, амилоидоза и аутоиммунного панкреатита.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное, но аномальное и клинически значимое состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконьюгат, или биспецифическое антитело, или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для применения в способе лечения или облегчения заболевания или нарушения, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества указанного выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, указанного иммуноконьюгата, указанного биспецифического антитела или указанной фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления указанный способ дополнительно включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, дополнительного терапевтического средства.

В одном варианте осуществления указанные заболевание или нарушение представляют собой рак.

В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой MUC1экспрессирующий рак.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное аномальное состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ диагностирования заболевания или нарушения у субъекта, где указанное заболевание или нарушение ассоциировано с экспрессией MUC-1, при этом указанный способ включает:

а. приведение в контакт биоптата, полученного от указанного пациента, с по меньшей мере одним выделенным моноклональным

антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и

b. выявление указанного выделенного моноклонального антитела или любого его антигенсвязывающего фрагмента;

где выявление клеток, сверхэкспрессирующих SEA MUC1, в биоптате указывает на то, что у субъекта диагностировано заболевание или нарушение.

В одном варианте осуществления указанные заболевание или нарушение представляют собой рак.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное клинически значимое аномальное состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.

В одном варианте осуществления указанное выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены выявляемой меткой.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ визуализации заболевания или нарушения, при этом указанный способ включает:

- а. введение субъекту по меньшей мере одного выделенного моноклонального антитела к SEA MUC1 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены выявляемой меткой с помощью радиоизотопа или визуализируемого средства (т. е. средства, которое может быть визуализировано, например, посредством сканирования), и
- b. визуализирование указанного выделенного моноклонального антитела к SEA MUC1, помеченного выявляемой меткой, или любого его антигенсвязывающего фрагмента;

14

где выявление клеток и/или тканей, помеченных указанным изотопом или указанным визуализируемым средством, указывает на наличие, и/или локализацию, и/или степень, и/или наличие метастазов указанного заболевания или нарушения у указанного субъекта.

В одном варианте осуществления указанные заболевание или нарушение представляют собой рак.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

В одном варианте осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное аномальное состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Для лучшего понимания объекта настоящего изобретения, раскрытого в данном документе, и иллюстрирования того, как его можно осуществить на практике, далее только в качестве неограничивающего примера будут описаны варианты осуществления со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

Фигуры 1A—1C представляют собой схематические представления MUC1-TM, изоформы MUC1-X и рекомбинантных молекул MUC1-X. (1A): переходя от N (N) к Сконцу (С), MUC1-TM состоит из N-концевого сигнального пептида, за которым следует сегмент длиной 30 аминокислот (N30), ведущий к последовательностям, которые на N-конце и C-конце фланкируют массив тандемных повторов с варьирующимся количеством звеньев (VNTR). Далее следует область, общая как для изоформы MUC1-X (1B), так и для растворимого внеклеточного домена MUC1 X, MUC1-Xex (1C). Внеклеточный домен β-субъединицы состоит из 58 аминокислот, N-концу непосредственно примыкающих К трансмембранного (TM) цитоплазматического (СТ) доменов. Модуль SEA содержит 120 аминокислот и состоит как из α-, так и из β-субъединиц. Рекомбинантный растворимый белок MUC1-Xex (1C)

15

содержит сигнальный пептид, N-концевую последовательность из 30 аминокислот и модульные области SEA.

Фигуры 1D—1К представляют собой графики, демонстрирующие результаты проточных цитометрических анализов антитела DMB5F3 к SEA MUC1. Клетки DA3, стабильно трансфицированные MUC1-TM (1D), или нетрансфицированные клетки DA3 (1E), взаимодействовали с mAb DMB5F3 к SEA MUC1, а затем с FITC-коньюгатом (кривые отмечены стрелкой). Линия Colo357 MUC1+ клеток рака поджелудочной железы человека (1F) и MUC1+ клетки T47D и ZR75 рака молочной железы (1H, 1J) взаимодействовали с DMB5F3 (кривые отмечены стрелкой). На всех четырех панелях кривые, не отмеченные стрелкой, представляют клетки, связанные только с вторичным антителом, а кривые, отмеченые стрелкой, представляют клетки, взаимодействовавшие как с DMB5F3, так и со вторичным антителом. Связывание антитела к SEA MUC1 с MUC1+ клетками полностью исключалось присутствием растворимого белка MUC1-Xex (нейтрализованное связывание, опосредованное MUC1-Xex, обозначено незакрашенными стрелками на 1G, 1I и 1K).

Фигура 2 демонстрирует аминокислотные последовательности вариабельных областей моноклональных антител к участку соединения α-β SEA MUC1. Для всех последовательностей представлена следующая общая структура: лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Фигуры 3A—3N демонстрируют архитектуру экспрессии MUC1, выявленную с помощью антитела DMB5F3 к участку соединения α-β SEA MUC1. Фигуры 3A—3D: заключенные в парафин микрочипы нормальной (3A и 3B) и злокачественной ткани поджелудочной железы (3C и 3D) окрашивали с помощью DMB5F3. DMB5F3 сильно окрашивал злокачественные клетки почти кольцеобразным образом (3C и 3D), в то время как в нормальных ацинарных клетках поджелудочной железы наблюдалась только слабая апикальная положительность (3A (i), черные стрелки). Добавление белка MUC1-Хех вместе с DMB5F3 конкурентно нейтрализовало окрашивание (3B), что указывало на специфичность связывания DMB5F3. Фигуры 3E—3H: заключенные в парафин нормальные ткани молочной железы (3E и 3F) и злокачественные инвазивные

аденокарциномы протоков молочной железы (3G и 3H) от 4 пациентов окрашивали с помощью антитела DMB5F3. Фигуры 3I—3N: образцы биопсии карциномы молочной железы от 6 пациентов, каждый из которых состоит из опухоли, окруженной прилегающей незлокачественной тканью, окрашенной с помощью DMB5F3. В каждом образце DMB5F3 сильно окрашивал эпителиальные клетки инвазивного рака почти кольцеобразным образом (темное окрашивание). Напротив, прилегающие нормальные железистые эпителиальные клетки демонстрировали только слабую апикальную положительность (черные стрелки).

Фигуры 4A—4О демонстрируют IHC-окрашивание тканевых микрочипов с помощью антитела к участку соединения α-β SEA MUC1.

Фигуры 4A—4L: IHC карциномы легкого, предстательной железы, толстой кишки и молочной железы с помощью антитела к участку соединения α-β SEA MUC1. Заключенные в парафин микрочипы карцином легкого, предстательной железы, толстой кишки и молочной железы окрашивали с помощью антитела DMB5F3, и репрезентативные срезы показаны на фигурах 4A, 4D, 4G и 4J соответственно. Более высокое увеличение показано на фигурах 4В, 4Е, 4Н и 4К, а треугольники на фигурах 4A, 4D, 4G и 4J и на фигурах 4B, 4E, 4H и 4K служат для ориентации увеличенной области. Окрашивание с помощью антитела DMB5F3 снова исчезало в присутствии 100 мкг/мл конкурирующего растворимого белка MUC1-Xex, что свидетельствует о специфичности антитела DMB5F3 (не показано). Контрольное окрашивание неспецифическим мышиным иммуноглобулином показано на фигурах 4C, 4F, 4I и 4L. DMB5F3 окрашивало Антитело сильно злокачественные клетки почти кольцеобразным образом. Линии в нижней части фигур 4A, 4D, 4G и 4J (со стрелками на обоих концах линии) и в нижней части фигур 4В, 4Е, 4Н и 4К (с полностью закрашенными кругами на обоих концах линии) обозначают 200 микрон и 100 микрон соответственно. Темноокрашенный преципитат указывает на белок MUC1 (сравните фигуры 4A, 4B, 4D, 4E, 4G, 4H, 4J и 4K с фигурами 4C, 4F, 4I и 4L). Ткани на фигурах 4A, 4D, 4G и 4J происходят из патологической аденокарциномы легкого 2 степени, патологической аденокарциномы предстательной железы 5 степени, патологической аденокарциномы толстой кишки 3 степени и инфильтрирующей карциномы протоков молочной железы соответственно.

4М—40: подтверждающее *IHC*-окрашивание нормальных злокачественных тканей поджелудочной железы с помощью антитела к участку соединения а-β SEA MUC1. Чтобы подтвердить высокую экспрессию и измененную MUC1 В карциноме молекулярную архитектуру поджелудочной дополнительные злокачественные образования поджелудочной железы окрашивали с помощью антитела к SEA MUC1 и сравнивали с нормальной тканью. Заключенные в парафин микрочипы нормальной (фигура 4M) и злокачественной поджелудочной железы (фигуры 4N и 4O) окрашивали с помощью антитела DMB5F3. Окрашивание подтвердило слабую апикальную положительность в нормальных ацинарных клетках поджелудочной железы (фигура 4М), тогда как злокачественные клетки постоянно окрашивались почти кольцеобразным образом (фигуры 4N и 4O).

5A-5D представляют собой Фигуры графики, демонстрирующие сравнительную цитоцидную активность chDMB5F3, эрбитукса и герцептина, где каждый из трех был связан белком ZZ с экзотоксином PE38 Pseudomonas. полученных иммунотоксина ZZ-PE38 взаимодействовали с линиями опухолевых клеток человека Т47D, KB, A431 и N87 (фиг. 5A—5D соответственно). Иммунотоксин chDMB5F3: ZZ-PE38 (кривая с точками в виде овалов), эрбитукс: ZZ-PE38 (кривая с точками в виде ромбов) и герцептин: ZZ-PE38 (график с точками в виде прямоугольников) взаимодействовали с клетками при различных концентрациях антител (ось х). Жизнеспособность клеток оценивали посредством анализа с применением щелочной фосфатазы (ось у). Общую (100%) жизнеспособность определяли в контрольных лунках, в которые добавляли только токсин ZZ-PE38 (5 нМ).

Фигуры 6A—6D демонстрируют цитотоксичность chDMB5F3 *in vivo*: ZZ-PE38 в опухоли поджелудочной железы человека, ксенотрансплантированной «голым» мышам. Фигура 6A: «голым» мышам инокулировали MUC1⁺ опухоль Colo357 поджелудочной железы (день 0). Затем мышей с ксенотрансплантатом разделяли на

три группы: в дни 1, 6, 9, 14, 22 и 29 группа А получала chDMB5F3: ZZ-PE38, группа В получала неспецифический изотипически сходный IgG-ZZ: PE38 (5 мкг на инъекцию), в то время как группа С получала только буфер Hepes; все введения были іv (временные точки указаны стрелками). Объем опухоли измеряли еженедельно в течение периода инъекции и до дня 38 в трех группах: мыши, получавшие иммунотоксин chDMB5F3: ZZ-PE38, мыши, получавшие неспецифический изотипически сходный hIgG-ZZ: PE38, и мыши, получавшие буфер Hepes. Объем опухоли в мм³ отображается на оси у, а на фотографиях показаны опухоли у контрольных мышей, получавших Нерез (фигура 6В), и у мышей, получавших иммунотоксин chDMB5F3: ZZ-PE38 (фигура 6C). Фигура 6D: для количественной оценки периода полужизни иммунотоксина DMB5F3-ZZ-P38 к SEA MUC в сыворотке крови мышам вводили однократную дозу 5 мкг и уровни в сыворотке крови измеряли посредством ELISA с серийным разбавлением. По сравнению с днем 7 (7d) уровни chDMB5F3 в сыворотке крови в дни 14 (14d) и 28 (28d) были снижены в два и в четыре раза соответственно.

На фигурах 7А—7D показана цитотоксичность иммунотоксина chDMB5F3: ZZ-PE38 *in vivo* с демонстрацией абляции MUC1+ ксенотрансплантата рака поджелудочной железы у мышей SCID. Фигура 7А: мышей SCID подкожно инокулировали клетками Colo357 рака поджелудочной железы человека в день 0 и разделяли на три группы: группа [1] получала 5 мкг иммунотоксина chDMB5F3: ZZ-PE38, группа [2] получала 5 мкг конъюгата неспецифический изотипический сходный Ig человека: ZZ-PE38 и группа [3] получала буфер Нерев. Всем мышам с ксенотрансплантатом из трех групп осуществляли инъекцию в дни 1, 4, 8, 11, 16, 24, 31 и 38. Объемы опухолей сравнивали не более 49 дней после инокуляции клетками. Гистограммы представляют средние объемы опухоли для каждой группы, в то время как каждая звездочка представляет значение для отдельной мыши. Ось у слева представляет объем опухоли (в мм³) для групп 1 и 2; ось у справа представляет объемы опухоли в группе 3 (группа, получавшая буфер Нерев), расширенные до 500 мм³, чтобы включить большие объемы опухоли в контрольной группе, получавшей Нерев. Две

19

точки в группе 3 со значениями выше точки 500 мм³ представляют собой объемы опухоли 705 мм³ и 1008 мм³. На фигурах 7В—7D показаны репрезентативные мыши из каждой группы вместе с объемами их опухолей по завершении 49-дневного периода измерения опухолей. Фигура 7В: мыши, которые получали иммунотоксин chDMB5F3: ZZ-PE38, фигура 7С: мыши, которые получали конъюгат неспецифический Ig человека: ZZ-PE38, и фигура 7D: мыши, которые получали только буфер Hepes.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает последовательности моноклональных антител (mAb), направленных против участка соединения α - β SEA MUC1 (называемого доменом SEA), характеризующихся сильной противораковой активностью *in vivo*.

Настоящее изобретение предусматривает последовательности антител, направленных против SEA-домена MUC1, называемых в данном документе DMB5F3, DMB7F3, DMB4B4, DMB10F10, DMB4F4, DMB10B7, DMB13D11 и DMC209.

Как показано в приведенных ниже примерах, иммуногистохимическое окрашивание с помощью mAb, обозначенного как DMB5F3, клеток из ряда злокачественных новообразований, включая карциномы легкого, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки и поджелудочной железы, позволило выявить количественные и качественные различия между экспрессией MUC1 в норме по сравнению со злокачественными клетками: DMB5F3 сильно окрашивало злокачественные клетки почти кольцеобразным образом, тогда как MUC1 в нормальной ткани поджелудочной железы и молочной железы демонстрировал только слабый апикальный паттерн положительности в клетках протоков/ацинарных клетках. Химерное (мышиное-человеческое) DMB5F3, связанное с ZZ-PE38 (ZZ представляет собой IgG-связывающий белок, слитый с экзотоксином PE38 Pseudomonas), индуцировало сильную цитотоксичность в отношении MUC1+ злокачественных клеток *in vitro*. Интенсивность уничтожения клеток конструкцией экзотоксина антитело DMB5F3 к MUC1:белок ZZ-PE38 коррелировала с уровнем MUC1, экспрессируемым клеткой-мишенью, что свидетельствует о том, что пороговый

уровень экспрессииMUC1 требуется для уничтожения Чтобы клеток. продемонстрировать эффект антитела DMB5F3 в отношении уничтожения опухоли *in* vivo MUC1+ клетки Colo357 рака поджелудочной железы человека ксенотрансплантировали «голым» мышам и мышам SCID, а затем мышей обрабатывали иммунокомплексом chDMB5F3: ZZ-PE38. В обеих моделях трансплантата («голые» мыши и мыши SCID) chDMB5F3: ZZ-PE38 демонстрировал значительную противоопухолевую активность *in vivo*, подавляя до 90% объема опухоли у мышей SCID по сравнению с сопутствующими контролями.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает антитела для применения в лечении MUC1-экспрессирующих злокачественных новообразований.

Таким образом, в первом из аспектов настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с SEA-доменом MUC1.

Термин «SEA-домен MUC1» (также называемый в данном документе как «модуль SEA MUC1») относится к высококонсервативному домену из 120 аминокислот, образованному взаимодействием α-субъединицы MUC1 с внеклеточной частью β-субъединицы MUC1. Таким образом, он расположен в участке соединения α-β MUC1 и представляет собой стабильный фрагмент, зафиксированный на клеточной мембране; он никогда не отщепляется от клеточной поверхности (см. фигуры 1А, 1В и 1С, области, обозначенные овалами).

SEA-домен, как известно из уровня техники, определяется как область, расположенная между аминокислотами 264 и 384 белка MUC1 человека (UniProtKB – A0A087X2A4 (A0A087X2A4_HUMAN).

Трансмембранный гликопротеин MUC1 (MUC-TM) представляет собой гетеродимер, состоящий из внеклеточного домена, содержащего от 20 до 125 повторов последовательности длиной 20 аминокислот (называемой тандемным повтором с варьирующимся количеством звеньев, VNTR), трансмембранного домена и короткого цитоплазматического хвоста, опосредующего внутриклеточную передачу сигнала.

MUC1 аутопротеолитически расщепляется внутри модуля SEA. Это приводит к тому, что большая внеклеточная α -субъединица, содержащая границу массива тандемных повторов, связана сильным нековалентным взаимодействием с трансмембранной β -субъединицей, содержащей трансмембранный и цитоплазматический домены молекулы.

В частности, настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с SEA-доменом MUC1, где указанное антитело содержит:

- а. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 25, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 26, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 27, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 28, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 29, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 30, или
- b. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 31, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 32, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 33, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 34, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 35, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 36, или
- с. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 37, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 38, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 39, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 40, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 41, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 42, или
- d. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 43, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 44, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 45, и определяющий

комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 46, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 47, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 48, или

- е. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 49, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 50, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 51, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 52, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 53, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 54, или
- f. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 55, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 56, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 57, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 58, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 59, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 60.

Как указано выше, настоящее изобретение предусматривает выделенные моноклональные антитела, которые связываются с SEA-доменом MUC1. Термин «антитело» относится к полипептиду, кодируемому геном иммуноглобулина, который специфически связывает и распознает антиген, в данном случае SEA-домен MUC1.

Термины «моноклональное антитело», «моноклональные антитела» или «мАв», определенные в данном документе, относятся к популяции гомогенных антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, являющихся идентичными, за исключением возможно встречающихся в природе редких мутаций. Моноклональные антитела направлены против одного антигенного участка (эпитопа).

Моноклональные антитела могут быть получены и очищены любым способом, известным из уровня техники. Например, моноклональные антитела могут быть получены из В-клеток, взятых из селезенки или лимфатических узлов иммунизированных животных (например, кроликов, крыс, мышей или обезьян).

23

Очистку моноклональных антител можно выполнять с применением любого способа, известного из уровня техники, например, посредством аффинной хроматографии, а именно с применением колонки для аффинной хроматографии, с которой коньюгирован специфический эпитоп (или антиген). В качестве альтернативы очистка антител может быть основана на применении колоночной хроматографии с белком А и белком G.

Иллюстративная структурная единица антитела предусматривает тетрамер, известный из уровня техники. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну «*пескую цепь*» и одну «*тажелую цепь*». N-конец каждой цепи определяет вариабельную область из приблизительно 100—110 или больше аминокислот, отвечающую прежде всего за распознавание антигена (эпитопа).

Таким образом, термины «вариабельная область тяжелой цепи» (V_H) и «вариабельная область легкой цепи» (VL) относятся к этим тяжелым и легким цепям Более конкретно, вариабельная область соответственно. подразделяется гипервариабельную и каркасную (FR) области. Гипервариабельные области характеризуются высоким соотношением различных аминокислот в определенном положении по отношению к наиболее распространенной аминокислоте в данном положении. Четыре области FR, которые характеризуются более стабильными аминокислотными последовательностями, отделяют гипервариабельные области. Гипервариабельные области непосредственно контактируют с частью поверхности антигена. По этой причине гипервариабельные области в данном документе называются «определяющими комплементарность участками» или «CDR», при в тяжелой цепи антитела («определяющий ЭТОМ CDR расположены как комплементарность участок тяжелой цепи»), так и в легкой цепи антитела («определяющий комплементарность участок легкой цепи»).

Как легкие, так и тяжелые цепи от N-конца к C-концу содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR отвечают прежде всего за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно обозначаются как CDR1, CDR2 и CDR3,

24

нумеруются последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируются по цепи, в которой расположена CDR.

Таким образом, определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3 относятся определяющим комплементарность К трем участкам, начинающимся с N-конца тяжелой цепи антитела (также называемым в данном определяющим комплементарность участком тяжелой цепи), документе определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3 относятся к трем определяющим комплементарность участкам, начинающимся с N-конца легкой цепи антитела (также называемым в данном документе определяющим комплементарность участком легкой цепи).

Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие фрагменты выделенного моноклонального антитела к SEA-домену MUC1 по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин *«антигенсвязывающий фрагмент»* относится к фрагменту полноразмерного антитела, который сохраняет специфичность связывания антитела с SEA-доменом MUC1. Антигенсвязывающий фрагмент охватывает без ограничения Fv, одноцепочечный Fv (scFv), одноцепочечный Fv-Fc (scFv-Fc), Fab', Fab, F(ab')₂ и F(ab)₂.

Такие фрагменты могут быть получены любым способом, известным из уровня техники, например, посредством протеолитического расщепления с применением ферментов, таких как папаин (с получением фрагментов Fab) или пепсин (с получением фрагментов $F(ab')_2$).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из молекулы одноцепочечного Fv-Fc (scFv-Fc), одноцепочечного Fv (scFv), Fv, Fab', Fab, F(ab') $_2$ и $_2$ Г(ab) $_2$.

25

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с SEA-доменом MUC1.

Как показано в примере 5 ниже, введение иммунокомплекса, содержащего антитело DMB5F3 и цитотоксический фрагмент, значительно уменьшало объем опухоли в *in vivo* модели рака у мышей. Следовательно, в конкретных вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты эффективны в уменьшении объема опухоли у субъекта.

Под термином *«уменьшение»* объема опухоли в контексте настоящего изобретения подразумевается, что выделенное моноклональное антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент уменьшают размер опухоли, измеренный любым способом, известным из уровня техники, на по меньшей мере приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100% по сравнению с размером опухоли в отсутствие антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления термин «снижение» означает снижение на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 представляет собой мышиное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.

Термин «химерное антитело», используемый в данном документе, относится к антителу, которое содержит антигенсвязывающие вариабельные домены из одного

26

вида (например, вариабельные домены мышиного антитела) и константные домены из другого вида (например, человека).

Термин «гуманизированное антитело», используемый в данном документе, относится к антителу, которое основано на структуре из вида, отличного от человека (например, мыши), аминокислотная последовательность которого была модифицирована для повышения ее сходства с вариантами антител, продуцируемыми у людей естественным образом.

Термин «антитело человека», используемый в данном документе, относится к антителу, которое содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или было получено с применением любой из методик получения человеческих антител, известных из уровня техники. Это определение специально исключает гуманизированное антитело, которое содержит антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения.

Способы получения химерных, гуманизированных и человеческих антител хорошо известны из уровня техники.

Для получения больших количеств антитела (химерного, гуманизированного или человеческого) может быть получена стабильная линия клеток, экспрессирующая антитело, посредством трансфекции клеток (например, клеток СНО) вектором экспрессии Ig, содержащим как тяжелые, так и легкие цепи антитела. Затем антитела могут быть получены, например, в биореакторной системе. Антитела могут быть очищены до клинической степени чистоты с применением общепринятых способов очистки моноклональных антител. Клоны, продуцирующие высокие уровни антитела к SEA-домену MUC1, затем можно отбирать и размножать на основе уровней антитела в надосадочной жидкости при тестировании любым способом, известным из уровня техники, например, посредством ELISA-анализа, специфического в отношении SEA-домена MUC1. Основной клеточный банк, разработанный для конкретного клона, может служить исходным материалом для выращивания всех партий клинической степени чистоты.

27

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело SEA-домену MUC1 или К антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 1, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 2.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело К SEA-домену MUC1 антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоят из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 3, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 4.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоят из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности

28

нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 5, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 6.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает MUC1 моноклональное антитело К SEA-домену или выделенное антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоят из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 7, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 8.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 9, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий

29

фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 11, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90% или больше идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 12.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает моноклональное антитело К SEA-домену MUC1 или выделенное его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 13, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 14, или ее вариант.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает SEA-домену MUC1 выделенное моноклональное антитело К его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вариабельную область содержат тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 15, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 16, или ее вариант.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой содержащую цепи, аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 17, или ее вариант, и вариабельную область легкой содержащую аминокислотную цепи, последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 18, или ее вариант.

30

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело К SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 19, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи. содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 20, или ее вариант.

В изобретение определенных вариантах осуществления настоящее предусматривает выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий вариабельную область фрагмент содержат тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 21, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 22, или ее вариант.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает SEA-домену MUC1 выделенное моноклональное антитело К или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вариабельную область содержат тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 23, или ее вариант, и вариабельную область легкой содержащую аминокислотную цепи, последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 24, или ее вариант.

В других вариантах осуществления выделенное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой SEA-домену MUC1 выделенное моноклональное антитело К или его антигенсвязывающий фрагмент, указанное содержит где антитело шесть последовательностей CDR, обозначенных под SEQ ID No. 25—30, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO. 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную

31

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 14.

В других вариантах осуществления выделенное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой выделенное моноклональное антитело К SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, указанное где антитело содержит шесть последовательностей CDR, обозначенных под SEQ ID No. 31—36, и вариабельную содержащую аминокислотную область тяжелой цепи, последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO. 15, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 16.

В дополнительных вариантах осуществления выделенное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело содержит последовательностей CDR, обозначенных под SEQ ID No. 37—42, и вариабельную область содержащую аминокислотную последовательность, тяжелой цепи. характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO. 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18.

различных вариантах осуществления выделенное антитело настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное содержит антитело последовательностей CDR, обозначенных под SEQ ID No. 43—48, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ

ID NO. 19, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20.

В других вариантах осуществления выделенное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой MUC1 выделенное моноклональное антитело К SEA-домену или его антитело антигенсвязывающий фрагмент, указанное содержит где шесть последовательностей CDR, обозначенных под SEQ ID No. 49—54, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO. 21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 22.

В дополнительных вариантах осуществления выделенное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой, где указанное антитело представляет собой выделенное моноклональное антитело к SEA-домену MUC1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело содержит последовательностей CDR, обозначенных под SEQ ID No. 55—60, и вариабельную область тяжелой цепи. содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO. 23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 24.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело, которое конкурирует с антителом, содержащим:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 25, CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 26, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 27, и

- CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 28, CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 29, и CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 30, или
- (b) CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 31, CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 32, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 33, и
- CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 34, CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 35, и CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 36, или
- (c) CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 37, CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 38, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 39, и
- CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 40, CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 41, и CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 42, или
- (d) CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 43, CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 44, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 45, и
- CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 46, CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 47, и CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 48, или
- (e) CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 49, CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 50, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 51, и
- CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 52, CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 53, и CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 54, или
- (f) CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 55, CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 56, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO. 57, и
- CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 58, CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 59, и CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO. 60.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител, обозначенных в данном документе как DMB5F3, DMB7F3, DMB4B4, DMB4F4, DMB10B7 и DMC209, подробно описаны в таблице 1 ниже. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антител, описанных в

34

данном документе, подробно описаны в таблице 2 ниже. Дополнительно, последовательности CDR вышеуказанных антител представлены в таблице 3 ниже.

DMB4B4 и DMB10F10 характеризуются идентичными аминокислотными последовательностями.

DMB4F4 представляет собой mIg-гамма1. DMB10B7 и DMB13D11 представляют собой mIgA. Однако вариабельные области всех трех антител DMB4F4, DMB10B7 и DMB13D11 являются идентичными.

Таблица 1. Последовательности нуклеиновой кислоты

SEQ	Последовательность	Описание
ID		
NO.		
1	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGCCTGTTCA	Последователь
	CAGCCTTTCCTGGTGTCCTGTCTGATGTGCA	ность
	GGTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAA	нуклеиновой
	ACCTTCTCAGTCACTTTCTCTCACCTGCACTG	кислоты
	TCACTGGCCACTCCATCACCAGAGGTTCTA	тяжелой цепи
	GCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAA	DMB5F3
	ACAAACTGGAGTGGATGGGATACATACATT	
	ACGGTGGTGGCACTTCCTACAACCCATCT	
	CTCAAAAGT CGAATCTCTATCACTCGAGAC	
	ACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGA	
	ATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATT	
	TTTCTGTGCACGGTATTCCTACGATATTAC	
	CTACCGCTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGC	
	AGGGACCACGGTCATCGTCTCCTCA	
	ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTT	Последователь
2	GCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGTGAC	ность
	ATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGT	нуклеиновой

	CTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTC	кислоты
	CTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAA	легкой цепи
	GCATACAC TGGTATCAGCAAAGAAAAAATG	DMB5F3
	GTTCTCCAAGACTTCTCATAAAGTATGCTTC	
	TGAGTCTATCTCTGGGATTCCTTCCAGGTTT	
	AGTGGCAGCGGATCTGGGACAGATTTTACTC	
	TTTCCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATAT	
	GGCAGATTATTACTGT CAACAAAATAATAA	
	CTGGCCGCTCACG TTCGGTGCTGGGACCAA	
	GCTGGAACTGAAA	
3	ATGGAATGGCCTTGTATCTTTCTCTCCTCCT	Последователь
	GTCAGTAACTGAAGGTGTCCACTCCCAGGTT	ность
	CACCTTCAGCAGTCTGGGGGCTGAGCTGGTGA	нуклеиновой
	GGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGTAA	кислоты
	GGCTTCTGGCTATGAATTCAAT AGTTTCTGG	тяжелой цепи
	ATGAAC TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAG	DMB4B4
	GGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCT	
	GGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAA	
	ATTCAAGGGT AAAGCCACACTGACTGCTGA	
	CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTC	
	AGCAGCCTAACATCTGAGGACTCTGGGATTT	
	ACTTCTGTGCAAGAGGATACAAGGCCTGGT	
	TTATTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA	
	CTGTCTCTGAA	
4	ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTT	Последователь
	GCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGTGAC	ность
	GTCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATTCTGTC	нуклеиновой

	TGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCC	кислоты
	TGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAG	легкой цепи
	CATACACTGGTATCAGCAAAAGCACAAATGG	DMB4B4
	TTCTCCAAGGCTTATCATAAAGTATGCTTCT	
	GAGTCTCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTA	
	GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCT	
	TACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAGGATATT	
	GCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATGGC	
	TGGCCGCTCACGTTCGGTGGTGGGACCAAG	
	CTGGAGCTGAAA	
5	ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCCCC	Последователь
	TGTCAGGAACTGCAGGTGTCCTCTCTGAGGT	ность
	CCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTG	нуклеиновой
	AAGCCTAAAACTTCAATGAAGATATCCTGCA	кислоты
	AGGCCTCTGGTTACTCATTCACTGACTTCAC	тяжелой цепи
	CATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAA	DMB4F4
	AAACCCTGAGTGGATTGGA CTTATTACTCC	
	TTACAATGGTGGAACTAGTTACAACCAGA	
	AGTTCAAGGGC AAGGCCACATTTACTGTAG	
	ACAGGTCATCCAGCACTGCCTACATGGAACT	
	CCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTC	
	TATTACTGTGCAAGAGGCCTGACCTATTTT	
	GACCAGTGGGGCCCAAGGCACCACTCTCACA	
	GTCTCCTCA	
6	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCC	Последователь
	TGCTAATGAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAG	ность
	GGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCA	нуклеиновой
	CTCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCA	кислоты
	CCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAA	
		1

	GTTACATGTAC TGGTATCAGCAGAAGCCAA	легкой цепи
	CATCCTCCCCAAACCCTGGATTTTGCTCAC	DMB4F4
	TTCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTACTCG	
	CTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC	
	TCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAG	
	ATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGA	
	ATAGTAAACCACCCATCACGTTCGGAGGG	
	GGGACCAAGCTGGAAATAAAA	
7	ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCCCC	Последователь
	TGTCAGGAACTGCAGGTGTCCTCTCTGAGGT	ность
	CCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTG	нуклеиновой
	AAGCCTAAAACTTCAATGAAGATATCCTGCA	кислоты
	AGGCCTCTGGTTACTCATTCACTGACTTCAC	тяжелой цепи
	CATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAA	DMB10B7
	AAACCCTGAGTGGATTGGA CTTATTACTCC	
	TTACAATGGTGGAACTAGTTACAACCAGA	
	AGTTCAAGGGC AAGGCCACATTTACTGTAG	
	ACAGGTCATCCAGCACTGCCTACATGGAACT	
	CCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTC	
	TATTACTGTGCAAGAGGCCTGACCTATTTT	
	GACCAGTGGGGCCCAAGGCACCACTCTCACA	
	GTCTCCTCA	
8	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCC	Последователь
	TGCTAATGAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAG	ность
	GGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCA	нуклеиновой
	CTCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCA	кислоты
	CCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAA	легкой цепи
	GTTACATGTAC TGGTATCAGCAGAAGCCAA	DMB10B7
	CATCCTCCCCAAACCCTGGATTTTGCTCAC	
	.	

	TTCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTACTCG	
	CTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC	
	TCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAG	
	ATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGA	
	ATAGTAAACCACCCATCACGTTCGGAGGG	
	GGGACCAAGCTGGAAATAAAA	
9	ATGGCTGTCCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGG	Последователь
	TGACGTTCCCAAGCTGTGTCCTGTCCCAGGT	ность
	GCAGCTGAAGGAATCAGGACCTGGCCTAGT	нуклеиновой
	GGCGCCCTCACAGAACCTGTCCATCACATGC	кислоты
	ACTGTCTCAGGTTTCTCATTAACCGACTATG	тяжелой цепи
	GTGTAAACTGGGTTCGCCAGCCTTCAGGAA	DMB7F3
	AGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGAAATATGGG	
	CTGGTGGAACTACATTCTATAATTCAGCT	
	CTCAAATCCAGACTGACCATCACCAAGGAC	
	AACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAGAAATGA	
	ACAGTCTGCAAAGTCATGACACAGCCATGTA	
	CTATTGTGCCAAACGGCTTAACTGGGACAG	
	TTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC	
	AGTCACCGTCTCCTCA	
10	ATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTAC	Последователь
	TGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA	ность
	CATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTTG	нуклеиновой
	CTGTATCTCTGGGACAGAGGGCCACCATCTC	кислоты
	ATGCAGGGCCAGCGAAAGTGTCAGTACGT	легкой цепи
	CTGCCTATAATTTTCTGCACTGGTACCAGC	DMB7F3
	AGAAACCTGGACAGCCACCCAAACTCCTCAT	
	CTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGT	
	CCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG	
		I

	ACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGG	
	AGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTC	
	AGCACAGTAGGGAGCTTCCGTACACGTTC	
	GGAGGGGGACCAAGTTGGAAATAAAA	
11	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTCA	Последователь
	CAGCCTTTCCTGGTATCCTGTCTGATGTGCA	ность
	GCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAA	нуклеиновой
	ACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTG	кислоты
	TCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGC	тяжелой цепи
	CTGGAACTGGATCCGGCACTTTCCAGGAAAC	DMC209
	AAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTA	
	CAGTGGTAGCACTAGOTACAACCCATCTO	
	TCAAAAGTCGAATCTCTATGAGTCGAGACA	
	CATCCAAGAACGAGTTCTTCCTGGAGTTGAA	
	TTCTGTGAGTACTGAGGACACAGCCACATAT	
	TACTGTGCAAGAGATGGTTACTACACCTTT	
	GCTTTCTGGGGCCA AGGGACTCTGGTCACT	
	GTCTCTGCA	
12	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGA	Последователь
	TGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTT	ность
	GTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTG	нуклеиновой
	TCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTT G	кислоты
	CAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTA	легкой цепи
	ATGGAAACACCTATTTACAT TGGTACCTGC	DMC209
	AGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGAT	
	CTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTC	
	CCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGG	
	ACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTG	
	GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCT	
		<u> </u>

40

CTCAAAGTACACATGTTCCGTACACGTTC	
GGAGGGGGACCAA GCTGGAAATAAAA	

Таблица 2. Аминокислотные последовательности

SEQ	Последовательность	Описание
ID		
NO.		
13	MRVLILLCLFTAFPGVLSDVQVQESGPDLVKPS	Аминокислотн
	QSLSLTCTVTGHSIT RGSSWH WIRQFPGNKLE	ая
	WMG YIHYGGGTSYNPSLKS RISITRDTSKNQF	последователь
	FLQLNSVTTEDTATFFCARYSYDITYRWFFDV	ность тяжелой
	WGAGTTVIVSS	цепи DMB5F3
14	MVSTPQFLVFLLFWIPASRGDILLTQSPAILSVS	Аминокислотн
	PGERVSFSC RASQNIGTSIH WYQQRKNGSPRL	ая
	LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE	последователь
	DMADYYC QQNNNWPLT FGAGTKLELK	ность легкой
		цепи DMB5F3
15	MEWPCIFLFLLSVTEGVHSQVHLQQSGAELVR	Аминокислотн
	PGSSVKISCKASGYEFN SFWMN WVKQRPGQG	ая
	LEWIG QIYPGDGDTNYNGKFKG KATLTADKS	последователь
	SSTAYMQLSSLTSEDSGIYFCARGYKAWFIYW	ность тяжелой
	GQGTLVTVSE	цепи DMB4B4
16	MVSTPQFLVFLLFWIPASRGDVLLTQSPAILSV	Аминокислотн
	SPGERVSFSC RASQNIGTSIH WYQQSTNGSPR	ая
	LIIKYASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVES	последователь
	EDIADYYC QQSNGWPLT FGGGTKLELK	ность легкой
		цепи DMB4B4
17	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVK	Аминокислотн
	PKTSMKISCKASGYSFT DFTMN WVKQSHGKN	ая
	<u> </u>	I

	PEWIG LITPYNGGTSYNQKFKG KATFTVDRS	последователь
	SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR GLTYFDQ W	ность тяжелой
	GQGTTLTVSS	цепи DMB4F4
18	MDFQVQIFSFLLMSASVIMSRGQIVLTQSPALM	Аминокислотн
	SASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPTSSP	ая
	KPWIL LTSNLAS GVPTRFSGSGSGTSYSLTISS	последователь
	MEAEDAATYYC QQWNSKPPIT FGGGTKLEIK	ность легкой
		цепи DMB4F4
19	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVK	Аминокислотн
	PKTSMKISCKASGYSFT DFTMN WVKQSHGKN	ая
	PEWIG LITPYNGGTSYNQKFKG KATFTVDRS	последователь
	SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR GLTYFDQ W	ность тяжелой
	GQGTTLTVSS	цепи
		DMB10B7
20	MDFQVQIFSFLLMSASVIMSRGQIVLTQSPALM	Аминокислотн
	SASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPTSSP	ая
	KPWIL LTSNLAS GVPTRFSGSGSGTSYSLTISS	последователь
	MEAEDAATYYC QQWNSKPPIT FGGGTKLEIK	ность легкой
		цепи
		DMB10B7
21	MAVLGLLLCLVTFPSCVLSQVQLKESGPGLVA	Аминокислотн
	PSQNLSITCTVSGFSLT DYGVN WVRQPSGKGL	ая
	EWLG EIWAGGTTFYNSALKS RLTITKDNSKS	последователь
	QVFLEMNSLQSHDTAMYYCAK RLNWDSSMD	ность тяжелой
	YWGQGTSVTVSS	цепи DMB7F3
22	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASFA	Аминокислотн
	VSLGQRATISC RASESVSTSAYNFLH WYQQKP	ая
	GQPPKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSGTDFTL	последователь
	NIHPVEEEDAATYYC QHSRELPYT FGGGTKLE	
	1	l

	IK	ность легкой
		цепи DMB7F3
23	MRVLILLWLFTAFPGILSDVQLQESGPGLVKPS	Аминокислотн
	QSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRHFPGNKL	ая
	EWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRDTSKNQ	последователь
	FFLQLNSVTTEDTATYYC ARDGYYTFAFWGQ	ность тяжелой
	GTLVTVSA	цепи DMC209
24	MKLPVRLLVLMFWIPASSSDWMTQTPLSLPVS	Аминокислотн
	LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKP	ая
	GQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFT	последователь
	LKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTK	ность легкой
	LEIK	цепи DMC209

Последовательности CDR выделены в пределах аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей и перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR

SEQ	Последовательность	Описание
ID		
NO.		
25	RGSSWH	CDR H1
		тяжелой цепи
		DMB5F3
26	YIHYGGGTSYNPSLKS	CDR H2
		тяжелой цепи
		DMB5F3
27	YSYDITYRWFFDV	CDR H3
		тяжелой цепи
		DMB5F3

28	RASQNIGTSIH	CDR L1
		легкой цепи
		DMB5F3
29	YASESIS	CDR L2
		легкой цепи
		DMB5F3
30	QQNNNWPLT	CDR L3
		легкой цепи
		DMB5F3
31	SFWMN	CDR H1
		тяжелой цепи
		DMB4B4
32	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
		тяжелой цепи
		DMB4B4
33	GYKAWFIY	CDR H3
		тяжелой цепи
		DMB4B4
34	RASQNIGTSIH	CDR L1
		легкой цепи
		DMB4B4
35	YASESLS	CDR L2
		легкой цепи
		DMB4B4
36	QQSNGWPLT	CDR L3
		легкой цепи
		DMB4B4

37	DFTMN	CDR H1
		тяжелой цепи
		DMB4F4
38	LITPYNGGTSYNQKFKG	CDR H2
		тяжелой цепи
		DMB4F4
39	GLTYFDQ	CDR H3
		тяжелой цепи
		DMB4F4
40	SASSSVSYMY	CDR L1
		легкой цепи
		DMB4F4
41	LTSNLAS	CDR L2
		легкой цепи
		DMB4F4
42	QQWNSKPPIT	CDR L3
		легкой цепи
		DMB4F4
43	DFTMN	CDR H1
		тяжелой цепи
		DMB10B7
44	LITPYNGGTSYNQKFKG	DMB10B7
		CDR H2
		тяжелой цепи
45	GLTYFDQ	CDR H3
		тяжелой цепи
		DMB10B7

46	SASSSVSYMY	CDR L1
		легкой цепи
		DMB10B7
47	LTSNLAS	CDR L2
		легкой цепи
		DMB10B7
48	QQWNSKPPIT	CDR L3
		легкой цепи
		DMB10B7
49	DYGVN	CDR H1
		тяжелой цепи
		DMB7F3
50	EIWAGGTTFYNSALKS	CDR H2
		тяжелой цепи
		DMB7F3
51	RLNWDSSMDY	CDR H3
		тяжелой цепи
		DMB7F3
52	RASESVSTSAYNFLH	CDR L1
		легкой цепи
		DMB7F3
53	LASNLES	CDR L2
		легкой цепи
		DMB7F3
54	QHSRELPYT	CDR L3
		легкой цепи
		DMB7F3

PCT/IL2021/050269

55	SDYAWN	CDR H1
		тяжелой цепи
		DMC209
56	YISYSGSTSYNPSLKS	CDR H2
		тяжелой цепи
		DMC209
57	DGYYTFAF	CDR H3
		тяжелой цепи
		DMC209
58	RSSQSLVHSNGNTYLH	CDR L1
		легкой цепи
		DMC209
59	KVSNRFS	CDR L2
		легкой цепи
		DMC209
60	SQSTHVPYT	CDR L3
		легкой цепи
		DMC209

Геномное происхождение антител показано в следующих таблицах.

Таблица 4. Группа I, DMB5F3

Последов	V-ген	Идентич	Ј-ген	И	D-ген	И	AA
ательност	и аллель	ность	аллель		аллель		Участок
Ь		V-					соединения
		области,					
		% (nt)					

47

$V_{\rm H}$	Musmus	95,14%	Musmus	Musmus	CARYSYDI
	IGHV3-	(274/288	IGHJ1*01	IGHD1-1*01	TYRWFFDV
	1*02	nt)	F	F	W
	F				
$V_{\rm L}$	Musmus	96,06%	Musmus		CQQNNN
	IGKV5-	(268/279	IGKJ5*01		WPLTF
	48*0	nt)	F		
	1F				

Таблица 5. Группа II, DMB7F3

Последов	V-ген	Идентич	Ј-ген и	D-ген и	AA
ательност	и аллель	ность	аллель	аллель	Участок
Ь		V-			соединения
		области,			
		% (nt)			
$V_{\rm H}$	Musmus	93,68%	Musmus	Musmus	CAKRLNW
	IGHV2-	(267/285	IGHJ4*01	IGHD4-1*01	DSSMDYW
	6-5*0	nt)	F	F	
	1F				
V_{L}	Musmus	96,56%	Musmus		CQHSREL
	IGKV3-	(281/291	IGKJ2*01		PYTF
	12*0	nt)	F		
	1F				

Таблица 6. Группа III, DMB4B4, DMB10F10

Последов	V-ген	Идентич	Ј-ген	И	D-ген	И	AA
ательност	и аллель	ность	аллель		аллель		Участок
Ь							соединения

48

		V- области, % (nt)			
$V_{\rm H}$	Musmus	92,01%	Musmus	Musmus	CARGYKA
	IGHV1-	(265/288	IGHJ3*01	IGHD1-2*01	WFIYW
	80*0	nt)	F	F	
	1F				
V_{L}	Musmus	96,77%	Musmus		CQQSNS
	IGKV5-	(270/279	IGKJ5*01		WPLTF
	48*0	nt)	F		
	1F				

Таблица 7. Группа IV, DMB4F4, DMB10B7, DMB13D11

Последов	V-ген	Идентич	Ј-ген и	D-ген и	AA
ательност	и аллель	ность	аллель	аллель	Участок
Ь		V-			соединения
		области,			
		% (nt)			
V _H	Musmus	88,89%	Musmus	Musmus	CARGLTY
	IGHV1-	(256/288	IGHJ2*01	IGHD5-1*01	FDQW
	18*0	nt)	F	P	
	1F или				
	Musmus				
	IGHV1-				
	26*0				
	1F				
V_L	Musmus	97,46%	Musmus		CQQWNSK
	IGKV4-	(269/276	IGKJ2*01		PPITF
	68*0	nt)	F		

49

1F		

Таблица 8. DMC209

Последов	V-ген	Идентич	Ј-ген и	D-ген и	AA
ательност	и аллель	ность	аллель	аллель	Участок
Ь		V-			соединения
		области,			
		% (nt)			
V_{H}	Musmus	99,65%	Musmus	Musmus	CARDGY
	IGHV3-	(287/288	IGHJ3*01	IGHD2-3*01	YTFAFW
	2*0	nt)	F	F	
	F				
$V_{\rm L}$	Musmus	100,0%	Musmus		CSQSTH
	IGKV1-	(294/294	IGKJ2*01		VPYTF
	110*01	nt)	F		
	F		•		

Настоящее изобретение также охватывает варианты вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Варианты могут содержать мутации в определяющих комплементарность участках тяжелой и легкой цепей, которые не изменяют активность антител, описанных в данном документе, или в каркасной области.

Под термином «вариант» подразумеваются последовательности аминокислот или нуклеотидов, отличные от последовательностей, конкретно указанных в данном документе, в которых один или более аминокислотных остатков или нуклеотидов делетированы, заменены или добавлены.

Следует понимать, что под термином «*добавленный*», используемым в данном документе, подразумевается любое добавление аминокислотных остатков к последовательностям, описанным в данном документе.

Варианты охватывают различные аминокислотные замены. Аминокислотная одной «замена» является результатом замещения аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные или отличающиеся структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены можно осуществлять на основании сходства гидрофобности, гидрофильности полярности, заряда, растворимости, и/или амфипатической природы вовлеченных остатков.

Как правило, варианты охватывают консервативные аминокислотные замены. Таблицы консервативных замен, предусматривающие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны из уровня техники. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты предусматривают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; полярные нейтральные аминокислоты предусматривают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; положительно заряженные (основные) аминокислоты предусматривают аргинин, лизин и гистидин, и отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты предусматривают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту.

Каждая из следующих восьми групп содержит другие иллюстративные аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T) и
- 8) цистеин (Ц), метионин (М).

51

Консервативные замены нуклеиновых кислот представляют собой замены нуклеиновых кислот, приводящие к консервативным аминокислотным заменам, как определено выше.

Варианты согласно настоящему изобретению также охватывают замены неполярных аминокислот на полярные и наоборот.

Используемые в данном документе термины «аминокислота» или «аминокислотный остаток» относятся к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам.

Вариантные последовательности относятся к последовательностям аминокислот или нуклеиновых кислот, которые могут быть охарактеризованы процентом идентичности их аминокислотных или нуклеотидных последовательностей с аминокислотными или нуклеотидными последовательностями, описанными в данном документе (например, аминокислотными или нуклеотидными последовательностями тяжелой и легкой цепей антител, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления вариантные последовательности, определенные в данном документе, относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, которые кодируют вариабельные области тяжелой и легкой цепей, каждая из которых характеризуется последовательностью нуклеотидов с по меньшей мере 70% или 75% идентичностью последовательности, примерно 80% или 85% идентичностью последовательности, примерно 80%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности при сравнении с последовательностями вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, описанными в данном документе.

В некоторых других вариантах осуществления вариантные последовательности, определенные в данном документе, относятся к аминокислотным последовательностям вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, каждая из которых характеризуется последовательностью аминокислот с по меньшей мере 70% или 75% идентичностью последовательности, примерно 80% или 85% идентичностью последовательности, примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью

последовательности при сравнении с последовательностями вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, описанными в данном документе.

Под термином «активность антител» подразумевается способность антител связывать SEA-домен MUC1 и предпочтительно опосредовать клеточную цитотоксичность либо отдельно, либо в качестве части иммунокомплекса с цитотоксическим фрагментом. Активность антител можно измерять *in vivo* или *in vitro* с применением способов, хорошо известных из уровня техники, например, как описано в приведенных ниже примерах.

Связывание антитела по настоящему изобретению с его белком-мишенью можно измерить, например, с применением ELISA, биослойной интерферометрии (BLI), вестерн-блоттинга или иммунофлуоресцентных анализов (IFA).

Биологическую активность антител можно измерять, например, на *in vivo* модели рака, например, как подробно описано в приведенных ниже примерах.

В еще одном из аспектов настоящее изобретение предусматривает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

Термины «*нуклеиновая кислота*» или «*молекула нуклеиновой кислоты*», определенные в данном документе, относятся к полимеру из нуклеотидов, который может быть либо одно-, либо двухнитевым, который представляет собой полинуклеотид, такой как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и, при необходимости, рибонуклеиновая кислота (РНК). Также следует понимать, что термины предусматривают в качестве эквивалентов аналоги РНК или ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов, и применительно к описанному варианту осуществления однонитевые (такие как смысловые или антисмысловые) и двухнитевые полинуклеотиды. Используемый в данном документе термин ДНК также охватывает кДНК, т. е. комплементарную ДНК или копию ДНК, полученную из

53

матрицы РНК под действием обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы).

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, определенную в данном документе.

Используемый в данном документе термин «вектор экспрессии», иногда называемый «посителем экспрессии» или «экспрессионной конструкцией», охватывает векторы, такие как плазмиды, вирусы, бактериофаг, интегрируемые фрагменты ДНК и другие носители, которые обеспечивают интеграцию фрагментов ДНК в геном хозяина. Векторы экспрессии обычно представляют собой самореплицирующиеся ДНК- или РНК-конструкции, содержащие требуемый ген или его фрагменты и функционально связанные элементы генетического контроля, которые распознаются в подходящей клетке-хозяине и вызывают экспрессию требуемых генов. Эти элементы контроля способны осуществлять экспрессию в подходящем хозяине. Вектор экспрессии согласно настоящему изобретению может быть компетентным для экспрессии, среди прочего, в бактериальных, дрожжевых клетках-хозяевах или клетках-хозяевах млекопитающих.

В еще одном из аспектов настоящее изобретение предусматривает клетку-хозяина, трансфицированную выделенной молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или вектором экспрессии согласно настоящему изобретению.

Термин «клетки-хозяева», используемый в данном документе, относится к клеткам, которые являются чувствительными к введению выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или вектора экспрессии согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанные клетки представляют собой клетки млекопитающих, например, клетки СНО или клетки NS0. Трансфекцию клетки-хозяина выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или вектором экспрессии согласно настоящему изобретению можно осуществлять любым способом, известным из уровня техники.

54

В еще одном из аспектов настоящее изобретение предусматривает иммуноконьютат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и дополнительное цитотоксическое или терапевтическое средство, определенное в данном документе ниже.

Термины «иммуноконъюгат», «иммунокомплекс» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту согласно настоящему изобретению, которые конъюгированы (связаны или соединены) с дополнительным средством. Иммуноконъюгаты могут быть получены любым способом, известным специалисту в данной области техники, например, посредством перекрестного связывания дополнительного средства с антителом согласно настоящему изобретению или посредством способов с применением рекомбинантной ДНК.

В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгат представляет собой иммунотоксин, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению конъюгированы с цитотоксическим средством. Термин «цитотоксическое средство», используемый в данном документе, относится к любому средству, которое оказывает цитотоксический эффект на клетку при контакте. Такие цитотоксические средства хорошо известны специалисту в данной области техники. Примеры цитотоксических средств, которые можно использовать в иммунокомплексе по настоящему изобретению, включают без ограничения алкилирующие лекарственные средства, антрациклины, производные пиримидина, алкалоиды барвинка, фотодинамические лекарственные средства, платиносодержащие соединения, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, средства, инактивирующие рибосомы (например, гелонин), средства, которые индуцируют повреждение ДНК калихеамицин), ингибиторы тубулина (например, (например, эмтанзин), антимитотические средства (например, монометилауристатин) или бактериальные токсины. Цитотоксические средства также могут представлять собой радиоизотопы или цитотоксические антитела. В одном варианте осуществления токсическое средство представляет собой экзотоксин Pseudomonas, например, ZZ-PE38 (IgG-связывающий белок ZZ, слитый с экзотоксином Pseudomonas).

Настоящее изобретение также охватывает биспецифические антитела, способные связываться с двумя отдельными мишенями или эпитопами, где указанное биспецифическое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает иммунокомплекс, содержащий выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с SEA-доменом MUC1, где указанное антитело содержит:

определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 25, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 26, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 27, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 28, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 29, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 30, и цитотоксическое средство, представляющее собой экзотоксин Pseudomonas, где указанный иммунокомплекс уменьшает объем опухоли при введении субъекту, имеющему рак.

Антитело к SEA-домену MUC1 по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством.

Термин «*дополнительное терапевтическое средство*», используемый в данном документе, относится к любому средству, которое можно использовать для лечения заболевания или нарушения, например, рака.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой дополнительное антитело. Термин «дополнительное антитело», как определено в данном документе, относится к антителам по настоящему изобретению (а именно к комбинированному применению по меньшей мере двух антител по настоящему изобретению), а также к антителу, которое не

является антителом согласно настоящему изобретению, которые можно использовать в комбинации с антителом по настоящему изобретению для лечения заболевания или нарушения, например, рака. Такие другие антитела включают без ограничения антитела к CD22, антитела к CD30, антитела к рецептору HER2, антитела к VEGF, антитела к EGFR, антитела к опухоль-ассоциированному антигену (TAA) и антитела к ингибиторам контрольных точек.

Дополнительное терапевтическое средство также может представлять собой химиотерапевтическое средство или противовоспалительное средство.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую в качестве активного ингредиента по меньшей мере одно выделенное антитело к SEA MUC1 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконьюгат, как определено в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

В конкретном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении заболевания или нарушения, ассоциированных со сверхэкспрессией MUC1.

Термин «заболевание или нарушение, ассоциированное со сверхэкспрессией MUC1» используется в данном документе в его самом широком смысле и относится к любому заболеванию, которое характеризуется аберрантной экспрессией MUC1.В конкретном варианте осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное со сверхэкспрессией MUC1, представляет собой рак. Примеры включают без ограничения карциному легкого, карциному предстательной железы, карциному молочной железы, карциному яичника, карциному толстой кишки, карциному тонкой кишки, карциному поджелудочной железы, карциному желудка, рак печени, множественную миелому или острый миелогенный лейкоз.

В других вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное со сверхэкспрессией MUC1, представляет собой аутоиммунное или

57

воспалительное заболевание. Неограничивающие примеры аутоиммунного или воспалительного заболевания включают ревматоидный артрит, псориатический артрит, системную красную волчанку, амилоидоз и аутоиммунный панкреатит.

В других вариантах осуществления указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное аномальное состояние роста, например, кисты, например, клинически значимые почечные кисты, крупные нефункциональные кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы, печеночные кисты и т. п.

«Фармацевтическая композиция» по настоящему изобретению обычно содержит антитело или любой его антигенсвязывающий фрагмент, как определено в данном документе, и буферное средство, средство, которое регулирует осмолярность композиции, и необязательно одно или более из фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ и/или разбавителей, известных из уровня техники.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель» предусматривает любой растворитель, дисперсионную покрытие, антибактериальное среду, И противогрибковое средство и т. п., известные из уровня техники. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Каждый носитель должен быть как фармацевтически, так и физиологически приемлемым в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами и не вреден для субъекта. За исключением того, что любая обычная среда или средство несовместимы с активным ингредиентом, предполагается их применение в терапевтической композиции.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических средств включают антитела к MUC1, антитела к CD22, антитела к CD30, антитела к рецептору

58

HER2, антитела к VEGF, антитела к EGFR, антитела к TAA и ингибиторы контрольных точек.

Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированных со сверхэкспрессией MUC1 (например, рака), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящему изобретению, ПО иммуноконъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, фармацевтической композиции, настоящему или выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгата по настоящему изобретению.

Термины *«субъект»* или *«пациент»* используются взаимозаменяемо и относятся к субъекту, который может получить пользу от настоящего изобретения, такому как млекопитающее (например, собака, кошка, овца, свинья, лошадь, крупный рогатый скот или человек). В одном конкретном варианте осуществления пациентом является человек. Диагностика заболевания или нарушения, ассоциированных со сверхэкспрессией MUC1, может проводиться квалифицированным врачом посредством способов, известных из уровня техники.

Термин «*субъект*, *нуждающийся в этом*» в контексте настоящего изобретения, среди прочего относится к млекопитающим, в частности субъектам-людям, страдающим заболеванием или нарушением, ассоциированными со сверхэкспрессией MUC1, как определено в данном документе.

Следует понимать, что термины «лечить», «осуществление лечения», «лечение» или их формы, используемые в данном документе, означают снижение, предупреждение, излечение, реверсию, облегчение, ослабление, смягчение, сведение к минимуму, подавление или прекращение вредных эффектов заболевания или состояния или задержку проявления одного или более клинических признаков заболевания или нарушения, ассоциированных со сверхэкспрессией МИС1 (например, рака), как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления

59

способы согласно настоящему изобретению представляют собой, где указанные способы дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, дополнительного терапевтического средства, определенного в данном документе.

Введение согласно настоящему изобретению можно осуществлять посредством любого из следующих путей: пероральное введение, внутривенная, внутримышечная, интраперитонеальная, интратекальная или подкожная инъекция; интраректальное введение; интраназальное введение, офтальмологическое введение или местное введение.

В конкретных вариантах осуществления введение по настоящему изобретению осуществляют внутривенно.

Антитела или фрагменты антител, определенные в данном документе, любые содержащие их фармацевтические композиции или любые содержащие их конъюгаты можно вводить субъекту в виде однократной дозы или в виде множества доз.

«Терапевтически эффективное количество» выделенного моноклонального антитела или любого его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для целей, определенных в данном документе, определяется такими соображениями, которые известны из уровня техники для излечения, остановки или по меньшей мере смягчения или облегчения медицинского состояния. Для любого препарата, используемого в способах по настоящему изобретению, дозировка или терапевтически эффективное количество могут быть первоначально оценены посредством анализов культур клеток *in vitro* или на основании подходящих животных моделей.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от 10 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от 0,1 мг/кг до 40 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг или от 5 мг/кг до 10 мг/кг.

Конкретные иллюстративные дозы включают без ограничения 0,25 мг/кг, или 0,75 мг/кг, или 2,5 мг/кг, или 5 мг/кг, или 10 мг/кг, принимаемые в виде суточной дозы, или один раз в три дня, или один раз в неделю по усмотрению врача. В одном варианте осуществления дозы вводят внутривенно.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает выделенное антитело к SEA MUC1 или любой его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, или иммунокомплекс согласно настоящему изобретению, или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированных со сверхэкспрессией MUC1 (например, рака), как определено в данном документе.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, иммунокомплекса или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в получении лекарственного препарата для лечения или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированных со сверхэкспрессией MUC1 (например, рака), как определено в данном документе.

Понятно, что термин «*очищенный*» или «*выделенный*» относится к молекулам, таким как последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот, пептиды, полипептиды или антитела, которые удалены из их естественной среды, выделены или разделены. Таким образом, «выделенное антитело» представляет собой очищенное антитело. Используемые в данном документе термины «*очищенный*» или «*очищать*» также относятся к удалению загрязняющих веществ из образца.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ диагностирования заболевания или нарушения (например, рака) в биоптате, полученном от субъекта, при этом указанный способ включает:

а. приведение указанного биоптата в контакт с по меньшей мере одним выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и

61

b. выявление указанного выделенного моноклонального антитела или любого его антигенсвязывающего фрагмента;

где выявление клеток, сверхэкспрессирующих SEA MUC1, в биоптате служит признаком указанного заболевания или нарушения (например, рака).

Оценку способности выделенных антител по настоящему изобретению выявлять экспрессию SEA-MUC1 можно проводить посредством любого способа, известного из уровня техники, например, посредством иммуногистохимического анализа или проточной цитометрии. Иммуногистохимический анализ можно осуществлять на фиксированных формальдегидом срезах свежезамороженных (FF) тканей, а также на тканях, заключенных в парафин и фиксированных формальдегидом (PEFF). Например, как показано в примере 2 ниже, антитело DMB5F3 окрашивало MUC1-экспрессирующие клетки, присутствующие как в FF-срезах, так и в PEFF-срезах. Антитело также было способно распознавать MUC1-экспрессирующие клетки с применением проточной цитометрии. В различных вариантах осуществления выделенные антитела согласно настоящему изобретению могут быть помечены посредством любых способов, известных из уровня техники. В других вариантах осуществления выявление может быть основано на идентификации указанных антител с применением вторичных антител.

Термин «биоптат» используется в данном документе в его самом широком смысле и относится к любому биоптату, взятому у субъекта, как определено в данном документе, в котором могут быть выявлены клетки, сверхэкспрессирующие SEA MUC1. Биоптаты могут быть получены от млекопитающих (включая людей) и охватывают как образцы жидкостей, содержащие клетки, так и образцы тканей. В некоторых вариантах осуществления образец жидкости представляет собой кровь, плазму крови, сыворотку крови, лимфатическую жидкость или мочу. В некоторых вариантах осуществления биоптат представляет собой образец ткани, предположительно содержащий раковые клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ визуализации заболевания или нарушения, при этом указанный способ включает:

- а. введение субъекту по меньшей мере одного выделенного моноклонального антитела к SEA MUC1 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены выявляемой меткой с помощью радиоизотопа или визуализируемого средства (т. е. средства, которое может быть визуализировано, например, посредством сканирования), и
- b. визуализирование указанного выделенного моноклонального антитела к SEA MUC1, помеченного выявляемой меткой, или любого его антигенсвязывающего фрагмента;

где выявление клеток и/или тканей, помеченных указанным изотопом или указанным визуализируемым средством, указывает на наличие, и/или локализацию, и/или степень, и/или наличие метастазов указанного заболевания или нарушения у указанного субъекта.

Термин «приблизительно», используемый в данном документе, обозначает значения, которые могут отклоняться на величину, составляющую не более 1%, более конкретно 5%, более конкретно 10%, более конкретно 15%, а в некоторых случаях не более 20% выше или ниже указанного значения, при этом диапазон отклонений включает целочисленные значения и, если это применимо, также нецелочисленные значения, составляющие непрерывный диапазон. Раскрытое и описанное, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными примерами, стадиями способов и композициями, раскрытыми в данном документе, поскольку такие стадии способов и композиции могут несколько различаться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология используется только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Следует отметить, что формы единственного числа, используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, включают ссылки на множественное число, если содержание явно не требует иного.

На всем протяжении настоящего описания и примеров, а также пунктов формулы изобретения, которые следуют ниже, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его варианты, такие как «содержать» и «содержащий», будет подразумевать включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Реагенты и антитела

Если не указано иное, все реагенты и химические вещества получали от Sigma (Сент-Луис, Миссури). Вторичные антитела, используемые для контрастного окрашивания клеток или для иммуногистохимического исследования, получали от Jackson ImmunoResearch Laboratories (Бар-Харбор, Мэн).

Иммунизация мышей и получение гибридом

Мышей первоначально иммунизировали 5 последовательными внутрикожными иммунизациями ДНК при 21-дневных интервалах. Иммунизирующая ДНК состояла из плазмиды, представляющей собой вектор экспрессии pCL-MUC1-TM, который белка кодирует белок MUC1-TM. Затем внеклеточный домен MUC1-X (рекомбинантного бактериального MUC1-Xex) вместе с неполным адъювантом Фрейнда использовали для бустерной иммунизации мышей. Синтезированный бактериями рекомбинантный белок MUC1-Хех, используемый для этих иммунизаций, спонтанно саморасщепляется, образуя субъединицы а и в МUС1-Х, которые сильно, но нековалентно взаимодействуют друг с другом, образуя очень стабильный гетеродимерный расщепленный белок MUC1-Xex. Гибридомы получали посредством слияния несекретирующих клеток миеломы с иммунными спленоцитами и подвергали скринингу посредством ELISA-анализа.

64

ELISA для определения связывания поликлональных и моноклональных антител к MUC1 с внеклеточным доменом белка MUC1-X

Планшеты для Elisa-иммуноанализа (CoStar) покрывали рекомбинантными белками MUC1 с последующим блокированием. Затем в лунки вносили использованную культуральную среду из исходных гибридом. После инкубации образцы удаляли и лунки промывали с помощью PBS/Tween. Выявление связанных антител осуществляли с помощью антитела к мышиному антителу, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP).

Двухуровневый скрининг для отбора моноклональных антител к МUC1

Первичный скрининг гибридом выполняли путем оценивания связывания антител с внеклеточным доменом MUC1-X (MUC1-Xex), как описано выше в ELISAанализе. Для отбора гибридом, секретирующих антитело, которое распознает не только MUC1-Xex, но также и полноразмерный белок MUC1-TM клеточной поверхности, те гибридомы, которые характеризуются положительным сигналом при первом скрининге, подвергали второму уровню скрининга. Он состоял из проточноцитометрического анализа с применением мышиных клеток-трансфектантов (называемых клетками DA3-TM), которые экспрессируют MUC1-TM человека, и параллельно тех же исходных клеток (называемых клетками DA3-PAR), которые не экспрессируют MUC1 человека. Эта процедура обеспечивала отбор антитела, которое не только связывало фрагменты MUC1, общие как для MUC1-X, так и для MUC1-TM, но также распознавало молекулу MUC1-TM человека на клеточной поверхности, поскольку она экспрессируется клетками млекопитающих.

Линии клеток и культуры клеток

Исходные клетки DA3-PAR грудной железы мыши (которые не экспрессируют MUC1 человека), клетки DA3-TM грудной железы мыши, стабильно трансфицированные с помощью кДНК (и кодирующие полноразмерный MUC1-TM человека), линии клеток T47D и ZR75 (карциномы молочной железы человека), линии

65

клеток КВ (эпидермоидной карциномы человека), Colo357 (карциномы поджелудочной железы человека), N87 (карциномы желудка человека) и CHO-K1 (клетки яичника китайского хомячка) выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), RPMI и культуральной среде DMEM:F12 (1:1) [12].

Животные

Бестимусных («голых») мышей и мышей SCID в возрасте семь недель (Harlan Laboratories, Мэдисон, Висконсин) содержали до умерщвления в условиях, одобренных Институциональным комитетом по этике университета Тель-Авива (TAU) для аккредитации по уходу за лабораторными животными согласно правилам и стандартам Министерства здравоохранения Израиля.

Анализ посредством проточной цитометрии

После трипсинизации MUC1-экспрессирующие опухолевые клетки промывали и инкубировали с DMB5F3 (0,5 мкг/мл) с конкурентом MUC1-Xex (100 мкг/мл) или без него в течение 1 ч при 4°C. После промывания буфером FACS добавляли меченое флуоресцеином козье антитело к мышиному IgG в течение 45 мин при 4°C. Связанный IgG выявляли посредством проточной цитометрии на FACSCalibur^{тм} (Becton Dickinson).

Иммуногистохимическое (ІНС) окрашивание

Микрочипы нормальной и злокачественной ткани поджелудочной железы и молочной железы приобретали у US Biomax (Дервуд, Мэриленд). Процедуры автоматического иммунологического окрашивания проводили с применением Dako Autostainer Link 48 (Dako, Санта-Клара, Калифорния) согласно инструкциям производителя. Демаскирование антигена проводили с цитратным буфером в течение 30 мин при комнатной температуре. Активность эндогенной пероксидазы блокировали посредством добавления реагента Envision Flex, блокирующего пероксидазу (Dako), в течение 30 мин с последующим инкубированием с DMB5F3 (5 мкг/мл) в течение 2 ч. Иммуногистохимическую реакцию выявляли посредством добавления полимерного декстрана, связанного с пероксидазой и вторичными антителами, в течение 15 мин

66

(EnVision-Flex/HRP, Dako) и диаминобензидина в течение 10 мин. (DakoCytomation). Затем выполняли контрастное окрашивание гематоксилином в течение 10 мин.

Определение последовательности моноклональных антител к модулю SEA-MUC1

РНК выделяли из серии гибридом DMB с помощью pearenta 1 TRIzol® согласно техническому руководству по применению реагента (Ambion Inc., Фостер-Сити, Калифорния). Последовательность РНК определяли следующим образом: кДНК получали посредством обратной транскрипции общей РНК с применением универсальных или изотип-специфических антисмысловых праймеров согласно техническому руководству по применению набора PrimeScriptTM для синтеза 1-ой нити кДНК (Takara Bio Inc., Маунтин-Вью, Калифорния). Амплификацию VH- и VLфрагментов антител выполняли согласно стандартной операционной процедуре (GenScript, Нью-Джерси, США), которая предусматривает быструю амплификацию концов кДНК с последующим раздельным клонированием в стандартный клонирующий вектор. Клоны со вставками надлежащих размеров секвенировали посредством ПЦР для отбора колоний и по меньшей мере пять колоний с такими фрагмента вставками секвенировали для каждого c консенсусной последовательностью, полученной посредством выравнивания различных клонов.

Конструирование химерного chDMB5F3 для экспрессии у млекопитающих в клетках яичника китайского хомячка

Химерное DMB5F3 (chDMB5F3) человека получали из мышиного DMB5F3. Векторы pMAZ-IgH и pMAZ-IgL для клеток млекопитающих использовали в качестве каркасов для экспрессии кДНК, кодирующей VH- и VL-области DMB5F3, слитые с человеческими тяжелыми γ1-цепями и человеческими легкими к-цепями соответственно [Mazor et al., *J Immunol Methods*, 321 (2007) 41-59; Mazor et al., *Cancer Lett*, 257 (2007) 124-135].Созданные векторы pMAZ IgH-chDMB5F3 и pMAZ IgL-chDMB5F3 использовали для трансфекции, и полученное химерное антитело

67

chDMB5F3 экспрессировалось в клетках CHO. Стабильно трансфицированные клетки CHO секретировали chDMB5F3, которое очищали посредством аффинной хроматографии с белком A.

Получение иммунокомплекса chDMB5F3: ZZ-PE38

Получение иммунокомплекса chDMB5F3:ZZ-PE38 выполняли, как описано в Pichinuk et al [11]. Вкратце, chDMB5F3 смешивали с очищенным рекомбинантным белком ZZ-PE38 в 20 мМ буфере Hepes при 2-кратном молярном избытке ZZ-PE38 и инкубировали в течение 2 часов при 4°C. Избыток ZZ-PE38 и неконъюгированное антитело chDMB5F3 удаляли посредством пропускания через колонку с Sephadex G200 для разделения по размеру.

Анализ жизнеспособности клеток in vitro

Раковые клетки Т47D, KB, A431 и N87 (20000 клеток/лунка) высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток и выращивали при 37°C в 5% CO₂. После высевания иммунокомплекс chDMB5F3: ZZ-PE38 наносили непосредственно на клетки в концентрации 100 нг/мл. Отрицательные контроли состояли из клеток-мишеней, взаимодействовавших только с токсином ZZ-PE38, не конъюгированным с антителом chDMB5F3, или только с моноклональным антителом chDMB5F3, лишенным токсина ZZ-PE38. Жизнеспособность клеток оценивали по активности щелочной фосфатазы/лунка. Результаты рассчитывали как среднее значение из 2—3 экспериментов, проведенных в трехкратной повторности.

ELISA для определения связывания иммунокомплекса chDMB5F3: ZZ-PE38 c белком MUC1-Xex

Для количественного определения уровней chDMB5F3 в сыворотке крови мыши планшеты для ELISA-иммуноанализа покрывали рекомбинантным белком MUC1-Xex (см. фиг. 1С, демонстрирующую схематическую структуру) с последующим блокированием. В дни 1, 7, 15 и 28 после однократного введения дозы 5 мкг иммунокомплекса chDMB5F3: ZZ-PE38,сыворотку крови мыши наносили в лунки

68

планшета для ELISA при двойных разбавлениях и связанное антитело выявляли с помощью козьего антитела к человеческому Fc, коньюгированного с пероксидазой хрена. Результаты рассчитывали как среднее значение из 2—3 экспериментов, проведенных в трехкратной повторности.

Анализ цитотоксичности in vivo

Были установлены две модели ксенотрансплантата опухоли человека для количественного измерения, одна у самок бестимусных «голых» мышей в возрасте 7 недель и одна у мышей SCID в возрасте 7 недель с применением Colo357, линии MUC1⁺ клеток рака поджелудочной железы человека. Всего 3×10⁶ клеток Colo357, суспендированных в небольшом объеме (100 мкл) буфера Нерез, путем подкожной инъекции вводили в правый бок мышей. В исследованиях как на «голых» мышах, так и на мышах SCID мышей разделяли на три группы (5 мышей/группа): группа 1 получала 5 мкг chDMB5F3: ZZ-PE38 (0,25 мг/кг), группа 2 получала 5 мкг конъюгата неспецифический человеческий Ig: ZZ-PE38 (0,25 мг/кг) и группа 3 получала только эквивалентный объем буфера Hepes. У бестимусных «голых» мышей (самок мышей в возрасте 7 недель) введение антитела к иммунотоксину MUC1, неспецифического иммунотоксина или Hepes в трех экспериментальных группах начинали через 24 часа после инъекции клеток Colo357. Протокол инъекции состоял всего из шести процедур внутривенного (iv) введения в дни 1, 6, 9, 15, 22 и 29 в каждой экспериментальной группе (см. черные стрелки вдоль оси x, фигура 6). У мышей SCID (самок мышей в возрасте 7 недель) chDMB5F3: ZZ-PE38, неспецифический Ig человека: ZZ-PE38 и Нерез вводили сходным образом, начиная через 24 часа после инъекции опухолевых клеток поджелудочной железы в каждой из трех групп. Общий протокол процедур введения состоял из восьми і инъекций в дни 1, 4, 8, 11, 16, 24, 31 и 38 в каждой из трех групп. Рост опухоли оценивали серийно в каждой из экспериментальных групп с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали согласно формуле 0,5 x L x W², где L представляет длину опухоли, и W представляет ширину опухоли, как описано в Tomayko and Reynolds (Cancer Chemother Pharmacol, 24 (1989)

148—154). Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным наблюдательным советом TAU.

Статистика

Статистический анализ роста опухоли *in vivo* проводили в соответствии с простым парным 1-сторонним t-критерием. Значение р меньше 0,05 считалось статистически значимым.

Результаты

Пример 1. Получение и секвенирование mAb DMB, которые связываются с участком соединения α - β MUC1, связанным с клеткой, и определение характеристик mAb DMB5F3

Моноклональные IgG к MUC1 получали из гибридом, полученных из клеток селезенки, выделенных из тканей инокулированных мышей, характеризующихся высокими титрами поликлонального антитела к MUC1-Xex. Рекомбинантный белок MUC1-Xex, используемый для иммунизации, и его связь с трансмембранными белками MUC1-TM и MUC1-Xex показаны на фиг. 1 (сравните 1С с 1В и 1А). Таким образом, было получено всего семь mAb DMB.

последовательности вариабельных областей Нуклеотидные всех моноклональных антител к участку соединения α-β SEA MUC1 определяли, как описано выше в разделе «Материалы и способы», и выведенные аминокислотные последовательности mAb представлены на фигуре 2. Секвенирование полученных mAb позволило продемонстрировать, что они объединены в 4 группы, обозначенные как [I] DMB5F3^[I], [II] DMB7F3^[II], [III] DMB4B4^[III-a], и DMB10F10 ^[III-b], и [IV] ${
m DMB4F4^{[IV-a]}},\ {
m DMB10B7^{[IV-b]}},\ {
m и}\ {
m DMB13D11^{[IV-c]}}$ (см. фиг. 2 и таблицы 1 и 2 для полноразмерных нуклеотидной последовательности аминокислотной И последовательности). Последовательности в пределах каждой группы позволили выявить либо уникальные последовательности mAb, как в случае DMB5F3^[I] и

70

DMB7F3^[II], либо mAb с идентичными последовательностями V_H и V_L , как в случае групп [III] и [IV].

Вариабельные домены всех антител являются типичными в отношении созревания аффинности, как и ожидалось от антител, полученных посредством примирования/стимулирования. Все mAb, кроме mAb группы [IV] DMB10B7^[IV-b] и DMB13D11^[IV-c], представляли собой Ig-гамма1. Группа [IV] содержала три mAb с идентичными последовательностями V_H и V_L – одно (DMB4F4^[IV-a]) относилось к подтипу Ig-гамма1, тогда как оставшиеся два (DMB10B7^[IV-b] и DMB13D11^[IV-c]) представляли собой IgA.

Все семь mAb к участку соединения α-β SEA MUC1 прочно связывались с клетками, экспрессирующими трансмембранный белок MUC1-TM, как оценено посредством проточной цитометрии (фиг. 1D—1K). Репрезентативные mAb из каждой из четырех групп mAb также оценивали в отношении их способности выявлять экспрессию MUC1-TM посредством иммуногистохимического анализа, выполненного на фиксированных формальдегидом срезах свежезамороженных (FF) тканей, а также на тканях, заключенных в парафин и фиксированных формальдегидом (PEFF). Антитело DMB5F3^[II] окрашивало MUC1-экспрессирующие клетки, присутствующие как в FF-срезах, так и в PEFF-срезах (см. ниже), тогда как DMB7F3^[III] и mAb из группы [IV], напротив, окрашивали только FF-срезы, mAb группы [III], хоть и хорошо связывались с MUC1-экспрессирующими клетками, как оценено посредством проточной цитометрии, не взаимодействовали ни с FF-срезами, ни с PEFF-срезами (данные не показаны).

VH-домен получают из гена V IGHV3-1*02 зародышевого типа мыши с 9 соматическими мутациями. Он на 105/122 (86%)идентичен идентичной последовательности с самым высоким показателем при поиске в NCBI BlastP. VLдомен (V-каппа) получают из гена V IGKV5-48*01 зародышевого типа мыши с 3 101/107 (94%) соматическими мутациями. Он на идентичен идентичной последовательности с самым высоким показателем при поиске в NCBI BlastP.

71

Анализы посредством проточной цитометрии демонстрировали, что DMB5F3 прочно связывалось c клетками DA3, стабильно трансфицированными полноразмерным MUC1 (DA3-TM) (фиг. 1D), тогда как нетрансфицированные клетки DA3-PAR, которые не экспрессируют MUC1, были, соответственно, отрицательными (фиг. 1E). Colo357, линия MUC1-положительных клеток рака поджелудочной железы человека, а также линии T47D и ZR75 MUC1-положительных клеток рака молочной железы проявляли сильную способность к взаимодействию с DMB5F3 (фиг. 1D, 1F, 1H и 1J). Добавление конкурирующего растворимого рекомбинантного белка MUC1-Xex (см. фиг. 1C, где представлена структура рекомбинантного MUC1-Xex) полностью устраняло связывание DMB5F3 с клетками (фиг. 1G, 1I и 1K), что подтверждает специфичность антитела.

Пример 2. IHC-окрашивание срезов ткани поджелудочной железы и молочной железы человека с помощью DMB5F3

Для определения степени, с которой моноклональное DMB5F3 связывается со злокачественными нормальными тканями, различные И злокачественные новообразования в тканевых микрочипах, включая карциномы молочной железы, поджелудочной железы, легкого, предстательной железы и толстой кишки, подвергали иммуногистохимическому окрашиванию (иллюстративные результаты показаны на фигурах 3 и 4). Обоснование для проведения обширных анализов экспрессии MUC1, несмотря на предыдущие сообщения, демонстрирующие сверхэкспрессию MUC1 в злокачественных новообразованиях, заключается в том важном факте, что описанные в данном документе mAb к MUC1 распознают модуль SEA MUC1 и были получены посредством иммунизации рекомбинантным белком MUC1-Xex (см. фиг. 1C), а не белком MUC1-TM (см. фиг. 1A). Анализы экспрессии MUC1 на сегодняшний день выполнялись почти исключительно с антителами, распознающими эпитопы в пределах α-цепи фрагмента VNTR. Таким образом, было интересно впервые проанализировать паттерны распознавания клеток антителами к домену SEA-MUC1. Тканевые микрочипы, используемые для этих анализов, включали следующее (обозначение

72

микрочипов Віотах в скобках): 6 опухолей поджелудочной железы с прилегающими тканями, не относящимися к опухоли (РА241); 40 различных опухолей поджелудочной железы и 8 нормальных тканей поджелудочной железы (РА483); по 3 образца плазмоцитарного мастита молочной железы, аденоза и фиброаденомы, и 36 инвазивных карцином протоков молочной железы плюс 2 инвазивные лобулярные карциномы молочной железы (BR963a), и по 10 случаев каждой из карцином толстой кишки, молочной железы, предстательной железы, легкого и толстой кишки, в дополнение к двум срезам каждой из соответствующих нормальных тканей (ТР481). Репрезентативный составной массив нормальных и злокачественных тканей, иммуногистохимически окрашенных с помощью DMB5F3, показан на фиг. 3. Из 46 опухолей поджелудочной железы (в микрочипах РА241 и РА483) 44 проявляли сильную способность к взаимодействию с DMB5F3; опухолевые клетки окрашивались почти кольцеобразным образом (например, см. фиг. 3C и 3D). Напротив, способность нормальной ткани поджелудочной железы взаимодействию DMB5F3 ограничивалась люминальной поверхностью эпителиальных клеток протоков поджелудочной железы (фиг. 3А).

Из образцов ткани молочной железы, проанализированных на микрочипе BR963a, окрашивание отсутствие наблюдалось минимальное или его незлокачественных тканях, включая нормальную ткань молочной плазмоцитарный мастит, аденоз и фиброаденому. Напротив, 21 из 36 инвазивных карцином протоков молочной железы демонстрировали очень высокую способность к взаимодействию с DMB5F3, 4 демонстрировали низкие уровни экспрессии, и 11 образцов демонстрировали незначительный уровень экспресии или ее отсутствие. поджелудочной Исследованные ткани железы включали как ацинарные аденокарциномы (фиг. 3D), так и аденокарциномы протоков (фиг. 3C и фиг. 4N и 4O), а злокачественные ткани молочной железы в микрочипе состояли из инвазивных карцином протоков (фиг. 3G и 3H). Злокачественные клетки из карцином поджелудочной железы (фиг. 3C и 3D и фиг. 4N и 4O), карцином молочной железы (фиг. 3G и 3H и фиг. 3I—3N, пациенты 1—6) и карцином легкого, предстательной

73

железы и толстой кишки (фиг. 4A, 4D и 4G соответственно, фигуры 4B, 4E и 4H при больших значениях увеличения) сильно взаимодействовали с DMB5F3 с почти кольцеобразным окрашиванием клеток. Напротив, нормальные ацинарные клетки поджелудочной железы демонстрировали только слабую апикальную положительность (обозначена черными стрелками на фиг. 3A(i); большее увеличение показано на фиг. 3В и фиг. 4М), что согласовывалось с предыдущим описанием [13]. Нормальные эпителиальные клетки протоков молочной железы (фиг. 3E и 3F) и нормальные железистоподобные структуры, образованные незлокачественными эпителиальными клетками, прилегающими к злокачественному новообразованию, на микрочипе демонстрировали слабую апикальную положительность (на фиг. 3I—3N представлены срезы биоптатов от шести пациентов; нормальные железистоподобные структуры обозначены черными стрелками). Это резко контрастировало со злокачественными клетками в том же срезе, которые сильно окрашивались с помощью антитела DMB5F3 к SEA-MUC1 (фиг. 3I—3N). Поскольку злокачественный и незлокачественный материалы были на одном и том же образце микрочипа, а следовательно одновременно и одинаково окрашены, то возможность того, что результаты могли объясняться простыми техническими различиями в обработке и окрашивании, может быть исключена. Более того, тот факт, что растворимый MUC1-Хех конкурировал с окрашиванием клеток с помощью DMB5F3, подтвердил специфичность антитела DMB5F3 к MUC1 (сравните фиг. 3A и 3B соответственно).

Чтобы распространить эти наблюдения на другие типы опухолей, карциномы легкого, предстательной железы и толстой кишки иммуногистохимически исследовали с помощью DMB5F3 (фиг. 4A, 4D и 4G). Результаты демонстрировали, что паттерн распределения MUC1 является сходным с наблюдаемым в карциномах молочной железы и поджелудочной железы (фиг. 3). В дополнение к повышенной плотности экспрессии MUC1 на клеточном уровне также наблюдались различия в архитектуре MUC1: антитело DMB5F3 к SEA-MUC1 связывалось со злокачественными клетками почти кольцеобразным образом. Также в данном документе окрашивание с помощью DMB5F3 устранялось в присутствии конкурирующего растворимого белка MUC1-Хех,

что свидетельствует о специфичности DMB5F3 (данные не показаны), и при этом не наблюдалось окрашивание с помощью иммуноглобулина неиммунизированных мышей (сравните фиг. 4A, 4D, 4G и 4J с 4C, 4F, 4I и 4L). Большинство из почти 50 образцов тканей аденокарцином легкого, предстательной железы, толстой кишки, молочной железы и поджелудочной железы, исследованных на микрочипах, демонстрировали сходный паттерн ІНС-окрашивания, меньшинство экспрессировали меньшие количества MUC1, и некоторые характеризовались незначительной экспрессией MUC1. Эта неоднородность согласуется с гетерогенностью фенотипов опухолей в целом и MUC1 в частности. Поскольку карцинома поджелудочной железы, MUC1-экспрессирующее злокачественное новообразование с высокой смертностью, была выбрана для исследований *in vivo* (см. ниже), ткань опухоли поджелудочной железы от дополнительной серии пациентов исследовали для подтверждения изменения архитектуры экспрессии MUC1, ассоциированной с опухолью (см. репрезентативное окрашивание на фиг. 4N и 4O). Хотя эти анализы демонстрируют повышенную периферическую иммунореактивность DMB5F3 по всей клеточной поверхности раковых клеток аденокарциномы, уместны следующие два пояснения: (а) иммуногистологические анализы являются только полуколичественными, и (b) в некоторых случаях MUC1 сильно экспрессировался внутри клетки, что затрудняло сравнения поверхностной экспрессии. Несмотря на эти две оговорки, раковые клетки, полученные из аденокарцином, явно демонстрируют высокую иммунореактивность клеточной поверхности в отношении DMB5F3.

Пример 3. Цитотоксичность иммунокомплекса chDMB5F3: ZZ-PE38 in vitro

После демонстрации взаимодействия DMB5F3 с раковыми клетками, экспрессирующими MUC1 на клеточной поверхности, как в линиях клеток (фиг. 1D—1K), так и на микрочипах биоптатов тканей (фиг. 3 и 4), исследовали способность антитела к переносу цитотоксического фрагмента в злокачественные клетки. Слитый белок ZZ-PE38 состоит из экзотоксина PE38 Pseudomonas и IgG-связывающего ZZ-домена, полученного из белка А. Поскольку ZZ-домен прочно связывается с

75

человеческим Fc и демонстрирует незначительное связывание с мышиным Fc IgG1, было получено химерное антитело DMB5F3, в котором мышиный Fc-IgG1 заменяли человеческим Fc, а затем ZZ-PE38 добавляли к химерному (ch)DM5F3 с образованием комплекса иммунотоксина, как описано в разделе «Материалы и способы».

Поскольку токсин ZZ-PE38 отдельно не способен связываться с клетками или интернализоваться в них, то вся цитотоксичность в отношении опухоли, индуцированная иммунокомплексом DMB5F3-ZZ-P38, обусловлена исключительно связыванием с клетками и интернализацией иммунокомплекса с антителом DMB5F3 к MUC1 [Mazor et al., J Immunol Methods, 321 (2007) 41—59; Mazor et al., Cancer Lett, 257 (2007) 124—135]. Линии клеток Т47D, KB, A431 и N87 подвергали цитометрическому анализу с chDMB5F3, эрбитуксом и герцептином при концентрациях 300 нг/мл. Было обнаружено, что MUC1⁺ клетки T47D (карциномы молочной железы) и клетки KB (эпидермоидных опухолей) чувствительны к опосредованному иммунокомплексом chDMB5F3: ZZ-PE38 подавлению роста клеток с цитотоксичностью в отношении опухоли, наблюдаемой при таких низких концентрациях антител, как 200 пМ (фиг. 5А и 5В. Напротив, клетки Т47D рака молочной железы, экспрессирующие низкие, но четко выявляемые уровни EGFR1, были нечувствительны к Erbitux®:ZZ-PE38 (фиг. 5А, кривая с точками ромбовидной формы) и лишь частично чувствительны к Herceptin®: ZZ-PE38 (фиг. 5A, кривая с точками в виде прямоугольников). Клетки KB, которые экспрессируют низкие, но четко выявляемые уровни erbB2-EGFR2, были нечувствительны к Herceptin®: ZZ-PE38 (фиг. 5В, график с точками в виде прямоугольников). Клетки, экспрессирующие значительно более низкие уровни MUC1, такие как N87, демонстрировали приблизительно 40% цитотоксичность, в отличие от высокой экспрессии MUC1 и высокой цитотоксичности, наблюдаемых в клетках Т47D и КВ (сравните фиг. 5D с фиг. 5A и 5B). А431, линия клеток с самым низким уровнем экспрессии MUC1 из всех исследованных линий клеток, содержала основную популяцию клеток, которые демонстрировали отсутствие экспрессии MUC1 с единственной гораздо меньшей субпопуляцией, экспрессирующей МUС1 на низком уровне. Согласуясь с этим низким уровнем экспрессии MUC1 иммунокомплекс

76

сhDMB5F3:ZZ-PE38 приводил к очень ограниченной цитотоксичности в отношении A431. Эти результаты указывают на то, что пороговый уровень экспрессии и плотности MUC1 на клеточной поверхности является необходимым требованием для проявления цитотоксичности. Аналогичное явление наблюдалось при отсутствии цитотоксичности комплекса герцептин-иммунотоксин при воздействии на клетки KB, несмотря на низкие, но выявляемые уровни экспрессии erbB2-EGFR2 в этих клетках (фиг. 5В), и комплекса эрбитукс-иммунотоксин при воздействии на клетки T47D, которые также экспрессируют низкие, но выявляемые уровни EGFR1 (фиг. 5А).

Пример 4. Фармакокинетика chDMB5F3 у «голых» мышей

Стабильность chDMB5F3 *in vivo* оценивали посредством оценивания уровней в сыворотке крови в дни 1, 7, 14 и 28 после iv введения. Результаты демонстрировали, что по сравнению с днем 7 уровни антитела chDMB5F3 в сыворотке крови в дни 14 и 28 снижались в два и четыре раза соответственно (фиг. 6D), что согласуется с ранее зарегистрированными периодами полужизни у мышей химерных IgG и антител, полученных *in vitro*, при клиническом применении. Что касается конъюгата токсина, было показано, что период полужизни экзотоксина Pseudomonas удлинялся за счет связывания с IgG.

Пример 5. Цитотоксичность иммунокомплекса chDMB5F3: ZZ-PE38 в ксенотрансплантированных опухолях человека *in vivo*

Введение иммунокомплекса chDMB5F3:ZZPE38 «голым» мышам с ксенотрансплантированными MUC1⁺ клетками Colo357 поджелудочной железы человека приводило к выраженному цитоцидному эффекту с уменьшением объема опухоли в дни 21, 28 и 35 по сравнению с таковым в контрольных группах, которые получали буфер Hepes или неспецифический изотипически сходный IgG-ZZ :PE38 (фиг. 6A). После завершения введения иммунокомплекса chDMB5F3:ZZPE38 объем опухоли в обработанной группе, как и ожидалось, постепенно увеличивался

77

параллельно с таковым в контрольных группах, и к дню 40 (когда животных умерщвляли) объем опухоли во всех трех группах достигал диапазона 200—400 мм³ (фиг. 6A). Это снова подтвердило эффект подавления опухоли введенным chDMB5F3:ZZPE38.

Фактором, ограничивающим предположительно цитотоксическую иммунокомплекса chDMB5F3:ZZPE38 эффективность мышей у «голых» ксенотрансплантатом, является эндогенное циркулирующее антитело, которое, взаимодействуя с линкером ZZ, может по меньшей мере частично вытеснять токсин ZZ-PE38 из chDMB5F3. Хотя ZZ не связывает мышиный IgG1, он способен связывать мышиный IgG2. Ограничение эффективности иммунотоксина за счет вытеснения не отражает дефектного связывания антитела chDMB5F3 с MUC1 на поверхности опухолевых клеток, а возникает в результате потери токсина вследствие снижения ZZопосредованного связывания ZZ-PE38 с антителом chDMB5F3. Чтобы избежать этого осложняющего фактора затем проводилось почти идентичное исследование на мышах SCID, у которых отсутствовало выявляемое эндогенное антитело. Как и в протоколе с «голыми» мышами, мышей SCID с трансплантатом разделяли на три группы: одна получала иммунокомплекс chDMB5F3:ZZPE38, одна получала изотипически сходный IgG-ZZ:PE38 и одна получала только буфер Hepes, введение каждого из которых начинали через 24 часа после инъекции опухоли поджелудочной железы. Как отмечено в разделе «Материалы и способы», протокол состоял из серийных введений в каждой группе в дни 1, 4, 8, 11, 16, 24, 31 и 38. Иммунокомплекс chDMB5F3: ZZ-PE38 проявлял выраженный противоопухолевый эффект: у мышей SCID, обработанных с помощью chDMB5F3: ZZ-PE38, объем ксенотрансплантированных опухолей Colo357 человека уменьшался на целых 90% по сравнению с контрольными группами (фигура 7). Фактические значения объемов опухолей после обработки (в мм³) являются следующими. Мыши группы 1, обработанные иммунотоксином chDMB5F3: 2, 14, 16, 25 и 36 мм³; мыши группы 2, обработанные неспецифическим изотипически сходным IgG-ZZ:PE38: 180, 225, 258 и 270 мм³ (отсутствие опухоли, наблюдаемое у одной мыши в данной группе, не включено), и мыши группы 3, обработанные только буфером

78

Hepes: 180, 245, 304, 705 и 1008 мм3. Расширенная схема введения chDMB5F3: ZZ-PE38 в дни 31 и 38 гарантировала противоопухолевый эффект уже в день 49.

Пример 6. Секвенирование DMC209

Общую РНК выделяли из клеток гибридомы согласно техническому руководству по применению набора RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN, № по каталогу: 74034). Затем общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с применением либо изотипспецифических антисмысловых праймеров, либо универсальных праймеров согласно техническому руководству по применению обратной транскриптазы SMARTScribe (ТаКаRa, № по каталогу: 639536). Фрагменты тяжелой цепи и легкой цепи антитела амплифицировали согласно стандартной операционной процедуре (SOP) быстрой амплификации концов кДНК (RACE) GenScript. Амплифицированные фрагменты антитела клонировали по отдельности в стандартный клонирующий вектор. ПЦР для отбора колоний осуществляли для скрининга клонов со вставками надлежащих размеров. Консенсусная последовательность представлена в таблице 1 (для вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO:11 и для вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO:12).

79

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с SEA-доменом MUC1, где указанное антитело содержит:
 - а. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 25, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 26, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 27, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 28, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 29, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 30, или
 - b. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 31, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 32, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 33, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 34, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 35, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 36, или
 - с. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 37, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 38, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 39, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 40, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 41, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 42, или
 - d. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 43, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 44, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 45, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 46, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 47, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 48, или
 - е. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 49, CDRH2, обозначенный SEQ ID

- NO. 50, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 51, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 52, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 53, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 54, или
- f. определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDRH) 1, обозначенный SEQ ID NO. 55, CDRH2, обозначенный SEQ ID NO. 56, CDRH3, обозначенный SEQ ID NO. 57, и определяющий комплементарность участок легкой цепи (CDRL) 1, обозначенный SEQ ID NO. 58, CDRL2, обозначенный SEQ ID NO. 59, и CDRL3, обозначенный SEQ ID NO. 60.
- **2.** Выделенное моноклональное антитело по п. 1, где указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:
 - а. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO. 1, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 2, или
 - b. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO. 3, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 4, или
 - с. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO. 5, и где указанная вариабельная область легкой цепи

кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 6, или

- d. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO. 7, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 8, или
- е. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO. 9, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 10, или
- f. указанная вариабельная область тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, обозначенной под SEQ ID NO. 11, и где указанная вариабельная область легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO. 12.
- **3.** Выделенное моноклональное антитело по п. 1 или п. 2, где указанное антитело содержит:
 - а. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 13, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 14, или ее вариант, или
 - b. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 15, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 16, или ее вариант, или

- с. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 17, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 18, или ее вариант, или
- d. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 19, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 20, или ее вариант, или
- е. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 21, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 22, или ее вариант, или
- f. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 23, или ее вариант, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO. 24, или ее вариант.
- **4.** Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело представляет собой мышиное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.
- **5.** Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где указанный его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fv,

одноцепочечный Fv (scFv), одноцепочечный Fv-Fc (scFv-Fc), Fab', Fab, $F(ab')_2$ или $F(ab)_2$.

- 6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент позволяют идентифицировать SEA MUC1 в иммуногистохимическом анализе, осуществляемом на фиксированных формальдегидом срезах свежезамороженных (FF) тканей, и/или на тканях, заключенных в парафин и фиксированных формальдегидом (PEFF), и/или посредством анализа MUC1экспрессирующих клеток человека посредством сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).
- 7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или любой его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—6.
- **8.** Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 7.
 - 9. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором экспрессии по п. 8.
- **10.** Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—6 и дополнительное цитотоксическое или терапевтическое средство.
- 11. Иммуноконъюгат по п. 10, где указанное цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из алкилирующих лекарственных средств, антрациклинов, пиримидина, производных алкалоидов барвинка, фотодинамических лекарственных платиносодержащих средств, соединений, таксанов, ингибиторов топоизомеразы, средств, инактивирующих рибосомы, средств, которые индуцируют повреждение ДНК, ингибиторов тубулина, противомитотических средств, радиоизотопов, цитотоксических антител и бактериальных токсинов.
- **12.** Иммуноконъюгат по п. 10, где указанное цитотоксическое средство представляет собой экзотоксин Pseudomonas.

- **13.** Иммуноконъюгат по любому из пп. 10—12, где указанный иммуноконъюгат уменьшает объем опухоли при введении субъекту, имеющему рак.
- **14.** Биспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—6 и второе антитело, связывающее другой антиген-мишень.
- 15. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—6 или иммуноконъюгат по любому из пп. 10—13, биспецифическое антитело по п. 14 и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.
- **16.** Фармацевтическая композиция по п. 15, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство.
- 17. Способ лечения или облегчения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1—6 или иммуноконъюгата по любому из пп. 10—13, биспецифического антитела по п. 14 или фармацевтической композиции по п. 15 или п. 16.
- **18.** Способ по п. 17, где указанное заболевание или нарушение представляет собой рак.
- **19.** Способ по п. 18, где указанный рак представляет собой MUC1-экспрессирующий рак.
- **20.** Способ по п. 18, где указанный рак выбран из группы, состоящей из карциномы легкого, карциномы предстательной железы, карциномы молочной железы, карциномы яичника, карциномы толстой кишки,

карциномы поджелудочной железы, множественной миеломы и острого миелогенного лейкоза.

- **21.** Способ по п. 17, где указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.
- **22.** Способ по п. 21, где указанное аутоиммунное или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, псориатического артрита, системной красной волчанки, амилоидоза и аутоиммунного панкреатита.
- 23. Способ по п. 17, где указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное клинически значимое аномальное состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.
- **24.** Способ по любому из пп. 17—23, где указанный способ дополнительно включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, дополнительного терапевтического средства.
- 25. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—6, иммуноконъюгат по любому из пп. 10—13, биспецифическое антитело по п. 14 или фармацевтическая композиция по п. 15 или п. 16 для применения в способе лечения или облегчения заболевания или нарушения, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически количества указанного эффективного выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, указанного иммуноконъюгата или указанной фармацевтической композиции.
- **26.** Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконьюгат, или биспецифическое антитело, или фармацевтическая композиция для применения по п. 25, где указанное заболевание или нарушение представляет собой рак.

- 27. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконьюгат, или биспецифическое антитело, или фармацевтическая композиция для применения по п. 25, где указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание, или где указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное аномальное состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.
- **28.** Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконьюгат, или биспецифическое антитело, или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 25—27, где указанный способ дополнительно включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, дополнительного терапевтического средства.
- **29.** Способ диагностирования заболевания или нарушения у субъекта, где указанное заболевание или нарушение ассоциировано с экспрессией MUC-1, при этом указанный способ включает:
 - а. приведение в контакт биоптата, полученного от указанного пациента, с по меньшей мере одним выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1—6, и
 - b. выявление указанного выделенного моноклонального антитела или любого его антигенсвязывающего фрагмента;

где выявление клеток, сверхэкспрессирующих SEA MUC1, в биоптате указывает на то, что у субъекта диагностировано указанное заболевание или нарушение.

30. Способ по п. 29, где указанное заболевание или нарушение представляет собой рак.

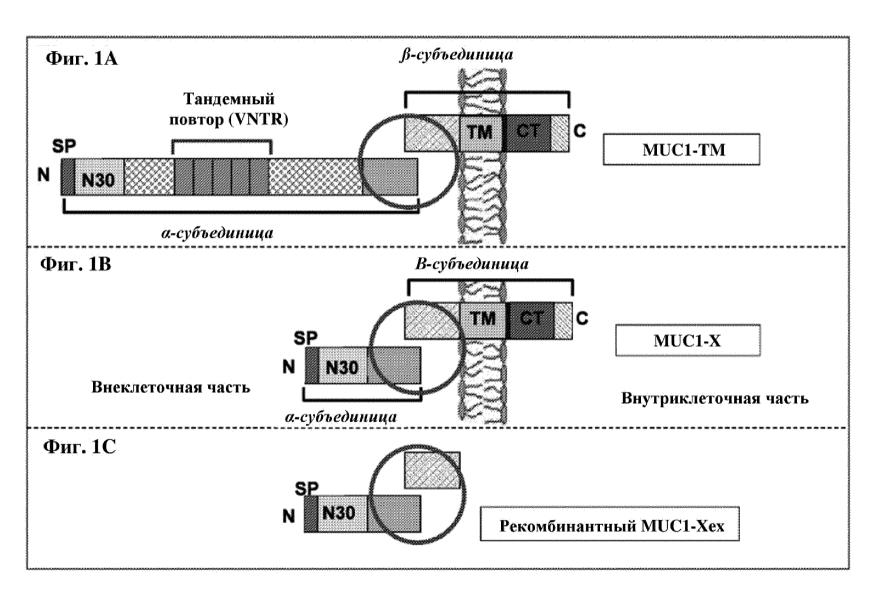
- **31.** Способ по п. 29, где указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание, или где указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное аномальное состояние роста, например, кисты, например, почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.
- **32.** Способ по любому из пп. 29—31, где указанное выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены выявляемой меткой.
- **33.** Способ визуализации заболевания или нарушения, при этом указанный способ включает:
 - а. введение субъекту по меньшей мере одного выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1—6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены выявляемой меткой с помощью радиоизотопа или визуализируемого средства, и
 - b. визуализирование указанного выделенного моноклонального антитела, помеченного выявляемой меткой, или любого его антигенсвязывающего фрагмента;

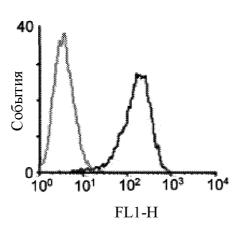
где выявление клеток и/или тканей, помеченных указанным изотопом или визуализируемым средством, указывает на наличие, и/или локализацию, и/или степень, и/или наличие метастазов указанного заболевания или нарушения у указанного субъекта.

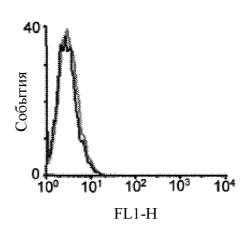
- **34.** Способ по п. 33, где указанное заболевание или нарушение представляет собой рак.
- **35.** Способ по п. 33, где указанное заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание, или где указанное заболевание или нарушение представляет собой незлокачественное аномальное состояние роста, например, кисты, например,

88

почечные кисты, кисты щитовидной железы и разрастания щитовидной железы или печеночные кисты.

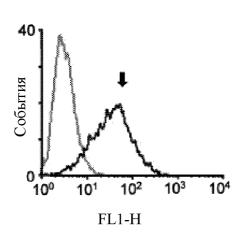


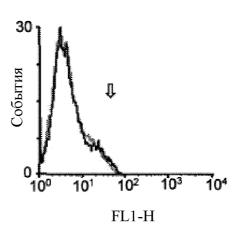




Фиг. 1D

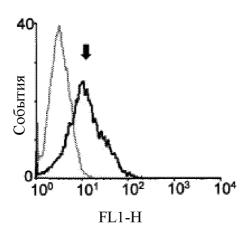


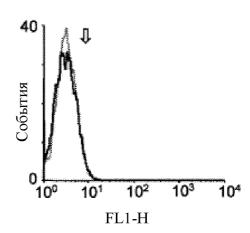




Фиг. 1F

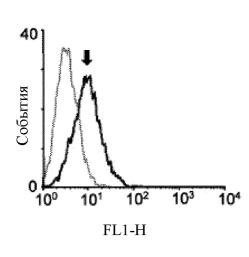
Фиг. 1G

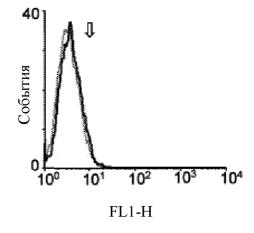




Фиг. 1Н







Фиг. 1J

Фиг. 1К

DMB5F3 (группа I)

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (140 аа)

MRVLILLCLFTAFPGVLSDVQVQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGHSITRGSSW HWIRQFPGNKLEWMGYIHYGGGTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTT EDTATFFCARYSYDITYRWFFDVWGAGTTVIVSS

Легкая цепь: аминокислотная последовательность (127 аа)

MVSTPQFLVFLLFWIPASRGDILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIGTSI HWYQQRKNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDMADY YCOONNWPLTFGAGTKLELK

DMB7F3 (группа II)

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (137 аа)

MAVLGLLLCLVTFPSCVLSQVQLKESGPGLVAPSQNLSITCTVSGFSLT**DYGV**NWVRQPSGKGLEWLGEIWAGGTTFYNSALKSRLTITKDNSKSQVFLEMNSLQS
HDTAMYYCAKRLNWDSSMDYWGOGTSVTVSS

Легкая цепь: аминокислотная последовательность (131 аа)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASFAVSLGQRATISCRASESVSTSA YNFLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEED AATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK

DMB4B4/DMB10F10 (группа III)

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (136 аа)

MEWPCIFLFLLSVTEGVHSQVHLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFN**SFWM**NWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT
SEDSGIYFCARGYKAWFIYWGOGTLVTVSE

Легкая цепь: аминокислотная последовательность (127 аа)

MVSTPQFLVFLLFWIPASRGDVLLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIGTSI HWYQQSTNGSPRLIIKYASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADY YCQOSNGWPLTFGGGTKLELK

Фиг. 2

DMB4F4 (группа IV, также включает DMB10B7 и DMB13D11):

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (135 аа)

MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPKTSMKISCKASGYSFT**DFTM**NWVKQSHGKNPEWIGLITPYNGGTSYNQKFKGKATFTVDRSSSTAYMELLSLT
SEDSAVYYCARGLTYFDQWGQGTTLTVSS

Легкая цепь: аминокислотная последовательность (129 аа)

MDFQVQIFSFLLMSASVIMSRGQIVLTQSPALMSASPGEKVTMTC**SASSSVSY MY**WYQQKPTSSPKPWIL**LTSNLAS**GVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT
YYC**QQWNSKPPIT**FGGGTKLEIK

DMC209

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (135 aa)

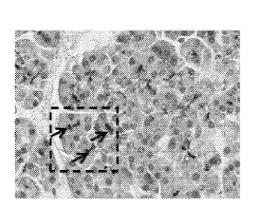
MRVLILLWLFTAFPGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAW

NWIRHFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTT

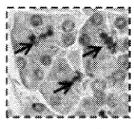
EDTATYYCARDGYYTFAFWGQGTLVTVSA

<u>Легкая цепь: аминокислотная последовательность (131 аа)</u>
MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNG
NTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED
LGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

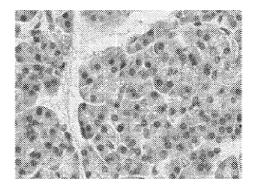
Фиг. 2 (продолж.)



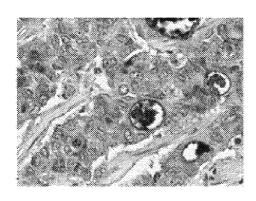
Фиг. 3А



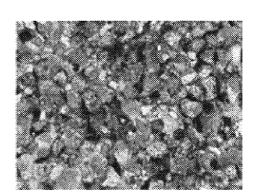
Фиг. 3A(i)



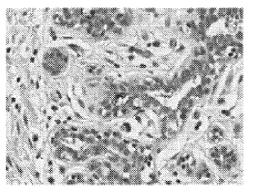
Фиг. 3В

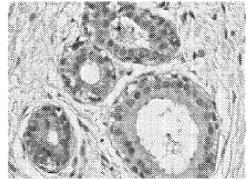


Фиг. 3С



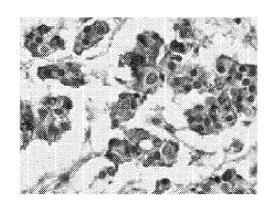
Фиг. 3D

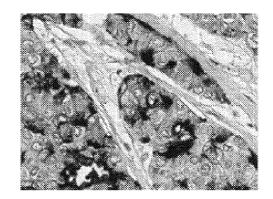




Фиг. 3Е

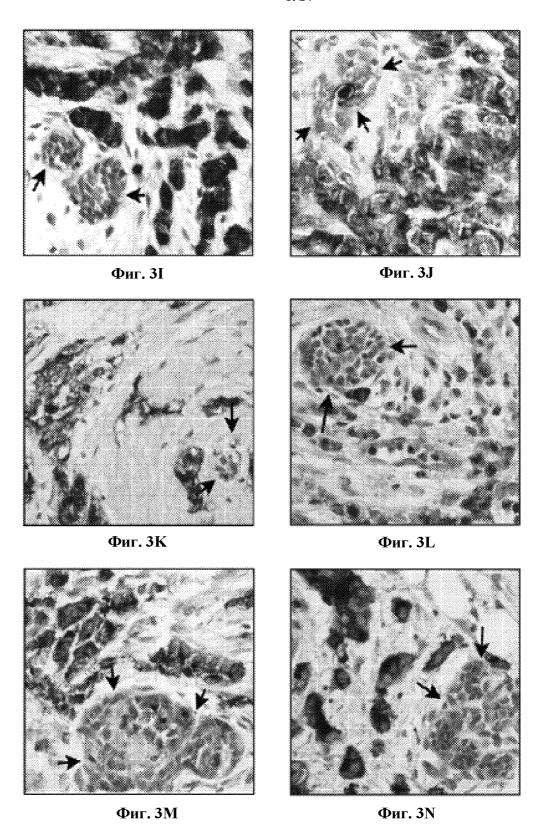


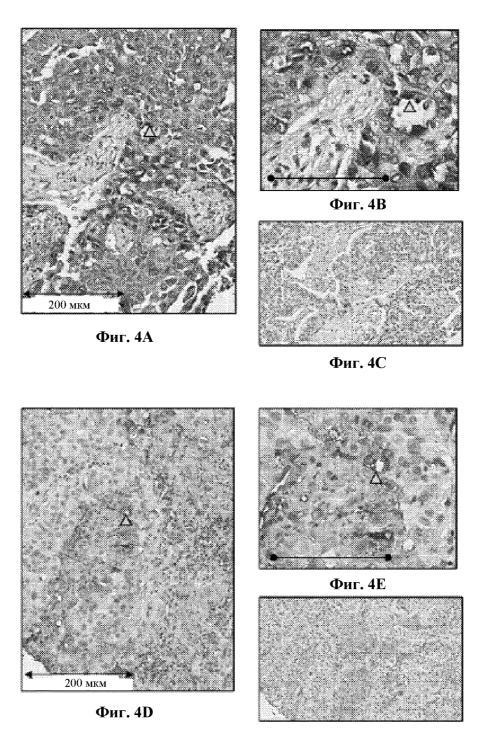




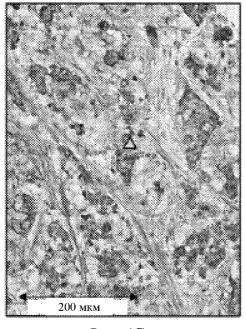
Фиг. **3**G

Фиг. 3Н

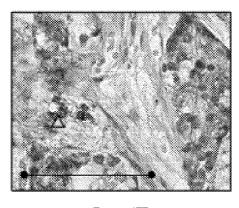




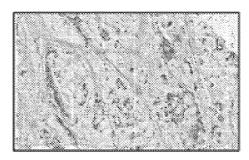
Фиг. 4F



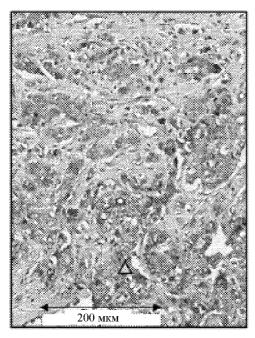
Фиг. 4G



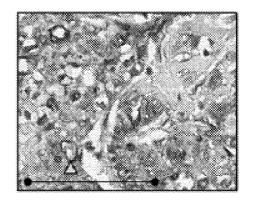
Фиг. 4Н



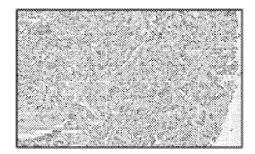
Фиг. 4І



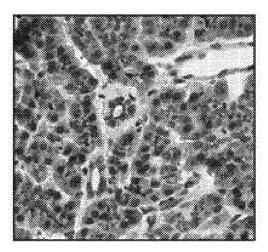
Фиг. 4Ј



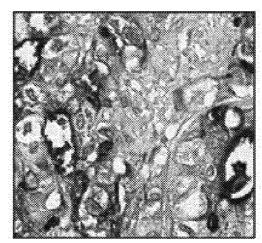
Фиг. 4К



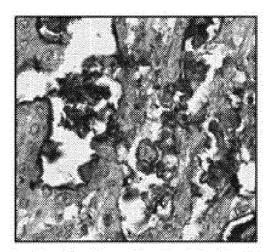
Фиг. 4L



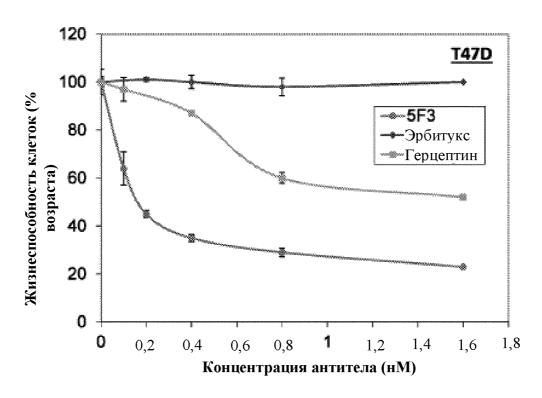
Фиг. 4М



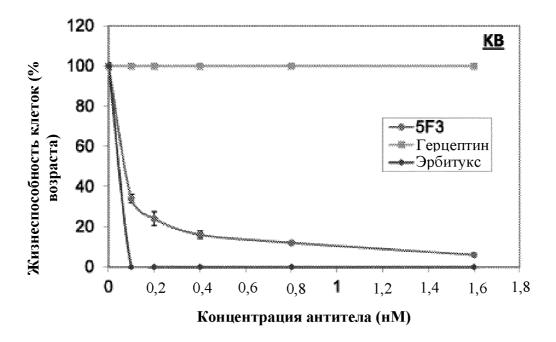
Фиг. 4N



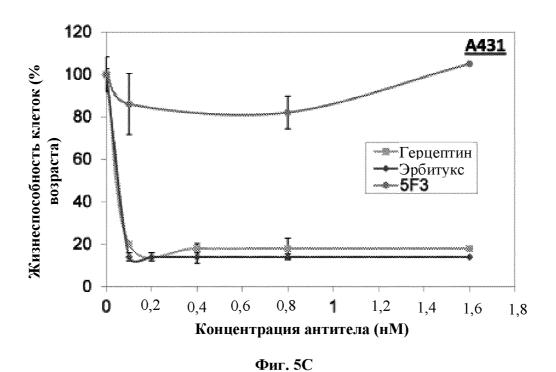
Фиг. 40

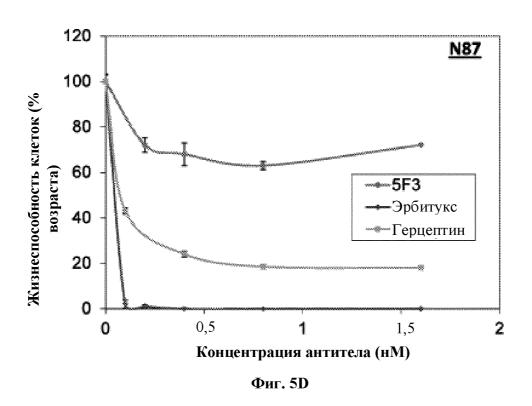


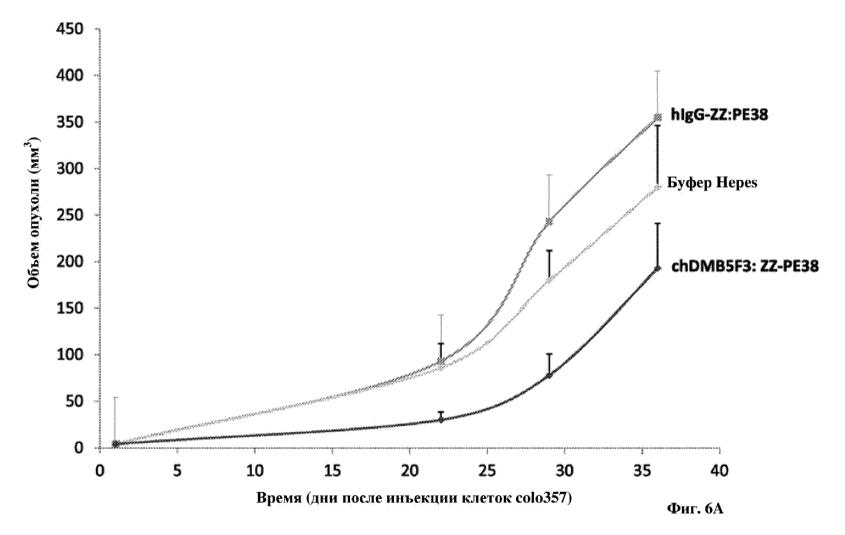
Фиг. 5А

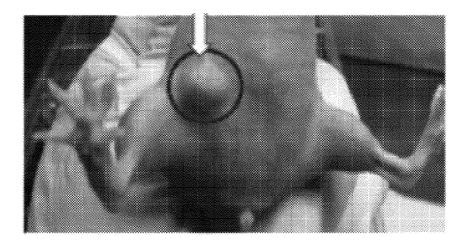


Фиг. 5В

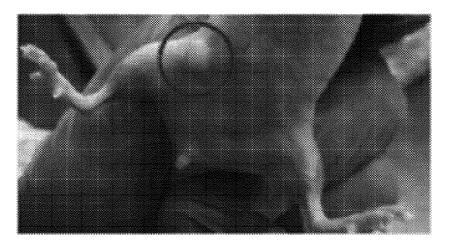




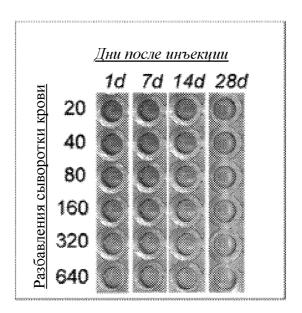




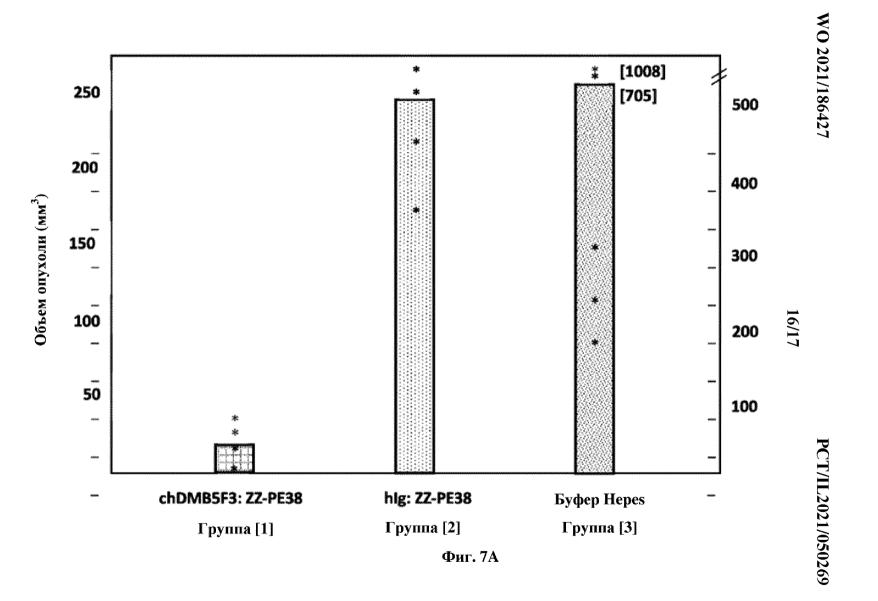
Фиг. 6В

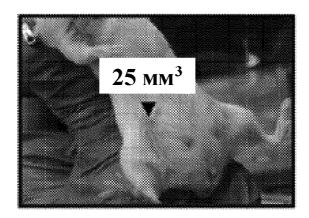


Фиг. 6С

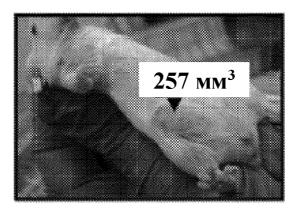


Фиг. 6D

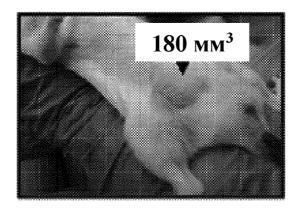




Фиг. 7В



Фиг. 7С



Фиг. 7**D**