



(51) МПК  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C12P 21/08* (2006.01)  
*C12N 1/19* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*C07K 16/2878* (2024.01); *C12N 15/11* (2024.01); *C12N 15/62* (2024.01); *A61K 39/39558* (2024.01); *G01N 33/53* (2024.01); *C07K 16/46* (2024.01); *C12P 21/00* (2024.01); *C12N 1/16* (2024.01); *C12N 1/20* (2024.01); *C12N 5/06* (2024.01); *A61P 35/00* (2024.01); *A61P 37/00* (2024.01); *A61K 2039/505* (2024.01); *C07K 2317/24* (2024.01); *C07K 2317/565* (2024.01); *C07K 2317/73* (2024.01); *C07K 2317/732* (2024.01); *C07K 2317/92* (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2022100311, 29.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.07.2020Дата регистрации:  
22.05.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
30.07.2019 CN 201910695597.9

(43) Дата публикации заявки: 28.08.2023 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 22.05.2024 Бюл. № 15

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 28.02.2022

(86) Заявка РСТ:  
CN 2020/105408 (29.07.2020)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2021/018168 (04.02.2021)Адрес для переписки:  
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов и партнеры"

(72) Автор(ы):

ХУА Хайцин (CN),  
БАО Жуди (CN)

(73) Патентообладатель(и):

ШАНХАЙ ХЭНСОХ БИОМЕДИКАЛ  
КО., ЛТД. (CN),  
ЦЗЯНСУ ХЭНСОХ ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
ГРУП КО., ЛТД. (CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CN 109293772 A, 01.02.2019. WO 2019025983 A1, 07.02.2019. US 2019023801 A1, 24.01.2019. WO 2017083511 A1, 18.05.2017. US 2018171018 A1, 21.06.2018. US 9273141 B2, 01.03.2016. RU 2017133826 A, 13.05.2019. HECHLER T. ET AL. Abstract 77: Preclinical evaluation of HDP-101, an anti-BCMA antibody-drug conjugate. CANCER RESEARCH, 2017, v.77, (см. прод.)

(54) Антитело к ВСМА, его антигенсвязывающий фрагмент и их медицинское применение

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области иммунологии, в частности к антителу к ВСМА, его антигенсвязывающему фрагменту и их медицинскому применению. Предложены антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, его получение, фармацевтическая композиция, цитотоксический конъюгат и их

применение в качестве лекарственного средства для лечения или для обнаружения и диагностики ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний. Антитело обладает высокой аффинностью, высокой специфичностью, низкой иммуногенностью, высокой биологической активностью, значительным противоопухолевым

действием и усиленным эндоцитозом. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в терапии различных ВСМА-опосредованных

заболеваний или состояний. 10 н. и 25 з.п. ф-лы, 10 табл., 9 пр.

(56) (продолжение):  
(13\_Supplement):77, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-77.

R U 2 8 1 9 6 6 0 C 2

R U 2 8 1 9 6 6 0 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)

**2 819 660** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C12P 21/08* (2006.01)  
*C12N 1/19* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/2878* (2024.01); *C12N 15/11* (2024.01); *C12N 15/62* (2024.01); *A61K 39/39558* (2024.01); *G01N 33/53* (2024.01); *C07K 16/46* (2024.01); *C12P 21/00* (2024.01); *C12N 1/16* (2024.01); *C12N 1/20* (2024.01); *C12N 5/06* (2024.01); *A61P 35/00* (2024.01); *A61P 37/00* (2024.01); *A61K 2039/505* (2024.01); *C07K 2317/24* (2024.01); *C07K 2317/565* (2024.01); *C07K 2317/73* (2024.01); *C07K 2317/732* (2024.01); *C07K 2317/92* (2024.01)

(21)(22) Application: 2022100311, 29.07.2020

(24) Effective date for property rights:  
29.07.2020

Registration date:  
22.05.2024

Priority:

(30) Convention priority:  
30.07.2019 CN 201910695597.9

(43) Application published: 28.08.2023 Bull. № 25

(45) Date of publication: 22.05.2024 Bull. № 15

(85) Commencement of national phase: 28.02.2022

(86) PCT application:  
CN 2020/105408 (29.07.2020)

(87) PCT publication:  
WO 2021/018168 (04.02.2021)

Mail address:  
191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i partnery"

(72) Inventor(s):

HUA Haiqing (CN),  
BAO Rudi (CN)

(73) Proprietor(s):

SHANGHAI HANSOH BIOMEDICAL CO.,  
LTD. (CN),  
JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL  
GROUP CO., LTD. (CN)

(54) **ANTI-BCMA ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF AND MEDICAL USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to the field of immunology, in particular to the BCMA antibody, its antigen-binding fragment and their medical application. Disclosed are an anti-BCMA antibody or an antigen-binding fragment thereof, a pharmaceutical composition, a cytotoxic conjugate and use thereof as a medicinal agent for treating or detecting and

diagnosing BCMA-mediated diseases or conditions. Antibody has high affinity, high specificity, low immunogenicity, high biological activity, significant anti-tumour action and enhanced endocytosis.

EFFECT: present invention can find further application in therapy of various BCMA-mediated diseases or conditions.

35 cl, 10 tbl, 9 ex

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителу к ВСМА (антиген созревания В-клеток), его антигенсвязывающему фрагменту и их медицинскому применению. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу к ВСМА и его антигенсвязывающему  
 5 фрагменту, и к содержащей их фармацевтической композиции, для применения для обнаружения или лечения ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В-клетки представляют собой лимфоциты, играющие важную роль в адаптивном гуморальном иммунитете и выработке антител, специфически распознающих антигены.

10 Три подтипа В-клеток представляют собой наивные В-клетки, В-клетки памяти и плазматические клетки. В процессе рекомбинации VDJ два или три фрагмента ДНК, выбранные из геномной библиотеки, рекомбинируются для получения комбинаторного массива переменных доменов антител, таким образом, создается не более 109 уникальных линий В-клеток путем дальнейшего изменения переменных доменов,  
 15 кодируемых В-клетками разных линий, что приводит к антителам, специфичным к уникальным мишеням. В-клетки участвуют во многих заболеваниях. Злокачественная трансформация В-клеток приводит к раку, в том числе к некоторым лимфомам, таким как множественная миелома и лимфома Ходжкина. В-клетки также участвуют в аутоиммунных заболеваниях, включая системную красную волчанку (СКВ) и IgA-нефропатию. Рак, связанный с В-клетками, и аутоиммунные заболевания можно  
 20 рассматривать как нарушение функции В-клеток, поэтому возможной стратегией контроля таких заболеваний является применение антител, нацеленных на патологические В-клетки.

ВСМА (CD269 (антиген 269 кластера дифференцировки) или TNFRSF 17 (рецептор  
 25 17 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли)) является членом суперсемейства рецепторов TNF (фактор некроза опухоли), который представляет собой негликозилированный внутренний мембранный рецептор для лигандов BAFF (активатор В-клеток) и APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию). ВСМА и его соответствующие лиганды могут регулировать различные функции гуморального  
 30 иммунитета, развитие В-клеток и гомеостаз. ВСМА обнаружен в селезенке, лимфатических узлах, тимусе, надпочечниках и печени. Он экспрессируется плазмобластами человека, плазматическими клетками миндалевидной железы, селезенки и костного мозга, а также В-клетками памяти миндалевидной железы и В-клетками герминативного центра, и различные анализы линий В-клеток показывают, что уровень  
 35 экспрессии ВСМА увеличивается после созревания. ВСМА высоко экспрессируется при В-клеточной лимфоме и множественной миеломе.

Антитела к ВСМА описаны, например, в Gras M-P. et al. *Lit Immunol.* 7 (1995) 1093-1106, WO200124811, WO200124812, WO2010104949 и WO2012163805. Антитела к ВСМА и их применение для лечения лимфомы и множественной миеломы описаны, например,  
 40 в WO2002066516 и WO2010104949. WO2013154760 относится к химерному рецептору антигена, содержащему фрагмент, распознающий ВСМА, и фрагмент, активирующий Т-клетки.

В US9273141 описан антигенсвязывающий белок, способный интернализироваться, который специфически связывается с ВСМА и ингибирует связывание BAFF и/или  
 45 APRIL с ВСМА, а также описан конъюгат, содержащий указанный антигенсвязывающий белок и цитотоксический агент.

Согласно настоящему изобретению предложено антитело к ВСМА с высокой аффинностью, высокой специфичностью, низкой иммуногенностью, высокой

биологической активностью, значительным противоопухолевым действием и усиленным эндоцитозом, а также цитотоксический конъюгат, содержащий указанное антитело, и их применение для ингибирования опухолей.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предложено антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемая соль, содержащие:

10 переменную область тяжелой цепи антитела, содержащую по меньшей мере одну HCDR (определяющая комплементарность область тяжелой цепи), представленную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; и

15 переменную область легкой цепи антитела, содержащую по меньшей мере одну LCDR (определяющая комплементарность область легкой цепи), представленную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента содержат:

20 HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3,  
HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4 и  
HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения переменная область легкой цепи антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента содержат:

25 LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6,  
LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7 и  
LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8.

30 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит:

35 HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3,  
HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4 и  
HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5; и  
переменная область легкой цепи содержит:

LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6,  
LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7 и  
LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8.

40 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемая соль, причем антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одну HCDR, выбранную из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, или их мутантные последовательности.

45 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемая соль, причем антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одну LCDR, выбранную из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, или их мутантные последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит:

5 HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3, или ее мутантную последовательность, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4, или ее мутантную последовательность, и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, или ее мутантную последовательность.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по  
10 настоящему изобретению, вариабельная область легкой цепи антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента содержит:

LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, или ее мутантную последовательность, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее мутантную последовательность, и  
15 LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее мутантную последовательность.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит:

20 HCDR1, представленную в мутантной последовательности SEQ ID NO: 3, HCDR2, представленную в мутантной последовательности SEQ ID NO: 4 и HCDR3, представленную в мутантной последовательности SEQ ID NO: 5; и вариабельная область легкой цепи содержит:

LCDR1, представленную в мутантной последовательности SEQ ID NO: 6,  
25 LCDR2, представленную в мутантной последовательности SEQ ID NO: 7 и LCDR3, представленную в мутантной последовательности SEQ ID NO: 8.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предложены антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент или его фармацевтически приемлемая соль, как описано выше, где мутантная последовательность имеет от 1 до  
30 3 аминокислотных мутаций в области CDR (определяющая комплементарность область), которые оптимизируют активность антитела, стабильность антитела или снижение иммуногенности.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышьеиное антитело.

35 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерное антитело.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое антитело.

40 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по  
45 настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, полученную из человеческого IgG1 (иммуноглобулин G1) или его варианта, IgG2 или его варианта, IgG3 или его варианта или IgG4 или его варианта.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, полученную из  
5 человеческого IgG1, IgG2 или IgG4.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи IgG1, с повышенной  
10 ADCC-токсичность (антителозависимая клеточная цитотоксичность) после аминокислотной мутации.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент  
15 дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID: 22.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент  
20 дополнительно содержат константную область легкой цепи, полученную из человеческой к-цепи или ее варианте, λ-цепи или ее варианта.

В предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент  
25 дополнительно содержат константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID: 23.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА, или его антигенсвязывающий фрагмент,  
30 или его фармацевтически приемлемая соль содержат переменную область тяжелой цепи, представленную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой по  
35 настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтически приемлемой соли  
40 по настоящему изобретению, антитело к ВСМА, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержат переменную область легкой цепи, представленную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли  
45 по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА

или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

5 В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, идентичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

10 В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

15 В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, идентичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

20 В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9 и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 12.

25 В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 9 или идентичной ей по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, и вариабельная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 12 или идентичной ей по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%  
30 или 99%.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10 и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 13.

35 В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 10 или идентичной ей по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, и вариабельная область легкой цепи выбрана  
40 из SEQ ID NO: 13 или идентичной ей по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 11 и вариабельную область легкой  
45 цепи, представленную в SEQ ID NO: 14.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная

область тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 11 или идентичной ей по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, и переменная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 14 или идентичной ей по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

5 В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 15 и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 18.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и  
10 легкую цепь, причем тяжелая цепь выбрана из SEQ ID NO: 15 или идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, и легкая цепь выбрана из SEQ ID NO: 18 или идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь,  
15 представленную в SEQ ID NO: 16 и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 19.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь выбрана из SEQ ID NO: 16 или идентичной ей по  
20 меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, и легкая цепь выбрана из SEQ ID NO: 19 или идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 17 и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 20.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и  
25 легкую цепь, причем тяжелая цепь выбрана из SEQ ID NO: 17 или идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, и легкая цепь выбрана из SEQ ID NO: 20 или идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен  
30 полинуклеотид, кодирующий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена клетка-  
35 хозяин, в которую введен или которая содержит вектор экспрессии по настоящему изобретению.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин  
40 представляет собой бактерию, предпочтительно *Escherichia coli*.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин представляет собой дрожжи, предпочтительно *Pichia pastoris*.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, предпочтительно клетку СНО (яичник  
45 китайского хомячка) или клетку НЕК293 (эмбриональная почка человека).

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения антитела к ВСМА, включающий этапы:

культивирования клетки-хозяина по настоящему изобретением;

выделения антитела из культуры; и  
очистки антител.

Способ получения антитела к ВСМА, предложенного по настоящему изобретению, где:

5 культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению, предпочтительно клетки НЕК293;

выделение антитела из культуры, предпочтительно из культуральной жидкости; и очистка антитела аффинной хроматографией, предпочтительно методом хроматографии.

10 В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению, а также фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

15 В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен реагент для обнаружения или диагностики, содержащий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению.

20 В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор для обнаружения или диагностики, содержащий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению, а также меченое вторичное антитело, буфер и субстрат, пригодный для обнаружения или диагностики.

25 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор для обнаружения или диагностики, содержащий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению, и один или более реагентов, способных обнаруживать связывание антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента с ВСМА.

30 В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемая соль, или содержащая их фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению, для применения для лечения или профилактики ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний.

35 В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей их фармацевтической композиции по настоящему изобретению, для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний.

40 В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемая соль, или реагент для обнаружения или диагностики, содержащий указанные объекты по настоящему изобретению, для применения для обнаружения, диагностики и прогнозирования ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний.

45 В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтически приемлемой соли, или реагента для обнаружения или диагностики, содержащего указанные объекты по настоящему изобретению, для получения набора для обнаружения, диагностики и прогнозирования ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний.

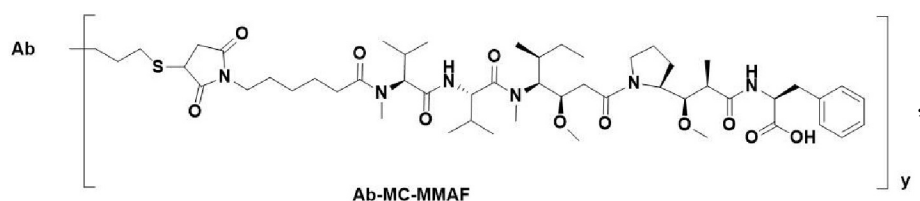
В частном варианте осуществления ВСМА-опосредованное заболевание или

состояние представляет собой рак, предпочтительно рак, экспрессирующий ВСМА, более предпочтительно лимфому, лейкоз или миелому, наиболее предпочтительно множественную миелому.

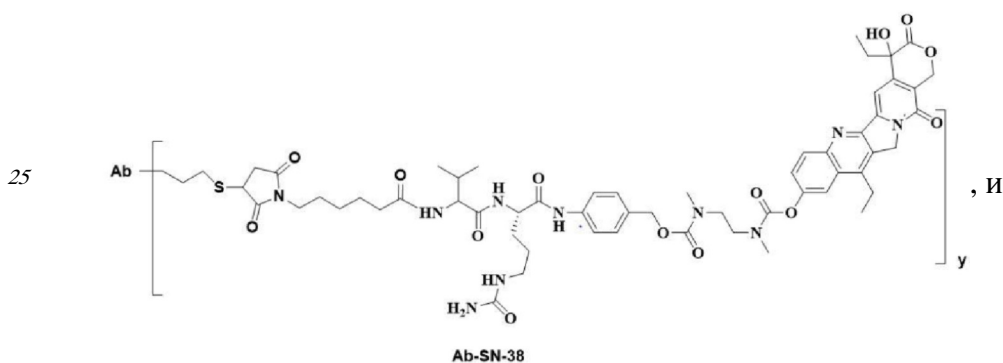
В частном варианте осуществления ВСМА-опосредованное заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, предпочтительно красную волчанку, IgA-нефropатию и ревматический артрит.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, связанный с цитотоксическим агентом, предпочтительно где цитотоксический агент выбран из группы, состоящей из MMAF (монометил ауристин F), SN-38 (7-этил-10-гидроксикамптотедин) и эксатекана (Exatescan). Кроме того, предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению имел структурную формулу, выбранную из группы, состоящей из:

15

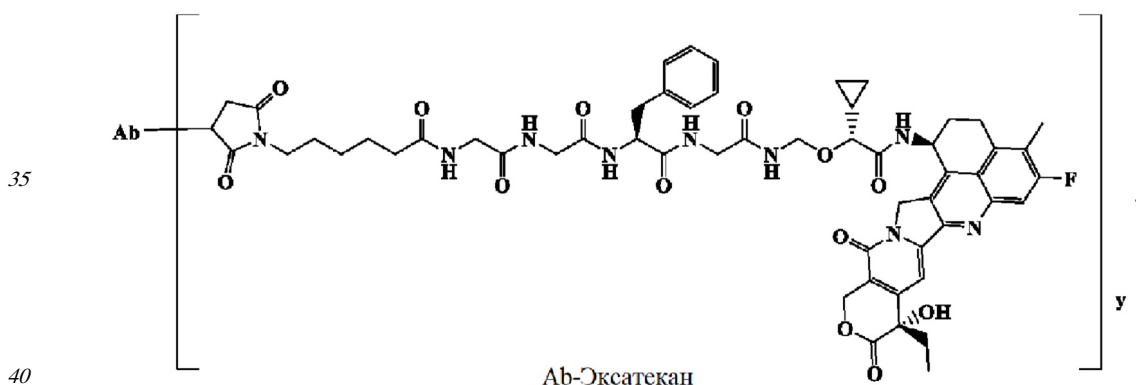


20



25

30



35

40

где Ab представляет собой антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше по настоящему изобретению.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению для получения лекарственного препарата для лечения ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний, причем ВСМА-опосредованное заболевание или состояние выбрано группы, состоящей из рака и аутоиммунного заболевания, предпочтительно рак представляет собой рак, экспрессирующий ВСМА, более предпочтительно лимфому, лейкоз или миелому,

45

наиболее предпочтительно множественную миелому. Предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из красной волчанки, IgA-нефропатии и ревматического артрита.

5 В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения ВСМА-опосредованных заболеваний или состояний у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, содержащей его фармацевтической композиции или конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

10 Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем изобретении, обладают высокой аффинностью, высокой специфичностью, низкой иммуногенностью, высокой биологической активностью и значительным противоопухолевым действием. В то же время, антитела по настоящему изобретению могут быть быстро интернализированы после связывания с антигеном ВСМА, что  
15 указывает на то, что они подходят для применения в форме ADC (конъюгат антитело-лекарственное средство) для терапевтических применений или других применений, требующих быстрой интернализации. Антитела по настоящему изобретению в форме ADC могут эффективно уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие ВСМА.

#### Подробное описание Термины

20 Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, некоторые технические и научные термины конкретным образом определены ниже. Если иное четко не определено где-либо в данном документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

25 Трехбуквенные коды и однобуквенные коды аминокислот, используемые в настоящем изобретении, описаны в J. Biol. Chem., 243, стр. 3558 (1968).

Термин «антитело», описанный в настоящем описании, относится к иммуноглобулину, который представляет собой тетрапептидную цепную структуру, состоящую из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, связанных межцепочечными  
30 дисульфидными связями. Аминокислотный состав и порядок расположения константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина различны, поэтому их антигенность также различна. В соответствии с этим иммуноглобулины можно разделить на пять типов или известных как изотипы иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, и соответствующие им тяжелые цепи представляют собой  $\mu$ -цепь,  $\delta$ -цепь,  $\gamma$ -цепь,  $\alpha$ -цепь  
35 и  $\epsilon$ -цепь, соответственно. Один и тот же тип Ig может быть отнесен к разным подклассам в соответствии с разницей в аминокислотном составе шарнирной области, а также в количестве и положении дисульфидных связей тяжелой цепи. Например, IgG можно разделить на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкая цепь классифицируется как  $\kappa$ -цепь или  $\lambda$ -цепь в соответствии с отличием в константной области. Каждый из пяти типов Ig может  
40 иметь  $\kappa$ -цепь или  $\lambda$ -цепь.

В настоящем изобретении легкая цепь антитела по настоящему изобретению может дополнительно содержать константную область легкой цепи, которая включает человеческую или мышиную  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепь или их варианты.

В настоящем описании тяжелая цепь антитела по настоящему изобретению может  
45 дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, которая включает человеческие или мышинные IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их варианты.

Последовательность приблизительно из 110 аминокислот вблизи N-конца тяжелой и легкой цепей антитела сильно варьирует и представляет собой вариабельную область

(V-область); остальная аминокислотная последовательность вблизи С-конца относительно стабильна и представляет собой константную область (С-область). Вариабельная область включает 3 гипервариабельные области (HVR) и 4 каркасные области (FR) с относительно консервативными последовательностями. Три гипервариабельные области, которые определяют специфичность антитела, также известны как области, определяющие комплементарность (CDR). Каждая из вариабельной области легкой цепи (VL) и вариабельной области тяжелой цепи (VH) состоит из 3 областей CDR и 4 областей FR. Порядок расположения от amino-конца к карбоксильному концу следующий: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Три области CDR легкой цепи относятся к LCDR1, LCDR2 и LCDR3, три области CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Количество и положение аминокислотных остатков CDR области VL и области VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению соответствуют известным критериям нумерации по Кабату и критериям определения по базам данных на веб-сайтах AbM или IMGТ и по Кабату (<http://bioinf.org.uk/abs/>).

Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «АПК» представляет собой клетку, которая презентует чужеродный антиген в комплексе с ГКГС (главный комплекс гистосовместимости) на своей поверхности. Т-клетки используют рецепторы Т-клеток (TCR) для распознавания таких комплексов. Примеры АПК включают, без ограничений, дендритные клетки (ПК), мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), моноциты, В-лимфоциты и дендритные клетки, происходящие из моноцитов.

Термин «презентирование антигена» относится к процессу захвата антигенов АПК и обеспечения возможности их узнавания Т-клетками, например, в качестве компонента конъюгата ГКГС-I/ГКГС-II.

Термин «ВСМА» включает любой вариант или изоформу ВСМА, которые естественным образом экспрессируются клетками. Антитела по настоящему изобретению могут перекрестно реагировать с ВСМА, полученным от видов, отличных от человека. Альтернативно, антитела также могут быть специфичными для ВСМА человека и могут не проявлять перекрестной реактивности с ВСМА, полученным от других видов. ВСМА или любой его вариант или изоформа могут быть выделены из клеток или тканей, экспрессирующих его в природе, или получены с помощью рекомбинантных методов с использованием методов, обычно используемых в данной области, и тех, которые описаны в настоящем документе. Предпочтительно антитело к ВСМА нацелено на ВСМА человека, который имеет нормальный профиль гликозилирования.

Термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных методов, и применяемые методы и способы хорошо известны в данной области, такие как:

1. антитела, выделенные из трансгенных и трансхромосомных животных (например, мышей) с генами иммуноглобулина человека или из полученных из них гибридом;
2. антитела, выделенные из клеток-хозяев, трансформированных для экспрессии антител, таких как трансфектомы;
3. антитела, выделенные из библиотек рекомбинантных комбинаторных человеческих антител; и
4. антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные такими способами, как сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат вариабельную область и

константную область, в которых используются специфические последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но также содержащие последующие перестройки и мутации, такие как те, которые происходят во время созревания антитела.

5 Термин «мышинное антитело» в настоящем изобретении представляет собой моноклональное антитело к ВСМА человека, полученное в соответствии со знаниями и навыками в данной области. Во время получения испытываемому вводят антиген к  
10 ВСМА, а затем выделяют гибридомы, экспрессирующие антитело с желаемой последовательностью или функциональными свойствами. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мышинное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать константную область легкой цепи \*к-, \*-цепи мыши или их варианта или дополнительно содержать константную область тяжелой цепи мышинного IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их вариант.

Термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие варибельную область  
15 и константную область последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями  
20 *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (таких как мыши), были привиты к человеческим каркасным последовательностям (а именно, «гуманизированные антитела»).

Термин «гуманизированное антитело», также известное как антитело с привитым  
25 CDR, относится к антителу, полученному путем прививания последовательностей CDR мыши в каркасные области варибельной области человеческого антитела. Гуманизированное антитело может преодолеть недостатки сильного иммунного ответа, индуцированного химерными антителами, которые несут большое количество белковых компонентов мыши. Чтобы избежать снижения активности, вызванного снижением  
30 иммуногенности, варибельные области человеческих антител могут быть подвержены минимальной обратной мутации для поддержания активности.

Термин «химерное антитело» представляет собой антитело, образованное путем слияния варибельной области антитела мыши с константной областью человеческого антитела, что может облегчать иммунный ответ, индуцированный мышинным антителом.  
35 Создание химерного антитела требует сначала создания гибридомы, которая секретирует специфичное моноклональное антитело мыши, затем клонирования гена варибельной области из клеток мышинной гибридомы, а затем, при необходимости, клонирования гена константной области человеческого антитела, связывая ген варибельной области мыши с геном константной области человека для формирования химерного гена,  
40 который встраивают в вектор экспрессии человека и, наконец, экспрессирования молекулы химерного антитела в эукариотической промышленной системе или прокариотической промышленной системе. Константная область человеческого антитела может быть выбрана из константной области тяжелой цепи человеческих IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианта, предпочтительно константной области тяжелой цепи человеческих IgG1, IgG2 или IgG4, или константной области тяжелой цепи  
45 IgG1 с усиленной ADCC после аминокислотной мутации.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела и аналогу антитела, которые обычно содержат по меньшей мере

часть антигенсвязывающей области или вариабельной области (например, одну или более CDR) исходного антитела. Фрагмент антитела сохраняет, по меньшей мере, часть специфичности связывания исходного антитела. Как правило, когда активность представлена в виде молей, фрагмент антитела сохраняет по меньшей мере 10% исходной связывающей активности. Предпочтительно фрагмент антитела сохраняет по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или более аффинности связывания исходного антитела с мишенью. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> (Fab - антигенсвязывающий фрагмент), фрагмент Fv (вариабельный фрагмент), линейное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело, доменное антитело и мультиспецифическое антитело. Обзор сконструированных вариантов антител представлен в Holliger and Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136.

«Fab-фрагмент» состоит из одной легкой цепи и CH1 (домен 1 константной области тяжелой цепи) и вариабельных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

Область «Fc» (кристаллизующийся фрагмент) содержит два фрагмента тяжелой цепи антитела, содержащие домены CH1 и CH2. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и за счет гидрофобного взаимодействия домена CH3.

«Fab'-фрагмент» содержит легкую цепь и часть тяжелой цепи, включающую домен VH (домен вариабельной области тяжелой цепи), домен CH1 и область между доменами CH1 и CH2, так что межцепочечные дисульфидные связи могут образовываться между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов, тем самым образуя молекулу F(ab')<sub>2</sub>.

«Фрагмент F(ab')<sub>2</sub>» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, включающие часть константной области между доменами CH1 и CH2, тем самым образуя межцепочечные дисульфидные связи между двумя тяжелыми цепями. Следовательно, фрагмент F(ab')<sub>2</sub> состоит из двух фрагментов Fab', удерживаемых вместе дисульфидными связями между двумя тяжелыми цепями.

«Fv-область» содержит вариабельные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи, но не содержит константных областей.

Термин «мультиспецифическое антитело» используется в самом широком смысле, включая антитела, обладающие специфичностью в отношении нескольких эпитопов. Данные мультиспецифические антитела включают, без ограничений: антитела, содержащие вариабельную область тяжелой цепи VH и вариабельную область легкой цепи VL, где единица VH-VL обладает специфичностью в отношении нескольких эпитопов; антитела с двумя или более областями VL и VH, каждая единица VH-VL связывается с разными мишенями или разными эпитопами одной и той же мишени; антитела с двумя или более отдельными вариабельными областями, причем каждая отдельная вариабельная область связывается с разными мишенями или разными эпитопами одной и той же мишени; полноразмерные антитела, фрагменты антител, диатела, биспецифические диатела и триатела, ковалентно или нековалентно связанные фрагменты антител и т.п.

Термин «одноцепочечное антитело» представляет собой одноцепочечный рекомбинантный белок, образованный путем связывания вариабельной области тяжелой цепи VH и вариабельной области легкой цепи VL антитела через линкерный пептид. Это минимальный фрагмент антитела с полным антигенсвязывающим сайтом.

Термин «фрагмент доменного антитела» представляет собой фрагмент иммуноглобулина, обладающий иммунологическими функциональными фрагментами,

который содержит либо вариабельную область тяжелой цепи, либо вариабельную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более областей VH ковалентно связаны пептидным линкером с образованием фрагмента двухвалентного домена антитела. Две области VH фрагмента антитела с двухвалентным доменом могут быть

5 нацелены на один и тот же антиген или на разные антигены.

Термин «связывание с ВСМА» в настоящем изобретении относится к способности взаимодействовать с ВСМА человека.

Термин «антигенсвязывающий сайт» в настоящем изобретении относится к трехмерному сайту, который распознается антителом или антигенсвязывающим

10 фрагментом по настоящему изобретению.

Термин «эпитоп» относится к участку на антигене, который специфически связывается с иммуноглобулином или антителом. Эпитопы могут быть образованы соседними аминокислотами или несмежными аминокислотами, которые соприкасаются в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные соседними аминокислотами, обычно

15 сохраняются после воздействия денатурирующего растворителя, в то время как эпитопы, образованные третичной укладкой, обычно исчезают после обработки денатурирующим

растворителем. Эпитопы обычно содержат по меньшей мере 3-15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какой эпитоп

20 связан с данным антителом, хорошо известны в данной области, включая иммуноблоттинг, анализ обнаружения методом иммунопреципитации и т.п. Способы определения пространственной конформации эпитопа включают методы, известные в данной области, и способы, описанные в настоящем документе, например, рентгеноструктурный анализ, двумерный ядерно-магнитный резонанс и т.п.

Термины «специфически связывается» и «селективно связывается», используемые в

25 настоящем описании, относятся к связыванию антитела с эпитопом на заданном антигене. Как правило, когда рекомбинантный ВСМА человека используется в качестве анализа, а антитело используется в качестве лиганда, при измерении с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе, антитело

связывается с заданным антигеном при равновесной константе диссоциации (KD)

30 примерно менее  $10^{-7}$  М или даже меньше, и его аффинность связывания с заданным антигеном по меньшей мере в два раза выше, чем его аффинность связывания с

неспецифическими антигенами (такими как BSA (бычий сывороточный альбумин) и т.п.), отличными от заданного антигена или близкородственного антигена. Термин

«антитело, которое распознает антиген» может быть использован здесь взаимозаменяемо

35 с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

Термин «перекрестная реакция» относится к способности антител по настоящему изобретению связываться с ВСМА, полученными из разных видов. Например, антитело

по настоящему изобретению, которое связывается с ВСМА человека, может также связываться с ВСМА другого вида. Перекрестную реактивность измеряют в анализах

40 связывания (например, SPR и ELISA (иммуноферментный анализ)) путем обнаружения специфической реактивности с очищенным антигеном или связывания или

функционального взаимодействия с клетками, которые физиологически экспрессируют ВСМА. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные

анализы связывания, как описано в настоящем документе, например, анализ

45 поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или проточную цитометрию.

Термины «ингибирование» или «блокировка» могут использоваться взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование.

Ингибирование/блокирование лиганда предпочтительно снижает или изменяет

нормальный уровень или тип активности, который имеет место, когда связывание лиганда происходит без ингибирования или блокирования. Под ингибированием и блокированием также подразумевается любое измеримое снижение аффинности связывания лиганда при контакте с антителом к ВСМА по сравнению с лигандом, не контактирующим с антителом к ВСМА.

Предполагается, что термин «ингибирование роста» (например, клеток) включает любое измеримое снижение роста клеток.

Термины «индуцированный иммунный ответ» и «усиленный иммунный ответ» могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к иммунному ответу, стимулируемому (т.е. пассивному или адаптивному) специфическим антигеном. Термин «индуцировать» для индуцирования CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность) или ADCC относится к стимуляции конкретного механизма прямого уничтожения клеток.

«ADCC» в настоящем изобретении, т.е. антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, означает, что клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, непосредственно убивают клетки-мишени, покрытые антителами, путем распознавания Fc-сегмента антител. Действие ADCC антител может быть усилена, уменьшена или устранена путем модификации Fc-сегмента IgG. Модификация относится к мутации в константной области тяжелой цепи антитела.

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны и могут быть найдены в предшествующем уровне техники, например, в *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, главы 5-8 и 15. Например, мышей можно иммунизировать ВСМА человека или его фрагментом, и полученные антитела можно ренатурировать и очистить, а также секвенировать аминокислоты с использованием обычных способов. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть получены с использованием общепринятых способов. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению генетически сконструированы для добавления одной или более областей FR человека к нечеловеческим областям CDR. Последовательности зародышевой линии FR человека можно получить с веб-сайта ImmunoGeneTics (IMGT) <http://imgt.cines.fr> или из *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN012441351.

Сконструированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть получены и очищены обычными способами. Последовательности кДНК (комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота) соответствующих антител можно клонировать и рекомбинировать в векторы экспрессии GS (глутаминовая синтетаза). Векторы экспрессии рекомбинантного иммуноглобулина могут стабильно трансфецировать клетки СНО. В качестве более рекомендуемого предшествующего уровня техники системы экспрессии млекопитающих могут приводить к гликозилированию антител, особенно на высококонсервативном N-конце Fc-области. Стабильные клоны получают путем экспрессии антител, которые специфически связываются с человеческим антигеном. Положительные клоны размножаются в бессывороточной среде биореакторов для получения антител. Культуральная жидкость, в которую секретируются антитела, может быть очищена и собрана обычными способами. Антитела могут быть отфильтрованы и концентрированы общепринятыми способами. Растворимые смеси и мультимеры также могут быть удалены общепринятыми способами, например молекулярными ситами и ионным обменом. Полученный продукт необходимо немедленно заморозить, например, при  $-70^{\circ}\text{C}$ , или лиофилизировать.

Антитело по настоящему изобретению относится к моноклональному антителу.

Моноклональное антитело (mAb) в настоящем изобретении относится к антителу, полученному из одного клонированного клеточного штамма, который не ограничивается эукариотическим, прокариотическим или фагово-клонированным клеточным штаммом. Моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены путем рекомбинации с использованием, например, гибридной технологии, технологии рекомбинации, технологии фагового дисплея, синтетической технологии (такой как CDR-прививание) или других существующих технологий.

«Введение», «вводить» и «лечение» применительно к животным, людям, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к контактированию экзогенного лекарственного препарата, терапевтического средства, диагностического средства или композиции с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями.

«Введение», «вводить» и «лечение» могут относиться, например, к лечению, фармакокинетике, диагностике, исследовательским и экспериментальным методам.

Лечение клеток включает приведение в контакт реагентов с клетками и приведение в контакт реагентов с жидкостями, где жидкости контактируют с клетками. «Введение», «вводить» и «лечение» также относятся к лечению, например, клеток реагентами, диагностическими агентами, связующими композициями или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Лечение» применительно к людям, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтическим, предупредительным или профилактическим мерам, исследовательским и диагностическим применениям.

«Лечение» относится к введению внутреннего или наружного терапевтического агента, например, содержащего любое из антител по настоящему изобретению, пациенту, имеющему один или более симптомов заболевания, на которые, как известно,

терапевтический агент оказывает терапевтическое действие. Как правило, терапевтическое средство вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у субъекта или популяции, получающих лечение, либо для индукции регрессии таких симптомов, либо для ингибирования развития таких симптомов до любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического агента, которое является эффективным для облегчения любого конкретного симптома заболевания (также называемое «терапевтически эффективным количеством»), может варьироваться в зависимости от множества факторов, например, от состояния заболевания, возраста и массы тела пациента, и способность лекарственного средства оказывать желаемый терапевтический эффект у больного. Облегчение симптомов заболевания можно определить с помощью любых методов клинических испытаний, обычно используемых врачами или другими медицинскими работниками для оценки тяжести или прогрессирования симптомов. Несмотря на то, что варианты осуществления настоящего изобретения (например, способы лечения или продукты) могут быть неэффективными для облегчения каждого интересующего симптома заболевания, они должны уменьшать интересующий симптом заболевания у статистически значимого числа пациентов, что определяется любыми методами статистического тестирования, такие как *t*-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, *U*-критерий Манна и Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (*H*-критерий), критерий Джонкхира-Терпстры и критерий Уилкоксона.

Термин «состоящий по существу из...» или его вариант, используемый в описании и формуле изобретения, означает, что он содержит все описанные элементы или группы элементов и необязательно содержит другие элементы, сходные или отличные по своей природе с описанными элементами, что существенно не изменят основные или новые

свойства данного режима дозирования, метода или композиции.

Термин «встречающийся в природе», применяемый к определенному объекту в настоящем изобретении, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная последовательность или полинуклеотидная  
5 последовательность, существующая в организмах (включая вирусы), которые могут быть выделены из природных источников и не были преднамеренно искусственно модифицированы в лаборатории, являются встречающимися в природе.

«Эффективное количество» включает количество, достаточное для облегчения или предотвращения симптома или состояния медицинского состояния. Эффективное  
10 количество также относится к количеству, достаточному для возможности или облегчения диагностики. Эффективное количество для конкретного пациента или ветеринарного субъекта может варьироваться в зависимости от следующих факторов: таких как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, способ, путь и доза введения лекарственного средства, а также тяжесть побочных эффектов.  
15 Эффективное количество может быть максимальной дозировкой или схемой дозирования, позволяющей избежать значительных побочных или токсических эффектов.

«Экзогенные» относятся к веществам, вырабатываемым вне организмов, клеток или человеческого тела в зависимости от фона.

«Эндогенные» относятся к веществам, вырабатываемым внутри клеток, организмов  
20 или человеческого тела в зависимости от происхождения.

«Идентичный» относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Когда положения в двух выровненных последовательностях заняты одним и тем же основанием или субъединицей мономера аминокислоты, например, каждое положение двух молекул  
25 ДНК занято аденином, тогда молекулы считаются гомологичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество положений для сравнения  $\times 100\%$ .  
Например, при оптимальном выравнивании последовательностей, если 6 из 10 позиций  
30 в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то эти две последовательности гомологичны на 60%. Как правило, выравнивание совершено, когда две последовательности выравнивают для получения максимального процента идентичности.

Используемые в настоящем документе выражения «клетка», «клеточная линия» и  
35 «клеточная культура» могут использоваться взаимозаменяемо, и все такие названия включают их потомство. Следовательно, слова «трансформант» и «трансформированная клетка» включают первичные тестовые клетки и полученные из них культуры независимо от количества пассажей. Также следует понимать, что из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций все потомство не может быть абсолютно одинаковым по  
40 содержанию ДНК. Включено мутантное потомство с той же функцией или биологической активностью, что и в исходных трансформированных клетках. Это хорошо видно из контекста, когда упоминаются разные наименования.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное впоследствии, может, но не обязательно, произойти, и описание включает  
45 случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «необязательно содержащий от 1 до 3 переменных областей тяжелой цепи антитела» означает, что переменные области тяжелой цепи антитела конкретных последовательностей могут, но не обязательно должны присутствовать.

«Фармацевтическая композиция» означает, что она включает одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, а также другие компоненты, такие как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Функция фармацевтической композиции состоит в том, чтобы облегчить введение соединения в организм, что способствует абсорбции активного ингредиента, необходимой для проявления биологической активности.

«Лекарственная нагрузка» (DAR) представлена у, который представляет собой среднее количество цитотоксических препаратов на одно антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство. Лекарственная нагрузка (DAR) конъюгата антитело-лекарственное средство, полученного в результате реакции связывания, может быть охарактеризована обычными способами, например, масс-спектрометрией, HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография) и ELISA. С помощью этих методов можно определить количественное распределение конъюгата антитело-лекарственное средство по значению у.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение будет дополнительно описано со ссылкой на следующие примеры, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Экспериментальные способы без конкретных условий в примерах по настоящему изобретению обычно следуют обычным условиям, таким как *Antibodies: A Laboratory Manual and Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor; или в соответствии с условиями, рекомендованными производителем сырья или продукта.

Реагенты без указания источника являются обычными реагентами, приобретаемыми на рынке.

#### Пример 1: Получение антигенов

Белок, кодирующий His-меченный (His-полигистидин) внеклеточный домен ВСМА человека (ВСМА-His), синтезируют SinoBiologics (кат. №: 10620-H08H).

Последовательность ВСМА-His:

MLQ MAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

NNNNNNNNNN

SEQ ID NO: 21

Пример 2: Получение мышинных гибридом и последовательностей антител В общей сложности 5 самок мышей Balb/c и 5 A/J в возрасте 10 недель иммунизируют человеческим антигеном ВСМА-His. Используют полный адъювант Фрейнда Sigma (CFA) и неполный адъювант Фрейнда Sigma (IFA). Иммуноген и иммунный адъювант тщательно смешивают в соотношении 1:1 и эмульгируют с получением стабильной жидкости типа «вода в масле». Инъекционная доза составляла 25 мкг/200 мкл/мышь.

Таблица 1. Схема иммунизации

День 1	Первая иммунизация, полный адъювант Фрейнда
День 21	Вторая иммунизация, неполный адъювант Фрейнда
День 35	Третья иммунизация, неполный адъювант Фрейнда
День 42	Забор крови и определение титра сыворотки (кровь после 3-х иммунизаций)
День 49	Четвертая иммунизация, неполный адъювант Фрейнда
День 56	Забор крови и определение титра сыворотки (кровь после 4-х иммунизаций)

Титр сыворотки и способность связываться с антигенами поверхности клетки сыворотки иммунизированных мышей оценивают с помощью непрямого метода ELISA по Примеру 3. Начало слияния клеток определяют по результатам определения титра (разведение более 100000 раз). Иммунизированных мышей с высоким титром сыворотки, аффинностью и связыванием FACS отбирают для одной заключительной иммунизации и затем умерщвляют. Клетки селезенки сливают с клетками миеломы SP2/0 и высеивают для получения гибридом. Интересующие гибридомы подвергают скринингу с помощью непрямого ELISA и устанавливают их как моноклональные клеточные штаммы методом серийных разведений. Полученные антитело-положительные штаммы подвергают дополнительному скринингу с помощью непрямого ELISA, чтобы отобрать гибридомы, которые связываются с рекомбинантным белком. Собирают гибридомные клетки в логарифмической фазе роста. РНК (рибонуклеиновая кислота) экстрагируют тризолом (Invitrogen, 15596-018) и подвергают обратной транскрипции (обратная транскриптаза PrimeScript™, Takara #2680A). кДНК, полученную путем обратной транскрипции, амплифицируют с помощью ПЦР с использованием набора мышинных Ig-праймеров (Novagen, TB326 Rev.B 0503). Наконец, была получена последовательность мышинового антитела M1.

Последовательности переменных областей тяжелой (HCVR) и легкой цепей (LCVR) мышинового моноклонального антитела M1 следующие:

M1 HCVR

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYSFSDYEMHWVRQTPVHGLEWIGGIHP  
GSGGSAYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRLDYGYSWAWFPY  
WGQGTLVTVSA

SEQ ID NO:1

M1 LCVR

EILLTQSPAIIIVTSPGEEKVTITCSASSSVIYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLAGVPL  
ARFSGSGSGTFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:2

Таблица 2. Последовательности CDR переменных областей тяжелой и легкой цепей мышиного моноклонального антитела M1

Name	Sequence	NO.
HCDR1	GYSFSDYEMH	SEQ ID NO: 3
HCDR2	GIHPGSGGSAYNQKFKG	SEQ ID NO: 4
HCDR3	TRLDYGYSWAWFPY	SEQ ID NO: 5
LCDR1	SASSSVIYMN	SEQ ID NO: 6
LCDR2	GISNLAS	SEQ ID NO: 7
LCDR3	QQRSSYPLT	SEQ ID NO: 8

Примеры 3: Способ определения связывающей активности антител *in vitro*. (1)

Непрямой анализ связывания ELISA *in vitro*:

Белок ВСМА His (Sino Biological Inc., кат.№10620-H08H) разбавляют PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) с pH 7,4 до концентрации 1 мкг/мл, добавляют в 96-луночный планшет для высокоаффинного ELISA в количестве 100 мкл/лунку и инкубируют в холодильнике при 4°C в течение ночи (16-20 ч). После промывания планшета 4 раза PBST (pH 7,4 PBS, содержащего 0,05% Tween-20), добавляют блокирующий раствор 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA), разбавленный PBST, в количестве 150 мкл/лунку и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч для блокирования. После завершения блокирования блокирующий раствор удаляют, а планшет промывают 4 раза буфером PBST.

Исследуемое антитело разбавляют в 10-кратном градиенте PBST, содержащем 3% BSA, с исходной концентрацией 1 мкМ, для 10 разведений, добавляют в микротитровальный планшет по 100 мкл/лунку и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. После завершения инкубации планшет промывают 4 раза PBST. Козье античеловеческое вторичное антитело, меченное HRP (Abscam, кат. №ab97225), разбавленное PBST, содержащем 3% BSA, добавляют по 100 мкл/лунку и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет промывают 4 раза PBST, а затем добавляют хромогенный субстрат ТМВ (Cell Signaling Technology, кат. №7004S) по 100 мкл/лунку и инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 1 мин. Стоп-раствор (Cell Signaling Technology, кат. №7002S) добавляют в количестве 100 мкл/лунку для прекращения реакции. Величину абсорбции при 450 нм считывают с помощью устройства для считывания микропланшетов (BioTek, модель Synergy H1). Данные анализируют. Результаты анализируют путем построения кривой концентрация-сигнал, как показано в следующей таблице:

Таблица 3. Аффинность мышиных антител к человеческому антигену ВСМА (значение EC<sub>50</sub>)

Мышиное антитело	EC <sub>50</sub> (нМ) связывания с His-антигеном ВСМА человека
M1	0,53

(2) Анализ связывания клеток *in vitro*:

Собирают культивируемые клетки с высокой экспрессией ВСМА (клетки НЕК-293Т, сверхэкспрессирующие ВСМА; опухолевые клетки, экспрессирующие ВСМА, NCI-

H929, депозитный номер ATCC (Американская коллекция типовых культур) CRL-9068). Плотность клеток регулируют и клетки высеивают на 96-луночный планшет с U-образным дном в количестве от  $1 \times 10^5$  до  $2 \times 10^5$  клеток на лунку. Планшет центрифугируют при 1200 g в течение 5 мин и удаляют супернатант. Добавляют 100 мкл градиентно разведенного раствора антител или сыворотки иммунизированных мышей и инкубируют при 4°C в течение 60 мин. Планшет центрифугируют при 1200 g в течение 5 мин и удаляют супернатант. Клетки дважды промывают PBS. Добавляют флуоресцентно меченное вторичное антитело (PE-GAM или PE-GAN) по 100 мкл на лунку и инкубируют при 4°C в течение 60 мин. Планшет центрифугируют при 1200 g в течение 5 мин и удаляют супернатант. Клетки дважды промывают PBS и затем повторно суспендируют в PBS. Сигнал обнаруживают с помощью проточного цитометра, и для анализа результатов строят кривую концентрации.

Таблица 4. Аффинность мышинных антител к клеткам, экспрессирующим ВСМА (значение  $EC_{50}$ )

Мышиное антитело	$EC_{50}$ (нМ) связывания с клетками HEK-293T/BCMA	$EC_{50}$ (нМ) связывания с клетками NCI-H929
M1	115,3	128,2

#### Пример 4: Эксперимент по гуманизации мышинных антител

Гуманизацию мышинных моноклональных антител к ВСМА человека проводят в соответствии со способами, опубликованными во многих документах в данной области. Вкратце, исходные константные домены (мышинное антитело) заменяют константными доменами человека. Последовательности антител зародышевой линии человека отбирают в соответствии с идентичностью между антителом мыши и человеческим антителом. В настоящем изобретении мышинное антитело M1 гуманизируют.

На основе типичной структуры CDR VH/VL полученного мышинного антитела, последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей выравнивают с базой данных зародышевой линии человеческого антител для получения высокоидентичных матриц зародышевой линии человека.

Области CDR мышинного антитела M1 прививают к выбранным соответствующим матрицам для гуманизации. Затем, исходя из трехмерной структуры мышинного антитела, обратной мутации подвергают встроенные остатки, остатки, непосредственно взаимодействующие с областями CDR, и остатки, оказывающие существенное влияние на конформацию VL и VH, и оптимизируют химически нестабильные аминокислотные остатки областей CDR. После тестирования экспрессии и сравнения количества обратных мутаций отбирают и конструируют следующие последовательности гуманизированных переменных областей тяжелой цепи HCVR:

HCVR1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGGIH  
 PGSGGSAYNQKFKGRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRLDYGYSWAWFP  
 YWGQGLTVTVSA

5

SEQ ID NO: 9

HCVR2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGIHP  
 GSGGSAYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRLDYGYSWAWFPY  
 WGQGLTVTVSA

10

SEQ ID NO: 10

HCVR3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGIHP  
 GSGGSAYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRLDYGYSWAWFPY  
 WGQGLTVTVSA

15

SEQ ID NO: 11

Следующие последовательности LCVR гуманизированной переменной области легкой цепи выбирают и конструируют:

LCVR1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQAPRLLIYGISNLSGI  
 PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

25

SEQ ID NO: 12

LCVR2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQSPKIWIYGISNLSG  
 VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

30

SEQ ID NO: 13

LCVR3

EILLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVIYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLSGV  
 PARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

35

SEQ ID NO: 14

Сконструированные последовательности переменной области тяжелой цепи и легкой цепи связывают с последовательностями константной области (C) тяжелой цепи и легкой цепи IgG1 соответственно. Примеры последовательностей константных областей тяжелой цепи и легкой цепи соответственно следующие:

40

45

IgG1 C

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
 5 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSK  
 10 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22

Ig kappa C

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
 15 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 23

Примеры последовательностей тяжелой и легкой цепей, полученных после связывания, следующие:

Ab1 (антитело 1) HC (тяжелая цепь)

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGGIH  
 PGSGGSAYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCTRLDYGYSWAWFP  
 YWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 25 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
 30 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 15

Ab2 HC

35 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGIHP  
 GSGGSAYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRLDYGYSWAWFPY  
 WGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 40 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 16

Ab3 HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGIHP  
 GSGGSAYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRLDYGYSWAWFPY  
 WGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 5 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 10 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17

Ab1 LC (легкая цепь)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQAPRLLIYGISNLASGI  
 15 PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 18

Ab2 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQSPKIWIYGISNLASG  
 20 VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
 25 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19

Ab3 LC

EILLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVIYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLASGV  
 30 PARFSGSGSGTSFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
 35 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

Таблица 5. Антитела и № SEQ ID тяжелой цепи, легкой цепи и их переменных областей

№ гуманизованного антитела	№ тяжелой цепи/легкой цепи	№ переменной области тяжелой цепи/легкой цепи
Ab1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 9
	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 12

Ab2	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 10
	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 13
Ab3	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 11
	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 14

Фрагменты кДНК синтезируют в соответствии с аминокислотными последовательностями легкой цепи и тяжелой цепи каждого гуманизированного антитела, указанного выше, и встраивают в вектор экспрессии pcDNA3.1 (Life Technologies Cat. №V790-20). Вектор экспрессии используют вместе с реагентом для трансфекции PEI (подиэтиламин) (Polysciences, Inc. Cat. №23966) в соотношении 1:2 для трансфекции клеток НЕК293 (Life Technologies Cat. №11625019). Клетки инкубируют в СО<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4-5 дней. Жидкость клеточной культуры собирают, центрифугируют и фильтруют. Затем образцы наносят на аффинную колонку для очистки антител. Колонку промывают фосфатным буфером. Образцы элюируют глицин-солянокислотным буфером (рН 2,7, 0,1 М Gly-HCl), нейтрализуют 1 М трис-соляной кислотой, рН 9,0, и подвергают диализу против фосфатного буфера с получением гуманизированных белков антител по настоящему изобретению.

Пример 5: Анализ аффинности связывания *in vitro* и кинетический анализ Аффинность (EC<sub>50</sub>) каждого гуманизированного антитела к человеческому антигену ВСМА определяют с использованием непрямого анализа связывания ELISA *in vitro* в соответствии с Примером 3 (1), и она показана в Таблице 6 ниже:

Таблица 6. Аффинность каждого гуманизированного антитела к человеческому антигену ВСМА (EC<sub>50</sub>)

Гуманизированное антитело	Антиген	Аффинность EC <sub>50</sub> (нМ)
Ab1	ВСМА-His	0,022
Ab2		0,033
Ab3		0,034

Аффинность (EC<sub>50</sub>) каждого гуманизированного антитела к опухолевым клеткам NCI-H929 определяют с использованием анализа связывания клеток *in vitro* в соответствии с Примером 3 (2), и она показана в Таблице 7 ниже:

Таблица 7. Аффинность (EC<sub>50</sub>) каждого гуманизированного антитела к опухолевым клеткам NCI-H929

Гуманизированное антитело	Клетка	Аффинность EC <sub>50</sub> (нМ)
Ab1	NCI-H929	4,6
Ab2		3,5
Ab3		3,9

Пример 6: Эндоцитоз антител NCI-H929 (деPOSITный номер ATCC CRL-9068) используют для оценки того, могут

ли антитела по настоящему изобретению подвергаться эндоцитозу в клетках вместе с ВСМА человека после связывания с ВСМА. Клетки NCI-H929 расщепляют трипсином (после однократной промывки PBS при 37°C в течение примерно 2 мин), собирают и повторно суспендируют в предварительно охлажденном буфере FACS (PBS + фетальная бычья сыворотка). Концентрацию клеток доводят до  $1 \times 10^6$  клеток/мл. 1 мл клеточной суспензии добавляют в пробирку Эппендорфа, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин и удаляют супернатант. 1 мл полученного тестируемого антитела добавляют для повторного суспендирования клеток, и конечная концентрация антитела составляла 20 мкг/мл. Клетки инкубируют на шейкере при 4°C в течение 1 ч, центрифугируют (4°C, 1500 об/мин  $\times$  5 мин) и сбрасывают супернатант. Клетки дважды промывают буфером FACS и удаляют супернатант. В каждую пробирку добавляют 100 мкл рабочего раствора флуоресцентных вторичных антител для повторного суспендирования клеток. Клетки инкубируют на шейкере при 4°C в течение 30 мин, центрифугируют (4°C, 1500 об/мин  $\times$  5 мин) и сбрасывают супернатант. Клетки дважды промывают буфером FACS и удаляют супернатант. В каждую пробирку добавляют 1,0 мл предварительно нагретой полной клеточной среды NCI-H929 для повторного суспендирования клеток и тщательно перемешивают. Суспензию клеток разделяют на аликвоты в 4 пробирки по 200 мкл на пробирку, соответственно, в виде группы 0 мин, контрольной группы, группы 30 мин и группы 2 ч. 0 мин и контрольную группы помещают на лед, а остальные группы помещают в инкубатор при 37°C для эндоцитоза на 30 мин и 2 ч соответственно. В соответствующий момент времени пробирку Эппендорфа извлекают и помещают на лед для предварительного охлаждения на 5 мин. Все экспериментальные группы центрифугируют (4°C, 1500 об/мин  $\times$  5 мин) и удаляют супернатант. Клетки дважды промывают буфером FACS и удаляют супернатант. 250 мкл полоскового буфера добавляют в пробирки Эппендорфа всех групп лечения, кроме группы 0 мин. Клетки инкубируют при комнатной температуре в течение 8 мин, центрифугируют (4°C, 1500 об/мин  $\times$  5 мин) и сбрасывают супернатант. Клетки дважды промывают буфером FACS и удаляют супернатант. Во все группы лечения добавляют 100 мкл фиксирующего раствора, помещают при 4°C на более чем 30 мин для иммуноокрашивания и определяют с помощью проточного питометра DxFlex. Процент эндоцитоза антитела ВСМА (%) = (значение интенсивности флуоресценции в каждый момент времени - среднее значение интенсивности флуоресценции контрольной группы)/среднее значение интенсивности флуоресценции в нулевой точке - среднее значение интенсивности флуоресценции контрольной группы. Результаты приведены в Таблице 8 ниже:

Таблица 8. Эндоцитоз (EC<sub>50</sub>) антител в опухолевых клетках NCI-H929

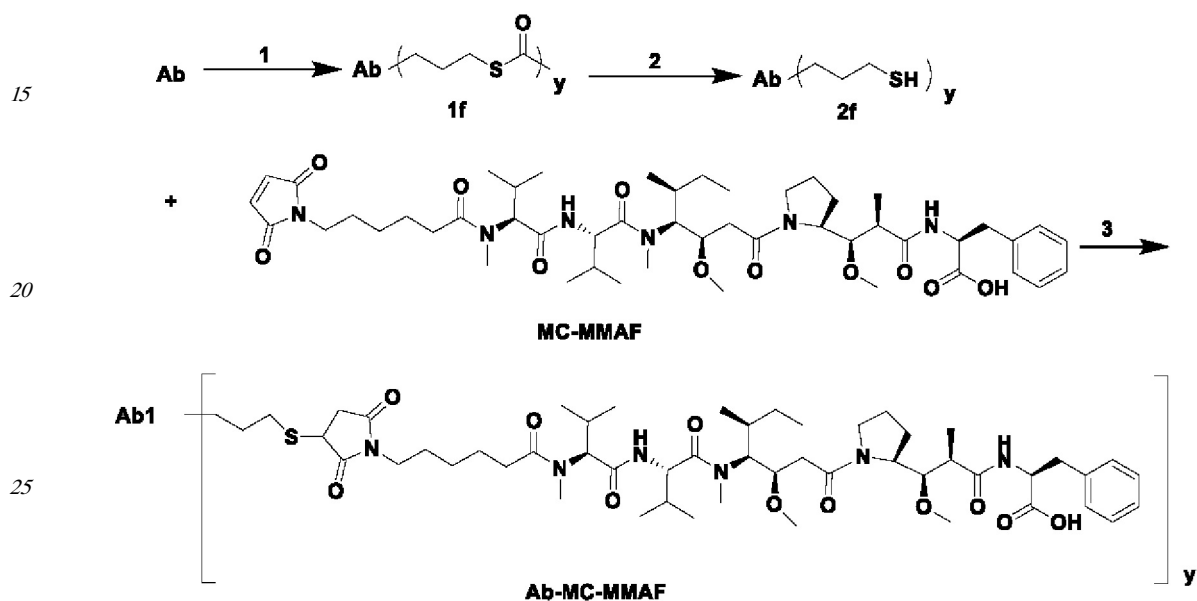
Гуманизированное антитело	Клетка	Эффективность эндоцитоза %	
		0,5 ч	2 ч
Ab1	NCI-H929	36,6	49,5
Ab2		36,7	48
Ab3		35,5	45,7
J6M0		Н/Д	38,9

Н/Д - нет данных

Результаты показывают, что по сравнению с антителом J6M0 к ВСМА (описанным в патенте US 9273141) антитела по настоящему изобретению обладают более высокой эффективностью эндоцитоза.

Пример 7: Конъюгация антител к MC-MMAF (Малеимидакапроил монометил ауристатин F)

Антитела по настоящему изобретению обладают клеточно-аффинной активностью и эндоцитозной активностью, что делает их подходящими для связывания с лекарственными средствами с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения ВСМА-опосредованных заболеваний. Антитела по настоящему изобретению были связаны с MC-MMAF с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство. Процесс связывания показан в следующем уравнении, где Ab представляет собой антитело Ab2 или Ab3:



На первом этапе S-(3-гидроксипропил)тиоацетат (0,7 мг, 5,3 моль) растворяют в 0,9 мл раствора ацетонитрила для последующего использования. Предварительно полученный указанный выше раствор в ацетонитриле, содержащем S-(3-гидроксипропил)тиоацетат, добавляют к буферу уксусная кислота/ацетат натрия, содержащему антитело, рН составляет 4,3 (10,35 мг/мл, 9,0 мл, 0,97 моль). Затем по каплям добавляют 1,0 мл водного раствора, содержащего цианоборгидрид натрия (14,1 мг, 224 моль), и проводят реакцию при встряхивании при 25°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную смесь обессоливают и очищают с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М раствор PBS, рН 6,5) с получением раствора, содержащего продукт 1f. Раствор концентрируют до 10 мг/мл и сразу используют в следующей реакции.

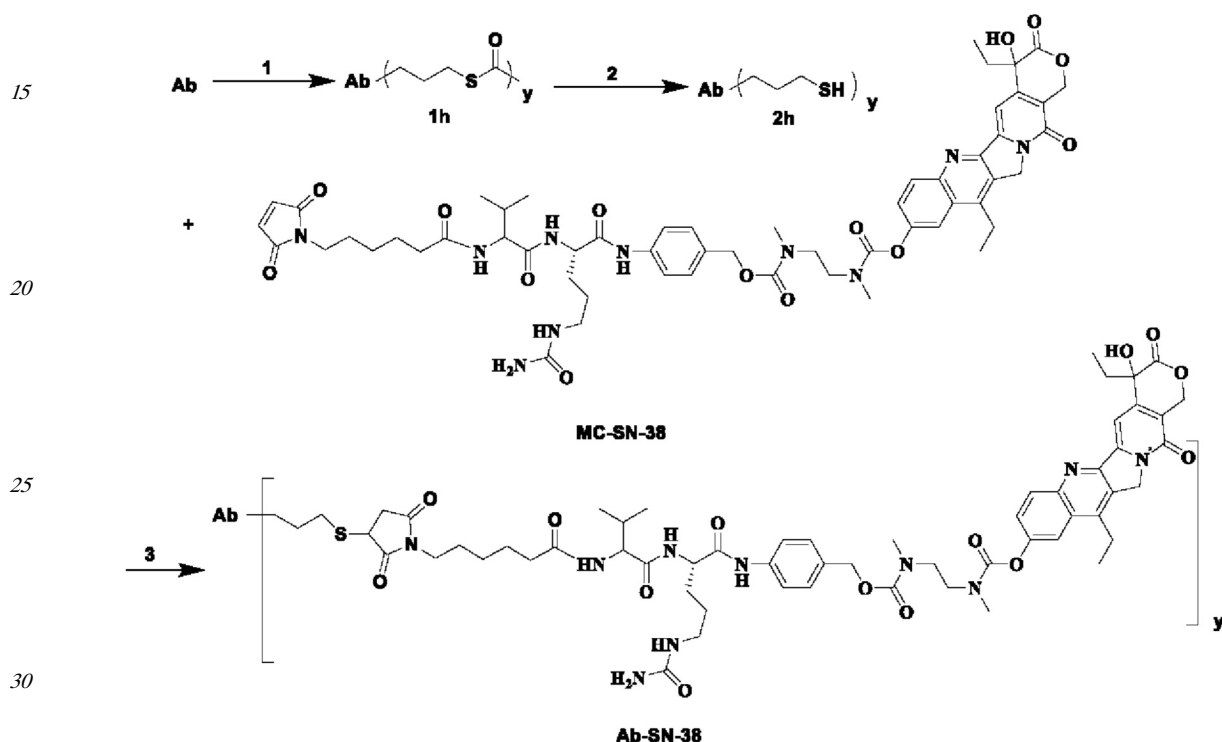
На втором этапе к раствору 1f (11,0 мл) добавляют 0,35 мл 2,0 М раствора гидрохлорида карбоксиамида и проводят реакцию при встряхивании при 25°C в течение 30 мин. Затем реакционный раствор обессоливают и очищают с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М раствор PBS, рН 6,5) с получением раствора, содержащего продукт 2f (концентрация 6,17 мг/мл, 14,7 мл).

На третьем этапе соединение MC-MMAF (1,1 мг, 1,2 моль, получают по способу, описанному в патенте РСТ WO 2005081711) растворяют в 0,3 мл ацетонитрила, добавляют в раствор 2f (концентрация 6,17 мг/мл, 3,0 мл) и подвергают реакции при встряхивании при 25°C в течение 4 ч. Затем реакционный раствор обессоливают и очищают с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М

раствор PBS, pH 6,5) и фильтруют в стерильных условиях на фильтре с получением продукта Ab2-МС-ММАF. Среднее значение DAR, у, продукта Ab2-МС-ММАF, определенное методом HIC-HPLC (гидрофобная интерактивная высокоэффективная жидкостная хроматография), составляло 4, и конъюгат антитело-лекарственное средство в буфере PBS (3,7 мг/мл, 4,7 мл) хранят в холодильнике при 4°C. Продукт Ab3-МС-ММАF получают описанным выше способом. Среднее значение DAR у, продукта Ab3-МС-ММАF, определенное методом HIC-HPLC, составило 4,1, а конъюгат антитело-лекарственное средство в буфере PBS (3,5 мг/мл, 5,0 мл) хранят в холодильнике при 4°C.

#### 10 Пример 8: Конъюгация антител к SN-38

Лекарственные средства, конъюгированные с антителами, получают с помощью следующего процесса связывания, в котором Ab представляет собой Ab2:



На первом этапе S-(3-гидроксипропил)тиоацетат (0,7 мг, 5,3 моль) растворяют в 0,9 мл раствора ацетонитрила для последующего использования. Предварительно полученный указанный выше раствор в ацетонитриле, содержащем S-(3-гидроксипропил)тиоацетат, добавляют к буферу уксусная кислота/ацетат натрия, содержащему антитело, pH составляет 4,3 (10,35 мг/мл, 9,0 мл, 0,97 моль). Затем по каплям добавляют 1,0 мл водного раствора, содержащего цианоборгидрид натрия (14,1 мг, 224 моль), и проводят реакцию при встряхивании при 25°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную смесь обессоливают и очищают с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М раствор PBS, pH 6,5) с получением раствора, содержащего продукт 1h. Раствор концентрируют до 10 мг/мл и сразу используют в следующей реакции.

На втором этапе к раствору 1h (11,0 мл) добавляют 0,35 мл 2,0 М раствора гидрохлорида карбоксиамида и проводят реакцию при встряхивании при 25°C в течение 30 мин. Затем реакционный раствор обессоливают и очищают с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М раствор PBS, pH 6,5) с получением раствора, содержащего продукт 2h (концентрация 6,2 мг/мл, 15,0 мл). Раствор концентрируют до 10 мг/мл и сразу используют в следующей реакции.

На третьем этапе соединение MC-SN-38 (1,3 мг, 1,2 моль) растворяют в 0,3 мл ацетонитрила, добавляют к 2h (концентрация 6,2 мг/мл, 3,0 мл) и подвергаются реакции при встряхивании при 25°C в течение 4 ч. Затем реакционный раствор обессоливают и очищают на гелевой колонке Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М раствор PBS, рН 6,5) и фильтруют в стерильных условиях на фильтре с получением конъюгата антитело-лекарственное средство Ab-SN-38 в PBS буфере (3,7 мг/мл, 4,7 мл), который хранят в холодильнике при 4°C. Среднее значение у определяют по ультрафиолетовому (УФ) излучению. Кюветы, заполненные сукцинатным буфером натрия, помещают соответственно в эталонную абсорбционную ячейку и абсорбционную ячейку для определения образца, и после вычета контрольного растворителя кюветы, заполненные тестируемым раствором, помещают в абсорбционную ячейку для определения образца. Абсорбцию измеряют при 280 нм и 370 нм.

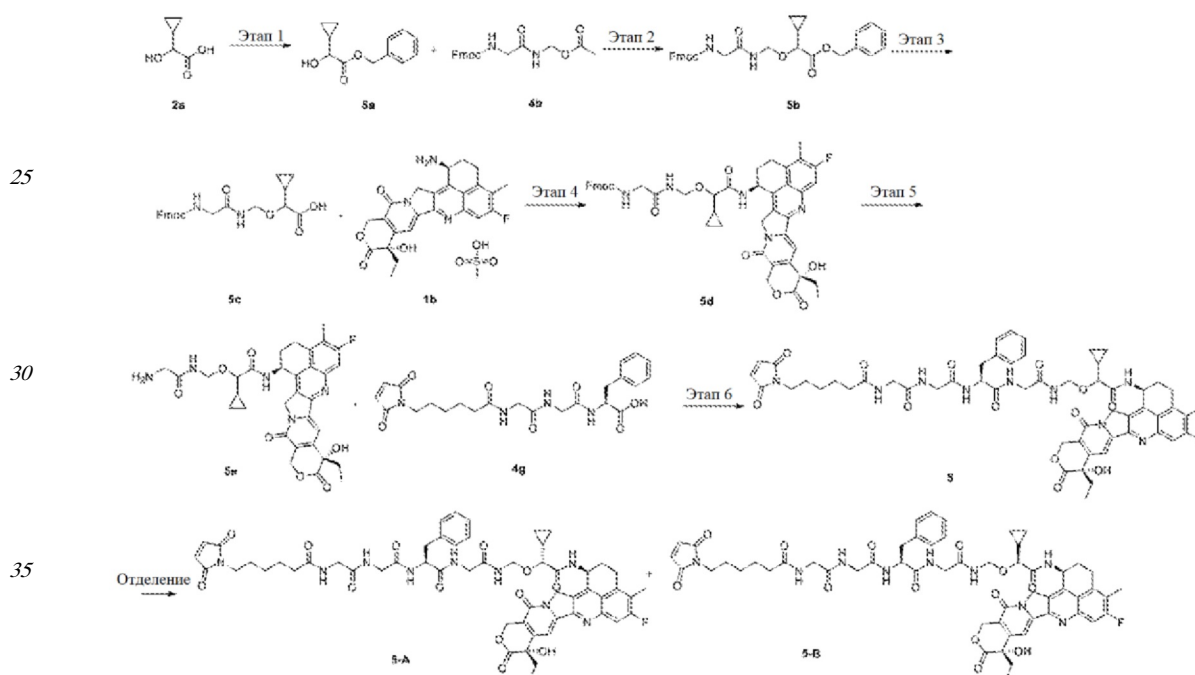
Обработка данных:

Содержание антител C<sub>mab</sub> определяют путем построения стандартной кривой и измерения абсорбции при длине волны 280 нм. Содержание малых молекул C<sub>Drug</sub> определяют путем измерения абсорбции при длине волны 370 нм.

Среднее значение лекарственной нагрузки  $y = C_{Drug}/C_{mab}$ .

Среднее значение DAR у конъюгата антитело-лекарственное средство Ab2-SN-38, определенное вышеуказанным способом, составило 3,9.

Пример 9: Конъюгация антител с эксатеканом



На первом этапе 2a (2 г, 17,2 ммоль) растворяют в 75 мл ацетонитрила и добавляют последовательно карбонат калия (9,27 г, 67,2 ммоль), бензилбромид (20 мл, 167,2 ммоль) и иодид тетрабутиламмония (620 мг, 1,68 г ммоль). Реакционный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 48 ч и фильтруют через диатомовую землю. Осадок на фильтре промывают этилацетатом (20 мл). Фильтрат объединяют и концентрируют при пониженном давлении. Полученные остатки очищают хроматографией на колонке с силикагелем с проявляющей системой растворителей С с получением продукта 5a (3,2 г, выход: 90,1%).

На втором этапе в реакционную колбу добавляют соединения 5a (181,3 мг, 0,879 ммоль) и 4b (270 мг, 0,733 ммоль). Добавляют 6 мл тетрагидрофурана. Реакционную

смесь трижды заменяют аргоном и охлаждают до 0-5°C на бане со льдом и водой. Добавляют трет-бутоксид калия (164 мг, 1,46 ммоль). Ледяную баню удаляют, реакционную смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение 40 мин. Добавляют 15 мл ледяной воды и реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (40 мл × 2) и хлороформом (20 мл × 5). Органические фазы объединяют и концентрируют. Полученные остатки растворяют в 6 мл диоксана, добавляют 3 мл воды, бикарбоната натрия (73,8 мг, 0,879 ммоль) и 9-флуоренилметилхлорформиата (190 мг, 0,734 ммоль) и перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляют 30 мл воды и реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (20 мл × 3). Органические фазы объединяют, промывают насыщенным раствором хлорида натрия, сушат над безводным сульфатом натрия и фильтруют. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Полученные остатки очищают колоночной хроматографией на силикагеле с проявляющей системой растворителей С с получением продукта 5b бензил-10-циклопропил-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-диазаундек-11-карбоксилата (73 мг, выход: 19,4%).

МС m/z (ESI (ионизация электроспреем): 515,0 [M+1].

На третьем этапе 5b (30 мг, 0,058 ммоль) растворяют в 6,75 мл смешанного растворителя тетрагидрофурана и этилацетата (об. : об. = 2:1). Добавляют палладий на угле (18 мг, содержание 10%, сухой), реакционную смесь трижды заменяют водородом и проводят реакцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционный раствор фильтруют через диатомовую землю. Осадок на фильтре промывают этилацетатом. Фильтрат концентрируют с получением сырого продукта 5 с 10-циклопропил-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-диазаундек-11-кислота (20 мг), который непосредственно используют в следующей реакции без очистки.

МС m/z (ESI): 424,9 [M+1].

На четвертом этапе в реакционную колбу добавляют 1b (15 мг, 28,2 мкмоль). Добавляют 1,5 мл N, N-диметилформамида. Реакционную смесь трижды заменяют аргоном и охлаждают до 0-5°C на бане со льдом и водой. Добавляют каплю триэтиламина, сырой продукт 5 с (20 мг, 47,1 мкмоль), 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилхлорморфолин (25,4 мг, 86,2 мкмоль) и реакционную смесь подвергают реакции при перемешивании на бане со льдом в течение 40 мин. Добавляют 15 мл воды и реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (20 мл × 3). Органические фазы объединяют. Органические фазы промывают насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл × 2), сушат над безводным сульфатом натрия и фильтруют. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Полученные остатки очищают тонкослойной хроматографией с проявляющей системой растворителей В с получением указанного в заголовке продукта 5d (9H-флуорен-9-ил)метил(2-(((1-циклопропил-2-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H, 12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолозино[1,2-b]хинолин-1-ил)амино)-2-оксоэтокси)метил)амино)-2-оксоэтил)карбамат (23,7 мг, выход: 78,9%).

МС m/z (ESI): 842,1 [M+1].

На пятом этапе 5d (30 мг, 35,7 мкмоль) растворяют в 3 мл дихлорметана. Добавляют 1,5 мл диэтиламина и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционный раствор концентрируют при пониженном давлении. Добавляют 1,5 мл толуола и реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, повторяют дважды. К остаткам добавляют 4,5 мл n-гексана и гомогенизируют. Супернатант выливают после того, как ее оставляют в покое, а твердое вещество оставляют. Твердые остатки концентрируют при пониженном давлении и сушат

выкачиванием, получая сырой продукт 5e 2-((2-аминоацетидами)метокси)-2-циклопропил-N-((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидроксил-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолозино[1,2-b]хинолин-1-ил)ацетамид (23 мг), который непосредственно используют в следующей реакции без очистки.

5 MS m/z (ESI): 638,0 [M+18].

На шестом этапе сырой продукт 5e (20 мг, 32,3 мкмоль) растворяют в 1 мл N, N-диметилформамида и трижды заменяют аргоном. Реакционную смесь охлаждают до 0-5°C на бане со льдом и водой. Добавляют 0,5 мл 4g раствора N,N-диметилформамида (31,8 мг, 67,3 мкмоль), 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилхлорморфолин (27,8 мг, 94,3 мкмоль) добавляют и подвергают реакции при перемешивании на бане со льдом в течение 10 мин. Ледяную баню удаляют, реакционную смесь нагревают до комнатной температуры и проводят реакцию при перемешивании в течение 1 ч с получением соединения 5. Реакционный раствор очищают высокоэффективной жидкостной хроматографией (условия разделения: колонка: XBridge Prep C18 OBD 5 мкм 19\*250 мм; подвижная фаза: А-вода (10 ммоль NH<sub>4</sub>OAc): В-ацетонитрил, градиентное элюирование, скорость потока: 18 мл/мин). Соответствующие компоненты собирают и концентрируют при пониженном давлении с получением продуктов 5-А и 5-В (3,6 мг, 2,6 мг).

MS m/z (ESI): 1074,4 [M+1].

20 Соединение одинарной конфигурации 5-А (с более коротким временем удерживания): Анализ UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография): время удерживания: 1,14 мин, чистота: 85% (колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1\*50 мм, подвижная фаза: А-вода (5 ммоль NH<sub>4</sub>OAc), В-ацетонитрил).

25 <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,60 (t, 1H), 8,51-8,49 (d, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (га, 2H), 8,02-7,96 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,15 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,74-4,62 (m, 2H), 4,54-4,40 (m, 2H), 3,76-3,64 (m, 4H), 3,62-3,48 (m, 2H), 3,20-3,07 (m, 2H), 3,04-2,94 (m, 2H), 2,80-2,62 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,15 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 2H), 1,93-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1-34-1,12 (m, 5H), 0,87 (t, 3H), 0,64-0,38 (m, 4H)

30 Соединение одинарной конфигурации 5-В (с более длительным временем удерживания):

Анализ UPLC: время удерживания: 1,16 мин, чистота: 89% (колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1\*50 мм, подвижная фаза: А-вода (5 ммоль NH<sub>4</sub>OAc), В-ацетонитрил).

35 <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,68-8,60 (m, 1H), 8,58-8,50 (m, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,94 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,13 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,60-5,50 (m, 1H), 5-41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,78-4,68 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 2H), 3,76-3,58 (m, 4H), 3,58-3,48 (m, 1H), 3,20-3,10 (m, 2H), 3,08-2,97 (m, 2H), 2,80-2,72 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,13 (m, 2H), 2,13-2,04 (m, 2H), 2,03-1,94 (m, 2H), 1,91-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,91-0,79 (m, 3H), 0,53-0,34 (m, 4H)

Способы получения других промежуточных продуктов аналогичны промежуточным продуктам 5.

45 Получений водный раствор, содержащий трис(2-карбоксиил)фосфин (10 мМ, 0,347 мл, 3,47 мкмоль), добавляют к забуференному PBS водному раствору, содержащему антитело Ab2 (рН составляет 6,5) 0,05 М водному раствору, забуференному PBS; 7,3 мл, 13,8 мг/мл, 0,681 мкмоль) при 37°C. Реакционную смесь помещают в шейкер с водяной баней и подвергают реакции при встряхивании при 37°C в течение 3 ч. Реакцию

останавливают, реакционный раствор охлаждают до 25°C на водяной бане, разбавляют до 14,0 мл и отбирают 3,3 мл раствора для следующей реакции.

Соединение 5-А (3,0 мг, 3,72 мкмоль) растворяют в 0,15 мл ДМСО (диметилсульфоксид) и добавляют к 3,3 мл вышеуказанного раствора. Реакционную смесь помещают в шейкер с водяной баней и подвергают реакции при встряхивании при 25°C в течение 3 ч. Реакцию останавливают. Реакционный раствор обессоливают и очищают с использованием гелевой колонки с сефадексом G25 (фаза элюирования: рН 6,5, 0,05 М водный раствор, забуференный PBS, содержащий 0,001 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получением типичного продукта Ab-эксатекан, Ab2-эксатекан в буфере PBS (1,35 мг/мл, 13 мл), который хранят в замороженном виде при 4°C.

Среднее значение у определяют по абсорбции в ультрафиолетовом диапазоне. Кюветы, заполненные сукцинатным буфером натрия, помещают соответственно в эталонную абсорбционную ячейку и абсорбционную ячейку для определения образца, и после вычета контрольного растворителя кюветы, заполненные тестируемым раствором, помещают в абсорбционную ячейку для определения образца. Абсорбцию измеряют при 280 нм и 370 нм.

Обработка данных:

Содержание антител C<sub>maб</sub> определяют путем построения стандартной кривой и измерения абсорбции при длине волны 280 нм. Содержание малых молекул C<sub>Ddrug</sub> определяют путем измерения абсорбции при длине волны 370 нм.

Среднее значение лекарственной нагрузки  $u = CD_{drug}/C_{maб}$ .

Что касается типичного продукта Ab2-эксатекан, то его значение определено 7,6 вышеописанным способом. Образцы Ab2-эксатекан (у составляет 8) получают очисткой УФ-ВЭЖХ (ВЭЖХ с ультрафиолетовым матричным фотодиодным детектором).

Пример 10: Опухолелизирующая активность конъюгатов антитело-лекарственное средство

Для дальнейшего исследования цитотоксического эффекта конъюгатов антитело-лекарственное средство на опухоли, формирующийся *in vivo*, противоопухолевый эффект конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению оценивают после формирования трансплантированных опухолей клетками NCI-H929 у мышей.

(1)  $9 \times 10^6$  клеток NCI-H929 вводят подкожно 8-недельным иммунодефицитным бестимусным мышам (NOD-SCID). Внутривенное введение конъюгатов антитело-лекарственное средство Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4) и Ab2-эксатекана (Пример 9, у составляет 8) начинают через 8 дней один раз в неделю в дозе 1 мг/кг. Белок человеческого IgG1 используют в качестве контроля в дозе 1 мг/кг. В контрольной группе и группе лечения было по 5 мышей. Степень ингибирования опухоли рассчитывают путем измерения объема опухоли. Степень ингибирования опухоли составляет 100% - (объем опухоли в группе лечения на 14-й день - объем опухоли в группе лечения на 0-й день)/(объем опухоли в контрольной группе на 14-й день - объем опухоли в контрольной группе на 0-й день). Результаты исследования приведены в Таблице 9. Конъюгаты антитело-лекарственное средство Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4) и Ab2-эксатекан (Пример 9, у составляет 8) проявляют ингибирующее действие на опухоль.

Таблица 9. Опухолелизирующая активность конъюгатов антитело-лекарственное средство

Группа лечения	Степень ингибирования опухоли
Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4) 1 мг/кг	29,9%
Ab2-эксатекан (Пример 9, у составляет 8) 1 мг/кг	61,1%

(1)  $9 \times 10^6$  клеток NCI-H929 вводят подкожно 8-недельным бестимусным мышам с иммунодефицитом (NOD-SCID). Внутривенную инъекцию конъюгатов антитело-лекарственное средство Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4) и Ab3-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4,1) начинают проводить через 8 дней два раза в неделю и в дозировке 3 мг/кг. Белок человеческого IgG1 используют в качестве контроля в дозировке 1 мг/кг. В контрольной группе и группе лечения было по 5 мышей. Степень ингибирования опухоли рассчитывают путем измерения объема опухоли. Степень ингибирования опухоли TGI составляет 100% - (объем опухоли в группе лечения на 14-й день - объем опухоли в группе лечения на 0-й день)/(объем опухоли в контрольной группе на 14-й день - объем опухоли в контрольной группе на 0-й день). Результаты исследования приведены в Таблице 10. Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4) и Ab3-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4,1) оба проявляют цитотоксический эффект в отношении опухолей.

Таблица 10. Опухолелизирующая активность конъюгатов антитело-лекарственное средство

Группа лечения	Степень ингибирования опухоли
Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4) 3 мг/кг	192%
Ab2-МС-ММАF (Пример 7, у составляет 4,1) 3 мг/кг	175%

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> ШАНХАЙ ХЭНСОХ БИОМЕДИКАЛ КО., ЛТД., ЦЗЯНСУ ХЭНСОХ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО., ЛТД.
- <120> АНТИТЕЛО К ВСМА, ЕГО АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И ИХ  
МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
- <130> 702071СРСТ
- <150> CN 201910695597.9
- <151> 2019-07-30
- <160> 23
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 121

<212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 5 <222> (1)..(121)  
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи мышиноного mab M1  
 <400> 1  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 10 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
 15 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 20 Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120  
 <210> 2  
 25 <211> 106  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 30 <222> (1)..(106)  
 <223> Вариабельный домен легкой цепи мышиноного mab M1  
 <400> 2  
 Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Ile Val Thr Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 35 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met  
 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 40 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Phe Thr Ile Asn Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 45 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105  
 <210> 3  
 <211> 10

<212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 5 <222> (1)..(10)  
 <223> HCDR1 мышиноного mab M1  
 <400> 3  
 Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Glu Met His  
 1 5 10  
 10 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(17)  
 <223> HCDR2 мышиноного mab M1  
 <400> 4  
 Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 20 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 5  
 <211> 14  
 <212> ПРТ  
 25 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(14)  
 <223> HCDR3 мышиноного mab M1  
 30 <400> 5  
 Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr  
 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 10  
 35 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(10)  
 40 <223> LCDR1 мышиноного mab M1  
 <400> 6  
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met Asn  
 1 5 10  
 <210> 7  
 45 <211> 7  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

<221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(7)  
 <223> LCDR2 мышиноного mab M1  
 <400> 7  
 5 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> ПРТ  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(9)  
 <223> LCDR3 мышиноного mab M1  
 15 <400> 8  
 Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 121  
 20 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(121)  
 25 <223> Гуманизированная переменная область тяжелой цепи HCVR1  
 <400> 9  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 35 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly  
 40 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120  
 <210> 10  
 <211> 121  
 45 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН

RU 2 819 660 C2

<222> (1)..(121)

<223> Гуманизированная переменная область тяжелой цепи HCVR2

<400> 10

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 10 Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 15 85 90 95  
 Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

20 <210> 11

<211> 121

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <221> ДОМЕН

<222> (1)..(121)

<223> Гуманизированная переменная область тяжелой цепи HCVR3

<400> 11

30 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 35 Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 40 85 90 95  
 Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

45 <210> 12

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>  
 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(106)  
 <223> Вариабельная область гуманизированной легкой цепи LCVR1  
 5 <400> 12  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met  
 20 25 30  
 10 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 15 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 20 <210> 13  
 <211> 106  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 25 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(106)  
 <223> Вариабельная область гуманизированной легкой цепи LCVR2  
 <400> 13  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 30 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met  
 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 35 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 40 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 14  
 <211> 106  
 45 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН

<222> (1)..(106)

<223> Вариабельная область гуманизированной легкой цепи LCVR3

<400> 14

5 Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met  
 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 10 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 15 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 15

<211> 451

20 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> ЦЕПЬ

<222> (1)..(451)

25 <223> Ab1 HC

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
 30 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 35 40 45  
 Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 35 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly  
 40 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 45 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175

RU 2 819 660 C2

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 5 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 10 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 15 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 20 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 25 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 30 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 35 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 16  
 <211> 451  
 <212> ПРТ  
 40 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ЦЕПЬ  
 <222> (1)..(451)  
 <223> Ab2 HC  
 45 <400> 16  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr

RU 2 819 660 C2

		20		25		30											
		Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35							40					45			
		Gly	Gly	Ile	His	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
5		50						55					60				
		Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
		65					70					75				80	
		Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
						85					90				95		
10		Thr	Arg	Leu	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ala	Trp	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly
					100					105					110		
		Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
					115					120					125		
		Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
15		130						135					140				
		Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
		145					150					155				160	
		Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
						165					170				175		
20		Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
					180					185					190		
		Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
					195				200						205		
		Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
25		210						215					220				
		Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
		225					230					235				240	
		Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
						245					250				255		
30		Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
					260					265					270		
		Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
					275				280				285				
		His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
35		290						295					300				
		Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
		305					310					315				320	
		Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
						325					330				335		
40		Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
					340					345					350		
		Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
					355				360					365			
		Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
45		370						375					380				
		Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
		385					390					395				400	
		Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val

RU 2 819 660 C2

				405					410				415			
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				420					425					430		
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
5			435					440					445			
	Pro	Gly	Lys													
			450													
	<210>		17													
	<211>		451													
10	<212>		ПРТ													
	<213>		Искусственная последовательность													
	<220>															
	<221>		ЦЕПЬ													
	<222>		(1)..(451)													
15	<223>		Ab3 HC													
	<400>		17													
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1			5						10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr
20				20						25					30	
	Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
	Gly	Gly	Ile	His	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
			50				55					60				
25	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70						75				80
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Thr	Arg	Leu	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ala	Trp	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly
30				100						105					110	
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			115							120				125		
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
			130						135				140			
35	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145						150					155				160
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165						170					175	
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
40				180						185					190	
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
				195					200				205			
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
			210					215				220				
45	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
	225						230				235					240
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245						250					255	

RU 2 819 660 C2

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 5 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 10 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 15 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 20 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 25 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 18  
 <211> 213  
 <212> ПРТ  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ЦЕПЬ  
 <222> (1)..(213)  
 <223> Ab1 LC  
 35 <400> 18  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met  
 20 25 30  
 40 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 45 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

RU 2 819 660 C2

		100						105					110			
	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
			115					120					125			
5	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
		130						135					140			
	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
	145					150					155				160	
	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
					165					170					175	
10	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
				180					185					190		
	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
			195					200					205			
	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
15		210														
	<210>	19														
	<211>	213														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
20	<220>															
	<221>	ЦЕПЬ														
	<222>	(1)..(213)														
	<223>	Ab2 LC														
	<400>	19														
25	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1				5					10					15	
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Tyr	Met
			20						25					30		
	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ile	Trp	Ile	Tyr
30			35					40					45			
	Gly	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
		50					55					60				
	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
	65				70					75					80	
35	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr
					85					90					95	
	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro
				100						105				110		
	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
40			115						120					125		
	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
		130						135					140			
	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
	145					150					155				160	
45	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
					165					170					175	
	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
				180					185						190	

RU 2 819 660 C2

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 5 <210> 20  
 <211> 213  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 10 <221> ЦЕПЬ  
 <222> (1)..(213)  
 <223> Ab3 LC  
 <400> 20  
 Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 15 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met  
 20 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 20 Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 25 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 30 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 35 165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 40 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 21  
 <211> 65  
 <212> ПРТ  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ПЕПТИД  
 <222> (1)..(65)

<223> Внеклеточная область His-меченного ВСМА человека  
 <400> 21  
 Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser  
 1 5 10 15  
 5 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr  
 20 25 30  
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser  
 35 40 45  
 10 Val Lys Gly Thr Asn Ala His His His His His His His His His  
 50 55 60  
 His  
 65  
 <210> 22  
 <211> 330  
 15 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> ДОМЕН  
 <222> (1)..(330)  
 20 <223> Константная область тяжелой цепи  
 <400> 22  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 25 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 30 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 35 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 45 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

	210		215		220															
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu				
	225					230					235				240					
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
5				245						250				255						
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
				260					265				270							
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
			275						280				285							
10	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
	290						295				300									
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
	305					310					315					320				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
15				325							330									
	<210>		23																	
	<211>		107																	
	<212>		ПРТ																	
	<213>		Искусственная последовательность																	
20	<220>																			
	<221>		ДОМЕН																	
	<222>		(1)..(107)																	
	<223>		Константная область легкой цепи																	
	<400>		23																	
25	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu				
	1			5					10					15						
	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe				
			20						25					30						
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln				
30			35					40					45							
	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser				
	50						55					60								
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu				
	65					70					75				80					
35	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser				
				85						90				95						
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
				100							105									

(57) Формула изобретения

1. Антитело к ВСМА (антиген созревания В-клеток) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4, и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5; и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8.

2. Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело к

BCMA представляет собой мышинное антитело, химерное антитело, человеческое антитело или гуманизированное антитело.

3. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, полученную из человеческого IgG1 (иммуноглобулин G1), IgG2, IgG3 или IgG4, или их варианта.

4. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, полученную из человеческого IgG1, IgG2 или IgG4.

5. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи IgG1 с повышенной ADCC-токсичностью (антителозависимая клеточная цитотоксичность) после аминокислотной мутации.

6. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи IgG1, представленную в SEQ ID NO: 22.

7. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи, полученную из человеческой  $\kappa$ -цепи,  $\lambda$ -цепи или их варианта.

8. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 23.

9. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, или переменную область тяжелой цепи, идентичную им по меньшей мере на 95% или 99%.

10. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, или переменную область легкой цепи, идентичную им по меньшей мере на 95% или 99%.

11. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9 или 10, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, или тяжелую цепь, идентичную им по меньшей мере на 95% или 99%.

12. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9 или 10, где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, или легкую цепь, идентичную им по меньшей мере на 95% или 99%.

13. Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, где

антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 12; или

антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой

цепи, представленную в SEQ ID NO: 13; или

антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 14.

5 14. Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, где

антитело к ВСМА содержит тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 18; или

10 антитело к ВСМА содержит тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 19; или

антитело к ВСМА содержит тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 20.

15 15. Полинуклеотид, кодирующий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14.

16. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 15.

17. Клетка-хозяин для получения антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14, в которую введен или которая содержит вектор экспрессии по п. 16.

20 18. Клетка-хозяин по п. 17, где клетка-хозяин представляет собой клетку бактерии, дрожжей или млекопитающего.

19. Клетка-хозяин по п. 18, которая представляет собой клетку *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, клетку СНО (яичник китайского хомячка) или клетку НЕК293 (эмбриональная почка человека).

25 20. Способ получения антитела к ВСМА по любому из пп. 1-14, включающий этапы: культивирования клетки-хозяина по любому из пп. 17-19; выделения антитела из культуры; и очистки антитела.

21. Способ по п. 20, включающий этапы: культивирования клетки НЕК293; выделения антитела из культуральной жидкости; и очистки антитела хроматографическим методом.

30 22. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики ВСМА-опосредованного заболевания или состояния, содержащая антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, а также фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

35 23. Набор для обнаружения или диагностики, предназначенный для обнаружения, диагностики или прогнозирования ВСМА-опосредованного заболевания или состояния, содержащий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, необязательно, где набор для обнаружения или диагностики также содержит один или более реагентов, способных обнаруживать связывание антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента с ВСМА.

40 24. Конъюгат антитело-лекарственное средство для лечения или профилактики ВСМА-опосредованного заболевания или состояния, содержащий антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, связанные с цитотоксическим агентом.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 24, где цитотоксический агент выбран из группы, состоящей из MMAF (монометил ауристатин F), SN-38 (7-этил-10-гидроксикамптотетин) и эксатекана.

26. Применение антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14, или фармацевтической композиции по п. 22, или конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 24 для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики ВСМА-опосредованного заболевания или состояния.

5 27. Применение по п. 26, где ВСМА-опосредованное заболевание или состояние представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

28. Применение по п. 27, где рак представляет собой рак, экспрессирующий ВСМА, и аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из красной волчанки, IgA-нефропатии и ревматического артрита.

10 29. Применение по п. 28, где рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой лимфому, лейкоз или миелому.

30. Применение по п. 29, где миелома представляет собой множественную миелому.

15 31. Применение антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14 для получения набора для обнаружения, диагностики или прогнозирования ВСМА-опосредованного заболевания или состояния.

32. Применение по п. 31, где ВСМА-опосредованное заболевание или состояние представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

20 33. Применение по п. 32, где рак представляет собой рак, экспрессирующий ВСМА, и аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из красной волчанки, IgA-нефропатии и ревматического артрита.

34. Применение по п. 33, где рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой лимфому, лейкоз или миелому.

35. Применение по п. 34, где миелома представляет собой множественную миелому.

25

30

35

40

45