

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 048142

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.29

(21) Номер заявки
202391920

(22) Дата подачи заявки
2022.01.05

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К GPRC5D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2021/070314

(32) 2021.01.05

(33) CN

(43) 2023.09.22

(86) PCT/CN2022/070287

(87) WO 2022/148370 2022.07.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАНОВА МЕДИСИНЗ
ДИВЕЛОПМЕНТ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Ли Жуньшэн, Хуан Вэньтао (CN)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(56) WO-A2-2016090329
WO-A1-2018147245
WO-A1-2019154890
WO-A2-2018017786
WO-A2-2020092854
WO-A1-2020148677
WO-A1-2016090312

KODAMA, T. et al. "Anti-GPRC5D/CD3
Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the
Treatment of Multiple Myeloma", Molecular Cancer
Therapeutics, Vol. 18, No. 9, 03 July 2019
(2019-07-03), pages 1555-1564

PILLARISSETTI, K. et al. "A T-cell-redirecting
bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member
D x CD3 antibody to treat multiple myeloma", Blood,
Vol. 135, No. 15, 07 February 2020 (2020-02-07),
pages 1232-1243

(57) Представлены антитела или их фрагменты, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка GPRC5D человека. Антитела или их фрагменты способны нацеливаться на раковые клетки, экспрессирующие GPRC5D, и таким образом могут применяться для лечения рака, в частности гематологического рака.

B1

048142

048142

B1

Предпосылки изобретения

Представитель D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком (GPRC5D), является представителем семейства рецепторов, сопряженных с G-белком. GPRC5D представляет собой трансмембранный белок. Сверхэкспрессия GPRC5D наблюдалась у пациентов с множественной миеломой. В частности, его высокая экспрессия характеризовалась значимой корреляцией с неблагоприятным исходом заболевания и лечения.

Учитывая его специфическую высокую экспрессию на клетках злокачественных новообразований, было высказано предположение, что антитела, специфичные к GPRC5D, могут быть полезны для лечения злокачественного новообразования, например, с помощью биспецифического антитела, перенаправляющего Т-клетки, или посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Сущность изобретения

Антитела к GPRC5D, включая их гуманизированные производные, которые обладают высокой аффинностью к белку GPRC5D человека, раскрыты в данном документе. Антитела или их фрагменты способны нацеливаться на раковые клетки, экспрессирующие GPRC5D, и таким образом могут применяться для лечения рака, в частности гематологического рака.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлено антитело или его антиген-связывающий фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка, представляющего собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), при этом антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают: (a) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34; (b) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47; (c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 54-59; или (d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 35-37, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 8 и 38-41. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 9 и 48-50, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 10 и 51-53. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 54-59. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 61-64, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 16 и 65-67. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1 и 74-79, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 2 и 80-86. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются ADCC-компетентными.

Также в некоторых вариантах осуществления представлено, что антитело или его фрагмент допол-

нительно содержат цитотоксическое лекарственное средство, конъюгированное с антителом или его фрагментом.

Также представлено биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к второму белку-мишени. В некоторых вариантах осуществления второй белок-мишень выбран из группы, состоящей из CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления второй белок-мишень представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления второй белок-мишень представляет собой 4-1BB.

Также предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту антитела или его фрагмента по настоящему изобретению. Также предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий: (а) обработку Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) или макрофага *in vitro* антителом или его фрагментом по настоящему изобретению, и (b) введение обработанной клетки пациенту.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологический рак, такой как В-клеточный рак, при котором экспрессируется GPRC5D (например, множественная миелома).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано связывание антител мыши, собранных из супернатанта гибридомы, с GPRC5D, экспрессированным на клетках CHO-K1.

На фиг. 2 показано связывание химерных антител с GPRC5D, экспрессированным на клетках CHO-K1.

На фиг. 3 показано, что связывание антител индуцировало эндоцитоз.

На фиг. 4 показано, что антитела были ADCC-компетентными.

На фиг. 5-8 показаны результаты тестирования аффинности гуманизированных антител, происходящих из 6G10D9, 58F9G10, 34D3H1 и 37B9C4 соответственно.

На фиг. 9 подтверждается связывание выбранных гуманизированных антител с GPRC5D, экспрессированным на клетках CHO-K1.

На фиг. 10 подтверждается связывание выбранных гуманизированных антител с GPRC5D, экспрессированным на клетках NCI-H929.

На фиг. 11 показана ADCC-эффективность протестированных гуманизированных антител.

На фиг. 12 показана активность индукции интернализации у протестированных гуманизированных антител.

На фиг. 13 показаны показатели активности в отношении уничтожения клеток у тестируемых конъюгатов антитело-лекарственное средство.

На фиг. 14 показаны показатели активности тестируемого антитела в отношении подавления опухоли.

Подробное описание

Определения.

Следует отметить, что термин "объект" в формах единственного числа относится к одному или нескольким из этих объектов; например, "антитело" означает одно или несколько антител. В связи с этим формы единственного числа, выражения "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин "полипептид" предназначен для охвата "полипептида" в единственном числе, а также "полипептидов" во множественном числе и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не привязан к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", и термин "полипептид" может использоваться вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ними. Термин "полипептид" также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, помимо прочего, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может происходить из природного биологического источника или быть получен с помощью рекомбинантной технологии, но необязательно получен путем трансляции определенной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

"Гомология", или "идентичность", или "сходство" относится к сходству последовательностей между двумя пептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Гомологию можно определить путем сравнения положения в каждой последовательности, которая может быть выровнена для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято одним и тем же основанием или аминокислотой, то молекулы гомологичны в этом положении. Степень гомологии между последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для после-

довательностей. "Неродственная" или "негомологическая" последовательность характеризуется менее чем 40% идентичностью, хотя предпочтительно менее чем 25% идентичностью, с одной из последовательностей по настоящему изобретению.

Полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) характеризуются определенным процентом (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) "идентичности последовательности" с другой последовательностью, что означает, что при выравнивании этот процент оснований (или аминокислот) являются одинаковыми при сравнении двух последовательностей.

Термин "эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид" относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность, характеризующуюся определенной степенью гомологии или идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, которая характеризуется определенной степенью гомологии с ним или с его комплементом. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Аналогично, "эквивалентный полипептид" относится к полипептиду, характеризующемуся определенной степенью гомологии или идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательности составляет по меньшей мере около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид характеризуется наличием одного, двух, трех, четырех или пяти добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, эпитопсвязывающую) или структуру (например, солевой мостик) эталонной последовательности.

Используемые в данном документе термины "антитело" или "антигенсвязывающий полипептид" относятся к полипептиду или полипептидному комплексу, которые специфически распознают антиген и связываются с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь. Таким образом, термин "антитело" включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, который содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью, состоящей в связывании с антигеном. Их примеры включают без ограничения определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лиганд-связывающую часть, вариабельную область тяжелой или легкой цепи, константную область тяжелой или легкой цепи, каркасную область (FR) или любую ее часть или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

Термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент", используемые в данном документе, представляют собой часть антитела, такую как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин "фрагмент антитела" включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический или генно-инженерный белок, который действует как антитело, связываясь со специфическим антигеном с образованием комплекса.

"Одноцепочечный вариабельный фрагмент" или "scFv" относится к слитому белку, состоящему из вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом, состоящим из от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может быть обогащен глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность оригинального иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. scFv-молекулы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019.

Термин антитело охватывает различные широкие классы полипептидов, которые можно различить биохимически. Специалистам в данной области техники понятно, что тяжелые цепи подразделяются на классы гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами между ними (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет то, к какому "классу" относится антитело - IgG, IgM, IgA, IgG или IgE соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, определяют функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы для специалиста в данной области техники в свете настоящего изобретения, и соответственно они все входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов, безусловно, входят в объем настоящего изобретения, однако последующее обсуждение будет в целом направлено на класс IgG молекул иммуноглобулина. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой примерно 23000 Дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", в которой легкие цепи прилегают к тяжелым цепям, начиная с устья "Y" и далее вдоль вариабельной области.

Антитела, их антигенсвязывающие полипептиды, варианты или производные согласно настоящему изобретению включают без ограничения поликлональные, моноклональные, полиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидной связью (sdFv), фрагменты, содержащие либо домен VK, либо домен VH, фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к LIGHT-антителам, раскрытые в данном документе). Молекулы иммуноглобулина или антитела по настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулина.

Легкие цепи относятся либо к классу каппа, либо к классу лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана либо с легкой каппа-цепью, либо с легкой лямбда-цепью. Как правило, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины генерируются либо гибридами, либо В-клетками, либо генно-инженерными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности расположены от N-конца на раздвоенных концах Y-образной конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

Как легкая, так и тяжелая цепи разделены на области, обладающие структурной и функциональной гомологией. Термины "константный" и "вариабельный" применяют в функциональном значении. В этом отношении следует понимать, что вариабельные домены как легкой (VK), так и тяжелой (VH) частей цепи определяют распознавание антигена и специфичность. Наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) определяют важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с рецептором Fc, связывание комплемента и т. п. По соглашению нумерация доменов константной области увеличивается по мере их удаления от антигенсвязывающего сайта или amino-конца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а C-концевая часть представляет собой константную область; домены CH3 и СК фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать эпитопы на антигенах и специфически связывать их. То есть домен VK и домен VH или подмножество определяющих комплементарность областей (CDR) антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует сайт связывания антигена, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, сайт связывания антигена определяется тремя CDR на каждой из цепей VH и VK (т. е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, определенные молекулы иммуноглобулина происходят из видов верблюдовых или сконструированы на основе иммуноглобулинов верблюдовых, при этом полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993).

Во встречающихся в природе антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие, несмежные последовательности аминокислот, которые позиционируются конкретным образом с образованием антигенсвязывающего домена при приобретении антителом своей трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость. Каркасные области в значительной степени принимают конформацию β -слоя, а CDR образуют петли, которые соединяют структуру β -слоя, а в некоторых случаях составляют ее часть. Таким образом, функцией каркасных областей является образование остова, который обеспечивает позиционирование CDR в правильной ориентации с помощью нековалентных взаимодействий между цепями. Антиген-связывающий домен, образованный позиционированными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность содействует нековалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Аминокислоты, содержащие CDR и каркасные области, соответственно, могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники для любой данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они были точно определены (см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

В случае, если существует два или более определения термина, применяемого и/или принятого в данной области техники, определение термина, используемое в данном документе, подразумевает включение всех таких значений, если явно не указано обратное. Конкретным примером является использование термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания несмежных сайтов связывания антигена, находящихся в вариабельной области как тяжелой, так и легкой цепи полипептидов. Эта конкретная область была описана Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983), и Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), которые вклю-

чены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определения CDR по Kabat и Chothia предусматривают перекрывание подмножеств аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что применение одного из двух определений для обозначения CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема термина, как определяется и применяется в данном документе. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из цитированных выше ссылок, представлены в таблице ниже в качестве сравнения. Точное число остатков, охватываемых конкретным CDR, будет варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут обычным образом определить, какие остатки составляют конкретный CDR, с учетом аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Kabat и соавторы также определили систему нумерации последовательностей вариабельного домена, которую можно применять к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить эту систему "нумерации по Kabat" к любой последовательности вариабельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. Используемый в данном документе термин "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, установленной Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

В дополнение к таблице выше, система присвоения номеров по Kabat описывает области CDR следующим образом: CDR-H1 начинается с примерно аминокислоты 31 (т. е. примерно через 9 остатков после первого остатка цистеина), содержит примерно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка от конца CDR-H1, содержит примерно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается с примерно тридцать третьего аминокислотного остатка от конца CDR-H2; содержит 3-25 аминокислот и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается с примерно остатка 24 (т. е. после остатка цистеина); содержит примерно 10-17 остатков и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается с примерно шестнадцатого остатка от конца CDR-L1 и содержит примерно 7 остатков. CDR-L3 начинается с примерно тридцать третьего остатка после конца CDR-L2 (т. е. после остатка цистеина); содержит примерно 7-11 остатков и заканчивается последовательностью F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

Описанные в данном документе антитела могут происходить от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В другом варианте осуществления вариабельная область может происходить от хрящевых рыб (например, от акул).

Используемый в данном документе термин "константная область тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из следующих доменов: домен CH1, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домен CH2, домен CH3 или их вариант или фрагмент. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH3, или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. В другом варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Дополнительно, в антителе для применения по настоящему изобретению может отсутствовать по меньшей мере часть домена CH2 (например, весь домен CH2 или его часть). Как указано выше, специалисту в данной области техники будет понятно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что она будет отличаться по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, может происходить из различных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. В другом примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную об-

ласть, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

Используемый в данном документе термин "константная область легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один константный домен каппа или константный домен лямбда.

"Пара легкая цепь-тяжелая цепь" относится к набору легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер за счет дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

Как указывалось ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей иммуноглобулинов различных классов хорошо известны. Используемый в данном документе термин "домен VH" предусматривает amino-концевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин "домен CH1" включает первый (наиболее близкий к amino-концу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 примыкает к домену VH и является amino-концевым по отношению к шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

Используемый в данном документе термин "домен CH2" предусматривает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от приблизительно остатка 244 до остатка 360 антитела при использовании общепринятых схем нумерации (остатки от 244 до 360, система нумерации по Kabat; и остатки 231-340, система нумерации EU; см. Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)). Домен CH2 уникален тем, что он не образует тесную пару с другим доменом. Наоборот, две N-сцепленные разветвленные углеводные цепи размещены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также получено убедительное документальное подтверждение, что домен CH3 продолжается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

Используемый в данном документе термин "шарнирная область" предусматривает часть тяжелой цепи молекулы, которая присоединяет домен CH1 к домену CH2. Эта шарнирная область содержит примерно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)).

Используемый в данном документе термин "дисульфидная связь" предусматривает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и СК связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU).

Используемый в данном документе термин "химерное антитело" будет означать любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. В определенных вариантах осуществления область или сайт связывания мишени будут происходить из источника, отличного от человека (например, от мыши или примата), а константная область является человеческой.

Как используется в данном документе, "процент гуманизации" рассчитывается путем определения количества различий аминокислот каркаса (т. е. различий, не относящихся к CDR) между гуманизованным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания этого числа из общего количества аминокислот, а затем деления его на общее количество аминокислот и умножения на 100.

Под "специфически связывается" или "обладает специфичностью к" обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание предусматривает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением говорят, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, если оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена лучше, чем если бы оно связывалось со случайным, не родственным ему эпитопом. Термин "специфичность" используется в данном документе для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" характеризуется более высокой специфичностью в отношении данного эпитопа, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем та, которой оно характеризуется в отношении родственного эпитопа "D."

Используемые в данном документе термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к мерам профилактики или предупреждения, целью которых является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как прогрессирование рака. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают без ограничения уменьшение выраженности симптомов, уменьшение степени тяжести заболевания, стабили-

зированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление болезненного состояния и ремиссию (либо частичную, либо полную), независимо от того, поддается ли обнаружению или нет. "Лечение" также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. К нуждающимся в лечении относят тех, у кого уже есть состояние или нарушение, а также тех, кто предрасположен к состоянию или нарушению, или тех, у кого нужно предупредить развитие состояния или нарушения.

Под "субъектом", или "индивидуумом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, для которого требуется постановка диагноза, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и зоопарковых, спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

Используемые в данном документе выражения, такие как "пациенту, нуждающемуся в лечении" или "субъекту, нуждающемуся в лечении", включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, у которых введение антитела или композиции по настоящему изобретению может обеспечить благоприятный эффект, например, для обнаружения, для диагностической процедуры и/или для лечения.

Антитела к GPRC5D.

При использовании гибридной технологии в прилагаемых экспериментальных примерах показано, что был получен ряд антител мыши. Секвенировали четырнадцать антител мыши и получили гуманизированные антитела. Эти гуманизированные антитела проявляли мощную GPRCSD-связывающую активность и были способны индуцировать опосредованный рецептором эндоцитоз. Тестирование *in vivo* показало, что эти антитела активно индуцируют ADCC и подавляют развитие опухолей.

Четыре антитела мыши, 34D3H1, 37B9C4, 58F9G10 и 6G10D9, прошли процесс гуманизации. Некоторые гуманизированные антитела, включая 6-H3L3, 6-H4L3 (оба происходят из 6G10D9), 58-H1L1, 58-H3L1 (оба происходят из 58F9G10), 34-H1L1 (происходит из 34D3H1) и 37-H1L1 (происходит из 37B9C4), дополнительно показали перспективность продолжения клинической разработки.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения представлены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка, представляющего собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D). Антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают (a) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34; (b) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47; (c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 54-59 или SEQ ID NO: 54, 60 и 56-59; или (d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73.

В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34. Примеры последовательностей для VH включают последовательности под SEQ ID NO: 7 и 35-37 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью любой из последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 35-37. Примеры последовательностей для VL включают последовательности под SEQ ID NO: 8 и 38-41 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью любой из последовательностей под SEQ ID NO: 8 и 38-41.

В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO: 35. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO: 38.

Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47. Примеры последовательностей для VH включают последовательности под SEQ ID NO: 9 и 48-50, или последовательность,

В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO: 76. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO: 82.

Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82.

В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO: 77. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90 или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO: 82.

Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются ADCC-компетентными. Способы и материалы, подходящие для получения ADCC-компетентного антитела, известны из уровня техники, такие как с использованием соответствующих Fc-фрагментов или путем уменьшения/удаления фукозилирования.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают: (a) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34; (b) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47; (c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 54-59 или SEQ ID NO: 54, 60 и 56-59 или (d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73, где каждая из приведенных последовательностей CDR содержит одну, две или три консервативные аминокислотные замены.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, содержащим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, несущественный аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменяется другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления нить аминокислот может быть заменена структурно сходной нитью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен представлены в таблице ниже, где показатель сходства 0 или выше указывает на то, что замена этих двух аминокислот друг другом является консервативной.

Таблица А
Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица В
Консервативные замены аминокислот

Для аминокислоты	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что описанные в данном документе антитела могут быть модифицированы таким образом, что они будут отличаться по аминокислотной последовательности от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они были получены. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из указанного белка, может быть сходной, например характеризоваться определенной процентной идентичностью исходной последовательности, например, она может быть на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% иден-

тичной исходной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CCR8 представляют собой модифицированные mAb, содержащие модифицированную константную область тяжелой цепи, такую как афукозилированная тяжелая цепь, которая с более высокой аффинностью связывается с активирующим рецептором Fcγ, который опосредует усиление ADCC, по сравнению с немодифицированным mAb. В некоторых вариантах осуществления антитела к CCR8 содержат тяжелую цепь, которая происходит из варианта IgG1 человека, которая содержит одну L234Y, L235Q, G236W, S239D/M, F243L, H268D, D270E, R292P, S298A, Y300L, V305I, K326D, A330L/M, I332E, K334A/E, P396L или их комбинацию, что обеспечивает усиление функции ADCC (вся нумерация EU).

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность или одну или несколько частиц, которые обычно не ассоциированы с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело по настоящему изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано для добавления функциональной частицы (например, PEG, лекарственного средства, токсина или метки).

Антитела, их варианты или производные по настоящему изобретению включают производные, которые модифицированы, т. е. путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например без ограничения антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с помощью известных методик, включая без ограничения специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, антитела могут содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

GPRC5D сверхэкспрессируется на определенных злокачественных гематологических клетках, таких как клетки множественной миеломы. Таким образом, антитела и фрагменты по настоящему изобретению могут использоваться для нацеливания на эти злокачественные клетки для их подавления, инактивации или разрушения. В одном примере антитело или его фрагмент конъюгированы со средством, которое помогает подавлять, инактивировать или разрушать злокачественную клетку. В данном документе показано, что антитела способны индуцировать эндоцитоз, опосредованный GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты могут быть конъюгированы с терапевтическими средствами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими средствами или PEG. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное средство может представлять собой короткую интерферирующую РНК (siRNA) или природный модулятор, такой как агонист стимулятора генов интерферона (STING) или агонист TLR7/8.

В одном варианте осуществления антитела или фрагменты по настоящему изобретению ковалентно присоединены к частице лекарственного средства. Частица лекарственного средства может представлять собой группу, реагирующую с точкой конъюгации на антителе, или может быть модифицирована для включения таковой. Например, частица лекарственного средства может быть присоединена путем алкилирования (например, по ε-аминогруппе остатков лизина или N-концу антител), восстановительного аминирования окисленного углевода, перэтерификации между гидроксильными и карбоксильными группами, амидированием по аминогруппам или карбоксильным группам и конъюгации с тиолами.

В некоторых вариантах осуществления число частиц лекарственного средства, *p*, конъюгированных на молекулу антитела, находится в диапазоне в среднем от 1 до 8; от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления *p* находится в диапазоне в среднем от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления *p* в среднем составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления *p* находится в диапазоне в среднем от приблизительно 1 до приблизительно 20, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6, от приблизительно 1 до приблизительно 5, от приблизительно 1 до приблизительно 4, от приблизительно 1 до приблизительно 3 или от приблизительно 1 до приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления *p* находится в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 7, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 2 до приблизительно 5, от приблизительно 2 до приблизительно 4 или от приблизительно 2 до приблизительно 3.

Например, если химическая активация белка приводит к образованию свободных тиольных групп, белок может быть конъюгирован с сульфгидрильным реагирующим средством. В одном аспекте средство представляет собой средство, который существенно специфичен в отношении свободных тиольных групп. Такие средства включают, например, малеимид, галогенацетамиды (например, с йодом, бромом или хлором), сложные эфиры галогенов (например, йода, брома или хлора), галогенметилкетоны (напри-

мер, с йодом, бромом или хлором), бензилгалогениды (например, йодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио.

Лекарство может быть связано с антителом или фрагментом с помощью линкера. Подходящие линкеры включают, например, расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Расщепляемый линкер обычно подвержен расщеплению во внутриклеточных условиях. Подходящие расщепляемые линкеры включают, например, пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, такой как лизосомальная протеаза или эндосомальная протеаза. В примерах вариантов осуществления линкер может представлять собой дипептидный линкер, такой как валин-цитруллин (val-cit), фенилаланин-лизин (phe-lys) линкер или малеимидокапроно-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (mc-Val-Cit-PABA) линкер. Другой линкер представляет собой сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (smcc). Конъюгация сульфо-smcc происходит посредством малеимидной группы, которая реагирует с сульфгидрилами (тиолами, -SH), тогда как ее сложный эфир сульфо-NHS является реактивным в отношении первичных аминов (таких, как находящиеся в лизине и N-конце белка или пептида). Еще одним линкером является малеимидокапроил (mc). Другие подходящие линкеры включают линкеры, гидролизующиеся при определенном pH или диапазоне pH, такие как гидрозоновый линкер. Дополнительные подходящие расщепляемые линкеры включают дисульфидные линкеры. Линкер может быть ковалентно связан с антителом до такой степени, что антитело должно подвергаться внутриклеточной деградации для высвобождения лекарственного средства, например, линкер mc и т.п.

Линкер может содержать группу для связывания с антителом. Например, линкер может содержать амино-, гидроксильную, карбоксильную или сульфгидрильную реакционноспособную группу (например, малеимид, галогенацетамиды (например, с йодом, бромом или хлором), галоидэфиры (например, с йодом, бромом или хлором), галогенметилкетоны (например, с йодом, бромом или хлором), бензилгалогениды (например, йодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио).

В некоторых вариантах осуществления частица лекарственного средства представляет собой цитотоксическое или цитостатическое средство, иммунодепрессант, радиоизотоп, токсин или т.п. Конъюгат можно использовать для подавления размножения опухолевой клетки или раковой клетки, вызывая апоптоз в опухолевой или раковой клетке или для лечения рака у пациента. Соответственно, конъюгат можно использовать в различных условиях для лечения форм рака у животных. Конъюгат можно использовать для доставки лекарственного средства к опухолевой или раковой клетке. Не ограничиваясь какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления конъюгат связывается или ассоциируется с раковой клеткой, экспрессирующей GPRC5D, и конъюгат и/или лекарственное средство могут проникать внутрь опухолевой или раковой клетки посредством опосредованного рецептором эндоцитоза.

Оказавшись внутри клетки, одна или несколько специфических пептидных последовательностей в конъюгате (например, в линкере) гидролитически расщепляются одной или несколькими протеазами, ассоциированными с опухолевыми клетками или с раковыми клетками, что приводит к высвобождению лекарственного средства. Затем высвобожденное лекарственное средство может свободно мигрировать внутри клетки и индуцировать цитотоксическую, цитостатическую или другие виды активности. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство отщепляется от антитела вне опухолевой или раковой клетки, и впоследствии лекарственное средство проникает в клетку или действует на клеточной поверхности.

Примеры частиц лекарственного средства или вариантов нагрузки выбраны из группы, состоящей из DM1 (майтанин, N²'-деацетил-N²'-(3-меркапто-1-оксопропил)- или N²'-деацетил-N²'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанин), mc-MMAD (6-малеимидокапроил-монометилауристатин-D или N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-2-метокси-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(2-тиазолил)этил]амино]пропил]-1-пирролидинил]-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-(9Cl)-L-валинамид), mc-MMAF (малеимидокапроил-монометилауристатин F или N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-N-метил-L-валил-L-валил-(3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метиламино)гептаноил-(αR,βR,2β)-β-метокси-α-метил-2-пирролидинпропаноил-L-фенилаланин) и mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-малеимидокапроил-ValCit-(p-аминобензилоксикарбонил)-монометилауристатин E или N-[[[4-[[N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-L-валил-N⁵-(аминокарбонил)-L-орнитил]амино]фенил]метокси]карбонил]-N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-гидрокси-1-метил-2-фенилэтил]амино]-1-метокси-2-метил-3-оксопропил]-1-пирролидинил]-2-метокси-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-L-валинамид). DM1 является производным ингибитора тубулина мйтанина, тогда как MMAD, MMAE и MMAF являются производными ауристатина. В некоторых вариантах осуществления частица лекарственного средства выбрана из группы, состоящей из mc-MMAF и mc-Val-Cit-PABA-MMAE. В некоторых вариантах осуществления частица лекарственного средства представляет собой мйтаниноид или ауристатин.

Антитела или фрагменты могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим средством, которое может предусматривать обнаруживаемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятором, гормоном, ферментом, олигонуклеотидом, фотоактивным терапевтическим или диагностическим средством, цитотоксическим средством, которое может представлять собой лекарственное средство или токсин, средством, усиливающим воздействие ультразвука, нерадиоактивной метки, их комбинацией и

другими подобными средствами, известными в данной области техники.

Антитела могут быть помечены обнаруживаемой меткой путем связывания их с хемилюминесцентным соединением. Присутствие антигенсвязывающего полипептида с хемилюминесцентной меткой затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами особенно применимых соединений для хемилюминесцентного мечения являются люминол, изолуминол, сложный ароматический эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир оксалата.

Антитела также могут быть помечены обнаруживаемой меткой с использованием испускающих флуоресценцию металлов, таких как ^{152}Eu или других из ряда лантанидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких металлохелатирующих групп, как диэтилентриаминапентауксусная кислота (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA). Методики конъюгирования различных частиц с антителом хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" в *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Бифункциональные молекулы и комбинированная терапия.

GPRC5D сверхэкспрессируется на определенных злокачественных гематологических клетках, таких как клетки множественной миеломы. Таким образом, антитела и фрагменты по настоящему изобретению могут использоваться для нацеливания на эти злокачественные клетки для их подавления, инактивации или разрушения. В некоторых вариантах осуществления представлена бифункциональная или биспецифическая молекула/антитело, которая нацеливается как на белок GPRC5D, так и на иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, естественной клетки-киллера, эозинофила, базофила и мастоцита. Молекулы на иммунной клетке, на которые может осуществляться нацеливание, включают, например, CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 и 4-1BB (также известный как CD137). Другие примеры включают PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) и CD47. Конкретные примеры биспецифичности включают без ограничения GPRC5D/CD3.

Также представлены различные форматы биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления каждый из фрагмента, специфического в отношении PD-L1, и второго фрагмента независимо выбран из Fab-фрагмента, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител.

В настоящем изобретении также представлены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела, их варианты или производные по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать полные вариабельные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида. Кроме того, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать части вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида.

Способы создания антител хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе. В определенных вариантах осуществления как вариабельная, так и константная области антигенсвязывающих полипептидов по настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и описанных в данном документе. Например, полностью человеческие антитела к конкретному антигену можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано с обеспечением получения таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которого были дезактивированы. Примеры методик, которые можно использовать для получения таких антител, описаны в патентах США 6150584, 6458592, 6420140, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Способы лечения.

Как описано в данном документе, антитела, варианты или производные по настоящему изобретению можно использовать в определенных способах лечения и диагностики.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на варианты терапии на основе антител, кото-

рые предусматривают введение антител по настоящему изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или нескольких нарушений или состояний, описанных в данном документе. Терапевтические соединения по настоящему изобретению включают без ограничения антитела по настоящему изобретению (включая их варианты и производные, как описано в данном документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела по настоящему изобретению (включая их варианты и производные, как описано в данном документе).

Антитела по настоящему изобретению также можно использовать для лечения или подавления рака. Как представлено выше, GPRC5D может сверхэкспрессироваться в раковых клетках, в частности, в клетках множественной миеломы. Было показано, что ингибирование GPRC5D является применимым для лечения форм рака.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления способ включает введение пациенту эффективного количества антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из раковых клеток у пациента сверхэкспрессирует GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент является ADCC-компетентным. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент дополнительно содержит цитотоксическое средство. В некоторых вариантах осуществления антитело является биспецифическим, при этом оно дополнительно нацеливается на иммунную клетку, такую как цитотоксическая Т-клетка.

В настоящем изобретении также представлены варианты клеточной терапии, такие как варианты терапии на основе Т-клеток (или NK-клеток, макрофагов) с химерным антигенным рецептором (CAR). Можно применять подходящую клетку, которая приводится в контакт с антителом к GPRC5D по настоящему изобретению (или, альтернативно, сконструирована с обеспечением экспрессии антитела к GPRC5D по настоящему изобретению). После такого контакта или конструирования клетка может затем быть введена пациенту с раком, нуждающемуся в лечении. У пациента с раком может иметься рак любого из описанных в данном документе типов. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, без ограничения инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), макрофаг или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления клетка была выделена из организма самого пациента с раком. В некоторых вариантах осуществления клетка была предоставлена донором или из банка клеток. Если клетка выделена из организма пациента с раком, нежелательные иммунные реакции могут быть минимизированы.

Неограничивающие примеры форм рака включают гематологические формы рака, такие как множественная миелома. Другие примеры включают варианты лейкоза (включая варианты острого лейкоза (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз)) и варианты хронического лейкоза (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), и варианты лимфомы (например, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома), и множественную миелому.

Конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их варианты или производные, возраст пациента, вес тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания, а также время введения, скорость введения, комбинацию препаратов и тяжесть конкретного заболевания, которое лечат. Оценка таких факторов лицами, осуществляющими уход, находится в рамках обычной квалификации в данной области техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, пути введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и требуемого эффекта. Используемое количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

Способы введения антител, вариантов включают без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или слизистокожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и их можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды по настоящему изобретению, можно вводить перорально, ректально, парентерально, интрацестеально, интравагинально, внутрибрюшинно, наружно (в виде порошков, мазей, капель или чрескожных пластырей), трансбуккально или в виде пероральных или назальных спреев.

Термин "парентеральный", используемый в данном документе, относится к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, интратермальную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

Введение может быть системным или местным. Кроме того, может требоваться введение антител по настоящему изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внут-

рижелудочковую и подоболочечную инъекцию; при этом внутрижелудочковая инъекция может осуществляться с помощью внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару, такому как резервуар Оммая. Также можно применять ингаляционное введение, например путем применения ингалятора или распылителя и состава с аэрозольным средством.

Может требоваться местное введение антигенсвязывающих полипептидов или композиций по настоящему изобретению в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например без ограничения местной инфузией во время операции, наружным применением, например в сочетании с перевязкой после операции, инъекцией, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, при этом указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или желеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны или волокна из силиката. Предпочтительно при введении белка, включая антитело, по настоящему изобретению необходимо соблюдать осторожность и использовать материалы, на которых белок не абсорбируется.

Количество антител по настоящему изобретению, которое будет эффективным для лечения, подавления и предупреждения воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, нарушения или состояния, можно определить с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для определения оптимального диапазона дозировок могут использоваться анализы *in vitro*. Точная доза, которая будет использоваться в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания, нарушения или состояния и должна определяться в соответствии с решением лечащего врача и особенностями каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости доза-ответ, полученных с помощью тест-систем *in vitro* или в модельных животных.

Как правило, вводимая пациенту дозировка антигенсвязывающих полипептидов по настоящему изобретению обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг веса тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг веса тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг веса тела пациента. Как правило, антитела человека характеризуются более продолжительным временем полужизни в организме человека, чем антитела из других видов вследствие иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, во многих случаях возможно применение более низких дозировок антител человека и меньшая частота введения. Дополнительно, дозировка и частота введения антител по настоящему изобретению могут быть снижены за счет усиления поглощения антител и их проникновения в ткани (например, в головной мозг), обеспечиваемых модификациями, такими как, например, липидирование.

В дополнительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые можно вводить с композициями по настоящему изобретению, включают без ограничения IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, средство, специфическое в отношении CD40, CD40L, и TNF- α .

В дополнительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению вводят в сочетании с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, лучевая терапия.

Способы диагностики.

Сверхэкспрессия GPRC5D наблюдается в определенных образцах опухолей, и пациенты, у которых имеются клетки со сверхэкспрессией GPRC5D, вероятно, будут восприимчивыми к лечению антителами к GPRC5D по настоящему изобретению. Соответственно, антитела по настоящему изобретению также можно использовать для диагностических и прогностических целей.

Образец, который предпочтительно предусматривает клетку, может быть получен из организма пациента, который может представлять собой пациента с раком или пациента, которому требуется постановка диагноза. Клетка представляет собой клетку опухолевой ткани или опухолевого блока, образца крови, образца мочи или любого образца из организма пациента. После необязательной предварительной обработки образца образец можно инкубировать с антителом по настоящему изобретению в условиях, позволяющих антителу взаимодействовать с белком GPRC5D, потенциально присутствующим в образце. Для обнаружения присутствия белка GPRC5D в образце можно использовать такие способы, как ELISA, используя преимущество антитела к GPRC5D.

Присутствие белка GPRC5D в образце (необязательно с указанием количества или концентрации) можно использовать для диагностики рака, в качестве индикатора того, что пациент подходит для лечения антителом, или в качестве индикатора того, что пациент ответил (или нет) на лечение рака. В случае прогностического способа обнаружение может быть выполнено один, два или больше раз на определенных стадиях после начала лечения рака для определения прогресса лечения.

Композиции.

В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит второе противораковое средство (например, ингибитор контрольной точки иммунного ответа).

В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более

конкретно у человека. Дополнительно, "фармацевтически приемлемый носитель" обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное средство для составления любого типа.

Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п. Если это требуется, композиция может также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих средств или буферизующих средств для регулирования pH, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты.

Также предусмотрены антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п. Композицию также можно составлять в виде суппозитория с традиционными связывающими средствами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального применения может содержать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т. д. фармацевтического качества. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences E.W. Martin, включенной в данный документ посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с носителем в количестве, подходящем для обеспечения формы для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Препарат для парентерального применения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

В одном варианте осуществления композиция составлена в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также содержать солюбилизующее средство и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты доставляются либо по отдельности, либо в виде смеси друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть помещена в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической чистоты или физиологический раствор. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

Соединения по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такие как производные соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т. д., и соли, образованные с катионами, такие как производные натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т. д.

Примеры

Пример 1. Получение моноклональных антител мыши к GPRC5D человека.

Белок GPRC5D человека использовали для иммунизации различных линий мышей и соответственно получали гибридомы. Для дальнейшего анализа было собрано более двадцати клонов гибридом.

Антитела, собранные из супернатантов гибридом, тестировали в отношении их связывания с белком GPRC5D человека, экспрессированным на клетках CHO K1. Клетки CHO-K1, стабильно экспрессирующие GPRC5D человека, собирали из колб. По 100 мкл клеток в количестве 1×10^6 клеток/мл инкубировали с антителами мыши в 3-кратных серийных разведениях в течение 30 минут на льду. После двукратной промывки с помощью 200 мкл буфера FACS клетки инкубировали со вторичным антителом в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл буфера FACS, переносили в пробирку BD Falcon вместимостью 5 мл и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что антитела мыши могут связываться с GPRC5D человека с высокой EC₅₀ (фиг. 1). Результаты представлены в таблице ниже. Все они проявляли хорошую связывающую активность.

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC 50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
2D3C12	46110	835137	0,4535	1,132	2,841	789027
6G10D9	6870	1429638	0,9116	0,9535	8,159	1422768
11C1H10	40235	859162	0,5274	1,101	3,368	818927
14C2A11C6	5573	728662	0,9934	0,8801	9,849	723089
14C2F7C6	15616	751279	0,9634	0,9615	9,193	735663
14F3H2	20428	872785	0,8744	1,146	7,489	852357
21C3C11B3	57013	1508205	0,6538	1,1	4,506	1451192
26E1D12	52742	677713	0,2246	1,303	1,677	624970
29A7H11B9D3	71394	1385928	0,4219	1,259	2,642	1314534
29A7H11H4C12	43439	1461931	0,7377	1,109	5,466	1418492
29B2C10	68634	1607305	0,6201	1,305	4,17	1538671
31H11C10H7	16791	961550	0,9534	1,134	8,983	944759
34D3F8B5	-16109	1407656	1,084	0,7475	12,12	1423765
34D3H1	-13314	1412131	0,8843	0,8042	7,662	1425446
34D4A10	2737	921851	1,019	0,8496	10,44	919114
36F11E9H3	13852	766682	0,8732	1,087	7,468	752830
37B9C4	10880	1758861	0,5917	0,9933	3,906	1747981
38A10E9A11	24016	1785041	0,9472	1,099	8,854	1761025
39D2B6	7833	1774093	0,5469	0,98	3,523	1766260
40A5B2	25394	1196144	0,5108	0,9236	3,242	1170750
57G11D4A10	-22363	2089505	0,9703	0,8141	9,34	2111868
58F9G10	-14744	2052463	0,9635	0,8313	9,194	2067207

Четырнадцать гибридом были субклонированы и были определены последовательности VH/VL (см. табл. 1).

Таблица 1
Последовательность VH/VL лидерных антител мыши

Название	Последовательность (CDR подчеркнуты)	SEQ ID NO:
6G10D9 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT TYT MHWVKRPGQGLEWLG YINPSSGYTNYNQKFK DKATL TAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS L RSRGYFDY WGQGTTLTVSS	1
6G10D9 VL	DIVMTQSQTFMSTSVGDRVRITC KASQNVGTAVV WYQQKTGQSPRLLIY SASNRYT GVPDRFTGSGSG TDFTLTISNMQSEDLADFFC QOYSSYPYT FGGGTK LEIK	2
21C3C11B3 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFI NYLIE WIKRPGQGLEWIG MINPGSGGTNYNEKFKDKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARN NWDV WGQGTTLTVSS	3
21C3C11B3 VL	DVVMTQSPLSLPVSLGDQASVSC RSSQSLVHSTG NTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDFRS	4

	GSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFC <u>SQSTHVPWTF</u> GGGTKLEIK	
29B2C10 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKLSCKASGYSTF <u>GYTM</u> <u>HWVKQSHGENLEWIGL</u> <u>INPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELLSTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDYWGQGTSVTVSS</u>	5
29B2C10 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASONVGSNV</u> <u>AWYQQKPGQSPKALIY</u> <u>SASYRYS</u> GVDPDRFTGNGS GTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYYNSPWT</u> FGGG TKLEIK	6
34D3H1 VH	EVHVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS <u>SYGM</u> <u>SWVRQTPDKRLEWVA</u> <u>TISSGGSYTYYPDSVKGRF</u> TISRDNAKNTLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR <u>QGG</u> <u>DAMDYWGQGTSVTVSS</u>	7
34D3H1 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC <u>RASQISNNLHW</u> YQQKSHESPRLLIK <u>YASQIS</u> GIPSRFSGSGSGTDF LSINSVETEDFGMYFC <u>QOSNSRLT</u> FGAGTKLELK	8
37B9C4 VH	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSVAVSGFTFS <u>SDYW</u> <u>MNWVRQSPEKGLEWVA</u> <u>EIRLKSNNYATHYAESV</u> <u>KGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTRP</u> <u>LLWFRRYYAMDYWGQGTSVTVSS</u>	9
37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRITISC <u>SASQGISNYLNWY</u> QQKPDGTVKLLIY <u>YTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDY</u> SLTISNLEPADIATYYC <u>QOYSKLPFT</u> FGSGTKLEIK	10
38A10E9A11 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVKQRPQGQGLEWIGY</u> <u>INPSSGYTNYNQKFKD</u> KATLTAGKSSSTAYMQLSSLSEDSAVYYCAS <u>LRS</u> <u>RGYFDYWGRGTTTLTVSS</u>	11
38A10E9A11 VL	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITC <u>KASONVGTAVA</u> WYQQKPGQSPKLLIY <u>SASNRYT</u> GVDPDRFTGSGSG TDFTLTISNMQSEDLAGYFC <u>QOYSSYPYT</u> FGGGTK LEIK	12

40A5B2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>RNIM</u> <u>HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNAGSKYNEKFKG</u> KATLTSDISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARE <u>EEV</u> <u>YYRYGAWFAY</u> WGHGTLTVSA	13
40A5B2 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC <u>RASQSVSTSSYSY</u> <u>MHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSG</u> SGTDFTLNIHPVEEEDATYYC <u>QHSWEIPRT</u> FGGG TKLEIK	14
58F9G10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFT <u>GYIHI</u> WVKQSHGKSLEWIG <u>YISCYNGATSFNOKFKGKA</u> TFTVDTSSSTAYMQFNLSLTSEDSAVYYCAR <u>TELRL</u> <u>GPWFAY</u> WGQGTTLTVSA	15
58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMASPGKVTMTCS <u>SASSSVSYMNW</u> YQQKSGTSPKRWIY <u>DTSKLAS</u> GVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAATYYC <u>QOWSNNPLT</u> FGAGTKL ELK	16
2D3C12 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFIN <u>NYLIE</u> WIKRPGQGLEWIG <u>MINPGSGGTNYNEKFKDKA</u> TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARN <u>NWDV</u> WGQGTTLTVSS	17
2D3C12 VL	DVVMTQSPSLPVS LGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTG</u> <u>NTYLH</u> WYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVDPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEADLG VYFC <u>SQSTHVPWTF</u> GGGTKLEIK	18
14C2A11C6 VH	QVHLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVKRPGQGLEWIGYINPNSAYTNYNOKFK</u> <u>DK</u> ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARR <u>VLLLRVLDFFDY</u> WGQGTTLTVSS	19
14C2A11C6 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINC <u>RASKSINKYLTWY</u> QEKPGKTNKLLIY <u>SGSTLOS</u> GIPSRFSGSGSGSDF LTISSEPEDFAMYYC <u>QQHNEYPLT</u> FGTGTKLELK	20
14F3H2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT <u>GYTM</u> <u>NWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGIRYNOKFKGK</u>	21

	ATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR <u>WGL</u> <u>RRAMDY</u> WGQGSTVTVSS	
14F3H2 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNV</u> <u>A</u> WYQQKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> GVPDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYNSSPWT</u> FGGGT KLEIK	22
26E1D12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT <u>GYTM</u> <u>N</u> WVKQSHGKNLEWIG <u>LINPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLAVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDY</u> WGQGSTVTVSS	23
26E1D12 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGSNV</u> <u>A</u> WYQQKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> GVPDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYNSSPWT</u> FGGG TKLEIK	24
29A7H11H4C12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT <u>GYTM</u> <u>H</u> WVKQSHGENLEWIG <u>LINPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDY</u> WGQGSTVTVSS	25
29A7H11H4C12 VL	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTC <u>KASQNVGSNVA</u> WYQQKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> GVPDRFTGNGSG TDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYNSSPWT</u> FGGGT KLEIK	26
34D4A10 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFIS <u>YLIE</u> WIKRPGQGLEWIG <u>MINPGSGGTNYNEKFKDKA</u> TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCAR <u>NWDV</u> WGQGTTLTVSS	27
34D4A10 VL	DVVMTQSPLSLPVS LGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTG</u> <u>NTYLH</u> WYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFC <u>SQSTHVPWTF</u> GGGTKLEIK	28

Пример 2. Связывание химерных антител с GPRC5D.

Гены VH и VK мыши были получены синтетическим путем, а затем соответственно клонированы в векторы, содержащие константные домены гамма-1 и каппа человека. Очищенные химерные антитела получали из трансфицированных клеток CHO.

Клетки CHO-K1, стабильно экспрессирующие GPRC5D человека, собирали из колб. По 100 мкл клеток в количестве 1×10^6 клеток/мл инкубировали с первичными химерными антителами в 3-кратных серийных разведениях, начиная с 300 нМ до 0,001 нМ, в течение 30 минут на льду. После двукратной промывки с помощью 200 мкл буфера FACS клетки инкубировали со вторичным антителом в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл буфера FACS, переносили в пробирку BD Falcon вместимостью 5 мл и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что химерные антитела могут связываться с GPRC5D человека с высокой EC50 (фиг. 2).

Результаты представлены в таблице ниже.

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
58F9G10	-521,8	414579	0,3596	0,8258	2,289	415101
40A5B2	1487	440269	0,3436	0,8189	2,206	438781
38A9E10A11	3016	386984	0,2453	1,037	1,759	383968
37B9C4	2078	405062	0,249	1,045	1,774	402985
34D3H1	3448	507844	0,5214	1,012	3,322	504396
29B2C10	4326	430443	0,342	1,041	2,198	426116
21C3C11B3	5774	403938	0,2293	1,286	1,696	398164
6G10D9	6886	458124	0,1012	1,343	1,262	451238

Пример 3. EC50 интернализации для химерных антител к GPRC5D на клетках CHO-GPRC5D.

Красители rHAb представляют собой чувствительные к pH красители, которые характеризуются очень низкой флуоресценцией при pH > 7 и резким увеличением флуоресценции, когда pH раствора становится кислым. Красители rHAb характеризуются максимумом возбуждения (Ex) при 532 нм и максимумом излучения (Em) при 560 нм. Антитела, конъюгированные с красителем rHAb, можно использовать для мониторинга интернализации антител, опосредованной рецептором. Когда конъюгат антитело-краситель rHAb связывается со своим рецептором на клеточной мембране, он проявляет минимальную флуоресценцию. Однако при интернализации, опосредованной рецептором, конъюгаты антитело-краситель rHAb перемещаются к эндосомальным и лизосомальным везикулам, где pH является кислым, вызывая флуоресценцию красителя rHAb. Эта флуоресценция может быть обнаружена с использованием различных методик, включая визуализацию клеток, проточную цитометрию и флуоресцентные ридеры на основе планшетов с соответствующими фильтрами.

Стабильно трансфицированные клетки GPRC5D CHO человека собирали с помощью 0,05% трипсина/ЭДТА (Gibco, 25300-054) и высевали в 96-луночный черный планшет (Thermo Scientific, № 165305) при плотности 10000 на 90 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч перед обработкой антителами, мечеными с помощью rHAb.

Для интернализации к клеткам в разных количествах добавляли химерные антитела GPRC5D, конъюгированные с rHAb, и осторожно перемешивали в течение 1-2 мин на перемешивающем устройстве для планшетов, а затем инкубировали в течение ночи для обеспечения интернализации (интернализация может быть обнаружена через несколько часов). Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при Ex/Em: 532 нм/560 нм на Tecan Infinite M1000 Pro. Для достижения более высокой чувствительности среду перед считыванием планшета заменяли на PBS.

Результаты, нормализованные с помощью DAR, показаны на фиг. 3. Как показано на фиг. 3, протестированные химерные антитела характеризуются сильной активностью интернализации.

Пример 4. Тестирование антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

В ADCC Reporter Bioassay используется альтернативное считывание на более ранней стадии активации пути ADCC MOA: активация транскрипции гена посредством пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) в эффекторной клетке. Кроме того, в ADCC Reporter Bioassay используются сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность), и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток. Биологическую активность антител в ADCC MOA количественно определяют с помощью люциферазы, продуцируемой в результате активации пути NFAT; активность люциферазы в эффекторной клетке количественно оценивают с помощью считывания люминесценции. Сигнал высокий, а фоновый уровень анализа низкий.

Серийные разведения химерного моноклонального антитела к GPRC5D инкубировали в течение 6 часов после индукции при 37°C со сконструированными эффекторными клетками Jurkat (эффекторными клетками ADCC Bioassay) с клетками-мишенями ADCC Bioassay (GPRC5D) или без них. Активность люциферазы определяли количественно с использованием реагента Bio-Glo™ (на фиг. 4). Все протестированные антитела проявляли мощную способность индуцировать ADCC.

Пример 5. Гуманизация mAb мыши.

Гены варибельной области антител мыши использовали для создания гуманизированных mAb. На первой стадии этого способа аминокислотные последовательности VH и VL mAb сравнивали с последовательностями в доступной базе данных последовательностей генов Ig человека, чтобы найти последовательности генов Ig зародышевой линии человека в целом с наилучшим совпадением.

Аминокислотные последовательности гуманизированного антитела представлены ниже.

Гуманизированные последовательности.
А. 34D3H1.

Таблица 2А
Гуманизация 34D3H1 - VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
34D3H1 VH	EVHVLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGM SWVRQTPDKRLEWVA TISSGGSYTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR QGG DAMDY WGQGTSTVTVSS	7
V1 (пересадка CDR)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM S WVRQAPGKGLEWV STISSGGSYTYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGG DAMDY WGQGLTVTVSS	35
V2 (с обратным и мутациям и)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM S WVRQ TP GKGLEWVA TISSGGSYTYYPDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQM SSL RAEDTAVYYCAR QGGDA MDYWGQGLTVTVSS	36
V3 (с обратным и мутациям и)	EV HL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM S WVRQ TP GK R LEWVA TISSGGSYTYYPDSVKGRFT ISRDNAKNSL N LQM SSL RAEDTAVYYCAR QGGDA MDYWGQGLTVTVSS	37

Таблица 2В
Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGMS	29
CDR-H2	TISSGGSYTYYPDSVKG	30
CDR-H3	QGGDAMDY	31

Таблица 2С
Гуманизация 34D3H1 - VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL 34D3H1	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC RASQSINNNLHW YQKSHESPRLLIK YASQIS IGIPSRFSGSGSGTDFT LSINSVETEDFGMYFC QQNSRL TFGAGTKLELK	8
V1 (пересадка CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQSINNNLHW YQKPGKAPKLLIY YASQIS IGVPSRFSGSGSGTDFT TLTISSLQPEDFATYYC QQNSRL TFGGGTKVEIK	38
V2 (с обратным и мутациям и)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSINNNLHW YQKPGKAPKLLIYYASQISIG I PSRFSGSGSGTDFT TLTISS V QPEDFATY F CQQNSRLTFGGGTKVEIK	39
V3 (с обратным и мутациям и)	DIQ L TQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSINNNLHWY QKPGK S PKLLIYYASQISIG I PSRFSGSGSGTDFTL TISS V QPEDFATY F CQQNSRLTFGGGTK L EIK	40

V4 (с обратным и мутациями)	DI <u>V</u> LTQSPSSLS <u>V</u> SVGDRVT <u>L</u> TCRASQSINNNLHW YQQKPGK <u>S</u> PKLLIYYASQSIG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFT LTISS <u>V</u> QPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTK <u>L</u> EIK	41
-----------------------------	---	----

Таблица 2D

Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASQSINNNLH	32
CDR-L2	YASQSIG	33
CDR-L3	QQSNSRLT	34

Таблица 2E

Гуманизированные антитела

	VL	v1 VL	v2 VL	v3 VL	v4 VL
VH	34-XI				
v1 VH		34-H1L1	34-H1L2	34-H1L3	34-H1L4
v2 VH		34-H2L1	34-H2L2	34-H2L3	34-H2L4
v3 VH		34-H3L1	34-H3L2	34-H3L3	34-H3L4

B. 37B9C4.

Таблица 3A

Гуманизация 37B9C4 - VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH 37B9C4	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFS <u>DYW</u> <u>M</u> NWVRQSPKGLEWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESV</u> <u>K</u> GRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIIYCT <u>R</u> <u>L</u> WFRRYYAMDYWGQGTSTVTVSS	9
V1 (пересадка CDR)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>DYWM</u> <u>N</u> WVRQAPKGLEWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESV</u> <u>K</u> GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>P</u> LLWFRRYYAMDYWGQGTSLTVTVSS	48
V2 (с обратным и мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>DYWM</u> NWVRQ <u>S</u> PGKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVK GRFTISRDNK <u>S</u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCT <u>R</u> PL LWFRRYYAMDYWGQGTSLTVTVSS	49
V3 (с обратным и мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>DYWM</u> NWVRQ <u>S</u> PGKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVK GRFTISRDD <u>S</u> SK <u>S</u> VYLQMNSLRAEDTAVYYCT <u>R</u> PL LWFRRYYAMDYWGQGTSLTVTVSS	50

Таблица 3B

Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	DYWMN	42
CDR-H2	EIRLKSNNYATHYAESVK	43
CDR-H3	PLLWFRRYYAMDY	44

Таблица 3С
Гуманизация 37B9C4 - VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLASLGDRITISC <u>SASQGISNYLN</u> WY QQKPDGTVKLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEPADIATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGSGTKLEIK	10
V1 (пересадка CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASQGISNYLN</u> W YQQKPGKAPKLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGGQGTKLEI K	51
V2 (с обратным и мутациям и)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASQGISNYLN</u> W YQQKPGK <u>TV</u> KLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPFTFGGQGTKLEI K	52
V3 (с обратным и мутациям и)	DIQMTQSPSSLSASVGDR <u>I</u> ITITC <u>SASQGISNYLN</u> WY QQKPGK <u>TV</u> KLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPFTFG <u>S</u> GQGTKLEIK	53
мутациям и)		

Таблица 3D
Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	SASQGISNYLN	45
CDR-L2	YTSSLHS	46
CDR-L3	QQYSKLPFT	47

Таблица 3Е
Гуманизированные антитела

	VL	v1 VL	v2 VL	v3 VL
VH	37B9C4-XI			
v1 VH		37-H1L1	37-H1L2	37-H1L3
v2 VH		37-H2L1	37-H2L2	37-H2L3
v3 VH		37-H3L1	37-H3L2	37-H3L3

С. 58F9G10.

Таблица 4А
Гуманизация 58F9G10 - VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH 58F9G10	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFT GYIIH WVKQSHGKSLEWIG YISCYNGATSFNQKFKG KA TFTVDTSSSTAYMQFNLSLSEDSAVYYCART ELR GPWFAY WGQGLTVTVSA	15
V1 (пересадка CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFT GYII H WVRQAPGQGLEWMG YISSYNAATSFNQKFKG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR TE LRGPWFAY WGQGLTVTVSS	61
V2 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYII HWVRQAPGQGLEWIG YISSYNA ATSFNQKFKGRV TFTV DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARTELRG PWFAYWGQGLTVTVSS	62
V3 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYII HWV K QAPGQGLEWIG YISSYNA ATSFNQKFKGRV TFTV DTSTSTVYME F SSLRSEDTAVYYCARTELRG PWFAYWGQGLTVTVSS	63
V4 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEVKKPGASVK I SCKASGYSFTGYIIH WV K QAPGQGLEWIG YISSYNA ATSFNQKFKGR A T FTV DTSTST A YME F SSLRSEDS A VYYCARTELGRP WFAYWGQGLTVTVSS	64

Таблица 4В
Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	GYIIH	54
CDR-H2	YISCYNGATSFNQKFKG YISSY N AATSFNQKFKG	60 55
CDR-H3	TELGRPWFAY	56

Таблица 4С
Гуманизация 58F9G10 - VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMASASPGKVTMTCS <u>SASSSVSYMNW</u> YQQKSGTSPKRWIY <u>DTSKLAS</u> GVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAATYYC <u>QQWSNNPL</u> TFGAGTKL ELK	16
V1 (пересадка CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS <u>SASSSVSYMNW</u> Y QQKPGKAPKLLIY <u>DTSKLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYC <u>QQWSNNPL</u> TFGQGTKLEI K	65
V2 (с обратным и	<u>D</u> TQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWY QQKPGKAPK <u>R</u> LIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKLEIK	66
мутациям и)		
V3 (с обратным и мутациям и)	<u>D</u> TQMTQSPSSLSASVGDRVT <u>M</u> TCSASSSVSYMNW YQQKPGKAPK <u>R</u> LIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISS <u>M</u> QPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKLEI K	67

Таблица 4D
Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	SASSSVSYMN	57
CDR-L2	DTSKLAS	58
CDR-L3	QQWSNNPLT	59

Таблица 4Е
Гуманизированные антитела

	VL	v1 VL	v2 VL	V3 VL
VH	58F9G10-XI			
v1 VH		58-H1L1	58-H1L2	58-H1L3
v2 VH		58-H2L1	58-H2L2	58-H2L3
v3 VH		58-H3L1	58-H3L2	58-H3L3
v4 VH		58-H4L1	58-H4L2	58-H4L3

D. 6G10D9

Таблица 5А
Гуманизация 6G10D9- VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH 6G10D9	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVKQRPGQGLEWLG</u> <u>YINPSSGYTNYNQKFK</u> <u>DK</u> ATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>L</u> <u>RSRGYFDY</u> WGQGTTLTVSS	1
V1 (пересадка CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVRQAPGQGLEWMG</u> <u>YINPSSGYTNYNQKFK</u>	74

	<u>DR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>SR</u> <u>LSR</u> <u>RGYFDY</u> WGQGLTVSS	
V2 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYTM HWVRQAPGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKDR VTMT <u>A</u> DTSTSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>AS</u> LR RGYFDYWGQGLTVSS	75
V3 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEV <u>A</u> KPGASVKVSCKASGYTFTTYTM HWV <u>K</u> QAPGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKDR VTMT <u>A</u> DTSTSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>AS</u> LR RGYFDYWGQGLTVSS	76
V4 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEV <u>A</u> KPGASVK <u>M</u> SCKASGYTFTTYT MHWV <u>K</u> QAPGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKD RVT <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> DTSTSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>AS</u> LR RGYFDYWGQGL <u>L</u> TVSS	77
V5 (с обратным и мутациям и)	QVQL <u>Q</u> QSGAEV <u>A</u> KPGASVK <u>M</u> SCKASGYTFTTYT MHWV <u>K</u> <u>Q</u> <u>R</u> PGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKD RVT <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> STSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>AS</u> LR RGYFDYWGQGL <u>L</u> TVSS	78
V6 (с обратным и мутациям и)	QVQL <u>Q</u> QSGAEV <u>A</u> KPGASVK <u>M</u> SCKASGYTFTTYT MHWV <u>K</u> <u>Q</u> <u>R</u> PGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKD <u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>K</u> STSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>AS</u> LR RGYFDYWGQGL <u>L</u> TVSS	79

Таблица 5В
Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	TYTMH	D01
CDR-H2	YINPSSGYTNYNQKFKD	D02
CDR-H3	LSRSGYFDY	D03

Таблица 5С
Гуманизация 6G10D9 - VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
6G10D9 VL	DIVMTQSQTFMSTSVGDRVRITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKTGQSPRLLIY <u>SASNRYT</u> GVPDRFTGSGSG TDFTLTISNMQSEDLADFFC <u>QOYSSYPYT</u> FGGGTK LEIK	2
V1 (пересадка CDR)	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTC <u>KASQNVGTAVVW</u> YQKPKGKAPKLLIY <u>SASNRYT</u> GVPSRFGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYC <u>QOYSSYPYT</u> FGGQTKLEI K	80
V2 (с обратным и мутациям и)	DIQLTQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVTTTCASQNVGTAVVW YQKPKGK <u>S</u> PKLLIYASNRYTGVPSRFGSGSGTEF TLTISLQPEDFAT <u>F</u> YCQYSSYPYTFGQGTKLEIK	81
V3 (с обратным и мутациям и)	DIQ <u>M</u> TQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVTTTCASQNVGTAVV WYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYASNRYTGVPSRFGSGSGT EFTLTIS <u>M</u> QPEDFAT <u>F</u> FCQYSSYPYTFGQGTKLE IK	82
V4 (с обратным и мутациям и)	DI <u>V</u> MTQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVTTTCASQNVGTAVV WYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYASNRYTGV <u>P</u> DRFSGSGSGT EFTLTIS <u>M</u> QPEDFAT <u>F</u> FCQYSSYPYTFG <u>G</u> GTKLE IK	83
V1a (версия а пересадки CDR)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>SASNRYT</u> GIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAVYYC <u>QOYSSYPYT</u> FGGQTKL EIK	84
V2a (с обратным и мутациям и)	EIVMTQSPATLS <u>T</u> SPGERATLSCKASQNVGTAVV WYQQKPGQ <u>S</u> PRLLIYASNRYTG <u>I</u> DRFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAV <u>F</u> FCQYSSYPYTFGQGTKLE IK	85
V3a (с обратным и мутациям и)	EIVMTQSPATLS <u>T</u> SPGER <u>V</u> TISCKASQNVGTAVVW YQKPKGQSPRLLIYASNRYTG <u>I</u> DR <u>F</u> TGSGSGT <u>D</u> F TLTIS <u>M</u> QSEDFAV <u>F</u> FCQYSSYPYTFG <u>G</u> GTKLEIK	86

Таблица 5D
Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	<u>KASQNVGTAVV</u>	71
CDR-L2	<u>SASNRYT</u>	72
CDR-L3	<u>QOYSSYPYT</u>	73

Таблица 5Е
Гуманизированные антитела

	VL	v1 VL	v2 VL	v3 VL	v4 VL	v1a VL	v2a VL	v3a VL
VH	6G10D9-XI							
v1 VH		6-H1L1	6-H1L2	6-H1L3				
v2 VH		6-H2L1	6-H2L2	6-H2L3				
v3 VH		6-H3L1	6-H3L2	6-H3L3				
v4 VH		6-H4L1	6-H4L2	6-H4L3				
v5 VH								
v6 VH								

Пример 6. Тестирование гуманизированных антител.

В этом примере тестировали некоторые гуманизированные антитела в отношении способности связываться с GPRC5D, экспрессируемым на клетках CHO-K1.

Из протестированных гуманизированных антител, антитела, происходящих из 6G10D9, 6-H2L1 и 6-H3L3, превосходили другие (фиг. 5, табл. 6).

Таблица 6
Показатели активности гуманизированных антител из 6G10D9 в отношении связывания GPRC5D

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
6G10D9-XI	6858	121725	0,2992	1,525	1,991	114867
6-H1L1	192,6	~ 6397	~ 3,102	1,198	~ 1264	~ 6205
6-H1L2	191,9	898894	5,224	1,19	167639	898702
6-H1L3	226,2	16478302	5,389	1,156	244790	16478076
6-H2L1	189,1	661560	5,039	1,232	109294	661371
6-H2L2	192,5	1271084	5,37	1,191	234364	1270892
6-H2L3	215,7	10592380	5,039	1,23	109279	10592164
6-H3L1	-205,1	74293	2,352	0,8392	225,1	74498
6-H3L2	68,94	47463	2,244	0,9532	175,3	47394
6-H3L3	3994	119304	0,9553	1,13	9,022	115310
6-H4L1	61,5	50293	1,654	0,9277	45,05	50231
6-H4L2	9,56	39449	1,976	0,911	94,63	39440
6-H4L3	2344	126413	0,9049	1,052	8,033	124069

Как показано на фиг. 6 и в табл. 7, оказалось, что все гуманизированные версии 58F9G10 обладают хорошими характеристиками.

Таблица 7

Показатели активности гуманизированных антител из 58F9G10 в отношении связывания GPRC5D

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
58F9G10-XI	6697	127349	0,2925	1,292	1,961	120652
58-H1L1	15047	107881	0,2519	1,342	1,786	92834
58-H1L2	5500	114432	0,2632	1,238	1,833	108932
58-H1L3	4227	105346	0,2308	1,14	1,701	101119
58-H2L1	3617	109672	0,3776	1,064	2,386	106055
58-H2L2	4837	107888	0,3448	1,091	2,212	103050
58-H2L3	1229	91713	0,2697	0,9633	1,861	90483
58-H3L1	9887	103663	-0,1918	1,382	0,643	93776
58-H3L2	5981	105458	0,3742	1,195	2,367	99476
58-H3L3	4022	97718	0,3177	1,105	2,078	93695
58-H4L1	4993	104559	0,3655	1,179	2,32	99566
58-H4L2	4600	105051	0,3407	1,143	2,191	100451
58-H4L3	6249	102650	0,2874	1,27	1,938	96401

Аналогично, как показано на фиг. 7 и в табл. 8, оказалось, что все гуманизированные версии 34D3H1 обладают хорошими характеристиками, сравнимыми с химерным антителом.

Таблица 8

Показатели активности гуманизированных антител из 34D3H1 в отношении связывания GPRC5D

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
34-XI	16525	192054	0,4947	1,454	3,124	175530
34-H1L1	10921	196570	0,5908	1,314	3,898	185650
34-H1L2	13856	182030	0,5836	1,436	3,834	168174
34-H1L3	10620	185840	0,5732	1,167	3,743	175220
34-H1L4	10299	188925	0,5999	1,195	3,98	178626
34-H2L1	7854	187153	0,6188	1,173	4,157	179298
34-H2L2	8736	178873	0,6254	1,118	4,221	170137
34-H2L3	7063	185842	0,5832	1,11	3,83	178779
34-H2L4	4393	192405	0,6092	1,041	4,066	188012
34-H3L1	11139	178248	0,5207	1,228	3,317	167109
34-H3L2	9036	179809	0,6464	1,146	4,43	170773
34-H3L3	9118	192976	0,6508	1,1	4,475	183858
34-H3L4	12751	192533	0,5981	1,263	3,963	179782

Также как показано на фиг. 8 и в табл. 9, оказалось, что все гуманизированные версии 37B9C4 обладают хорошими характеристиками, сравнимыми с химерным аналогом.

Таблица 9

Показатели активности гуманизированных антител из 37B9C4 в отношении связывания GPRC5D

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
37B9C4-XI	11711	188479	0,2364	1,502	1,723	176769
37-H1L1	9596	178413	0,3574	1,613	2,277	168817
37-H1L2	8848	181865	0,3502	1,534	2,24	173017
37-H1L3	10445	173229	0,2332	1,528	1,711	162784
37-H2L1	9184	175072	0,351	1,583	2,244	165888
37-H2L2	9383	175293	0,3455	1,656	2,216	165910
37-H2L3	8049	168032	0,3334	1,564	2,155	159982
37-H3L1	6372	179261	0,2921	1,35	1,96	172889
37-H3L2	9193	179304	0,3153	1,428	2,067	170111
37-H3L3	7780	181053	0,2846	1,305	1,926	173273

На основании приведенных выше данных, гуманизированные антитела 6-H3L3, 6-H4L3, 58-H1L1, 58-H3L1, 34-H1L1 и 37-H1L1 были отобраны для дальнейшего подтверждающего тестирования.

Пример 7. Подтверждающее тестирование отобранных гуманизированных антител.

В этом примере тестировали некоторые гуманизированные антитела (6-H3L3, 6-H4L3, 58-H1L1, 58-H3L1, 34-H1L1 и 37-H1L1) в отношении их способности связываться с белком GPRC5D человека, экспрессированным на клетках CHO-K1 и NCI-H929.

Данные связывания с CHO-K1 представлены на фиг. 9 и обобщены в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Связывание с GPRC5D на клетках CHO-K1

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
6-XI	523,9	104077	0,4723	1,095	2,967	103553
58-XI	52,25	107000	0,5562	0,9481	3,599	106948
6-H3L3	172	134045	1,412	0,8045	25,82	133873
6-H4L3	109,4	145833	1,421	0,7392	26,34	145724
58-H1L1	275,4	99454	0,579	0,972	3,793	99178
58-H3L1	75,37	104402	0,612	0,9135	4,093	104326
34-XI	688,6	117714	0,5776	1,054	3,781	117025

37-XI	792,6	113379	0,3877	1,175	2,442	112586
34-H1L1	170,8	119038	0,781	0,8745	6,04	118867
37-H1L1	523,2	102496	0,511	1,042	3,244	101973

Таблица 11
Связывание с GPRC5D на клетках NCI-H929

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
6-XI	269,4	13785	0,05146	1,313	1,126	13515
58-XI	261,4	14738	0,1596	1,269	1,444	14476
6-H3L3	129,8	21859	1,465	0,8063	29,18	21730
6-H4L3	80,05	28987	1,606	0,7142	40,33	28907
58-H1L1	281	13474	0,1648	1,319	1,462	13193
58-H3L1	275,5	13934	0,3	1,297	1,995	13658
34-XI	181,1	18146	0,7587	0,9911	5,738	17965
34-H1L1	199,3	17911	0,8048	1,011	6,379	17712
37-XI	337,6	13807	-0,05621	1,41	0,8786	13470
37-H1L1	341,8	13534	-0,1991	1,419	0,6323	13192

Таким образом, эти данные подтверждают, что эти отобранные гуманизированные антитела пригодны для дальнейшей клинической разработки.

Пример 8. ADCC гуманизированных антител.

В ADCC Reporter Bioassay используется альтернативное считывание на более ранней стадии активации пути ADCC MOA: активация транскрипции гена посредством пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) в эффекторной клетке. Кроме того, в ADCC Reporter Bioassay используются сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность), и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток. Биологическую активность антител в ADCC MOA количественно определяют с помощью люциферазы, продуцируемой в результате активации пути NFAT; активность люциферазы в эффекторной клетке количественно оценивают с помощью считывания люминесценции. Сигнал высокий, а фоновый уровень анализа низкий.

Серийные разведения Ab к GPRC5D человека инкубировали в течение 6 часов после индукции при 37°C со сконструированными эффекторными клетками Jurkat (эффекторными клетками ADCC Bioassay) и с клетками-мишенями ADCC Bioassay (экспрессирующими GPRC5D). Активность люциферазы определяли количественно с использованием реагента Bio-Glo™.

Результаты представлены на фиг. 11, на которой показано, что эти гуманизированные антитела индуцировали сильную ADCC-активность в линиях клеток со сверхэкспрессией GPRC5D и линиях клеток MM (множественной миеломы) с эндогенной экспрессией.

Пример 9. Интернализация гуманизированных антител.

В этом примере тестировали гуманизированные антитела в отношении их показателей активности индукции интернализации. В примере использовали новый гидрофильный и яркий чувствительный к pH краситель (краситель pHAb), который не флуоресцирует при нейтральном pH, но становится высоко флуоресцентным при кислом pH при интернализации. Его можно использовать для обнаружения процесса интернализации. Клетки NCI-H929 и MM. 1R эндогенно экспрессировали GPRC5D человека в качестве клеток-мишеней, для оценки интернализации антитела к GPRC5D человека *in vitro* добавляли детектирующее антитело, меченное красителем pHAb.

Серийные разведения антител к GPRC5D человека инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Обнаружена активность люциферазы. Результаты на фиг. 12, показывают, что эти гуманизированные анти-

тела обладают очень сильной активностью интернализации как в отношении линий клеток со сверхэкспрессией GPRC5D, так и в отношении линий клеток MM с эндогенной экспрессией.

Пример 10. Показатель активности уничтожения для ADC на основе GPRC5D.

В этом примере тестировали два конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в отношении их показателей активности уничтожения клеток-мишеней. Эти ADC предусматривали 37B9C4 и 58F9G10, соответственно конъюгированные с токсичным лекарственным средством монометилауриатином Е (MMAE).

Сконструированные клетки HEK293 и NCI-H929, экспрессирующие GPRC5D человека (HEK293/HGPRC5D и NCI-H929/HGPRC5D), клетки NCI-H929 и MM.1R, эндогенно экспрессирующие GPRC5D, высевали в 96-луночный планшет по 3000-4000 клеток на лунку. Клетки обрабатывали с помощью 37B9C4-MMAE и 58F9G10-MMAE в соответствующих концентрациях в течение 5 дней. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTite, посеянного в 96-луночный планшет при 3000~4000 клеток на лунку с реагентом r-Glo. Активность люциферазы обнаруживали с помощью Envision. Результаты на фиг. 13 и в табл. 12, показывают, что эти гуманизированные антитела обладают очень сильной активностью уничтожения.

Таблица 12
Показатели активности уничтожения для ADC

	HeK- 293/H_GPRC5D (IC50, нМ)	MM.1R (IC50, нМ)	NCI-H929 (IC50, нМ)	NCI- H929/GPRC5D (IC50, нМ)
37B9C4- MMAE	0,025	0,14	0,23	0,11
58F9G10- MMAE	0,026	0,07	0,99	0,14

Пример 11. Показатели противоопухолевой активности in vivo.

В этом примере для тестирования показателей противоопухолевой активности антитела 37B9C4 (H1L1) использовали модель CDX на животных.

В этом исследовании использовали 6-8-недельных самок мышей NCG (Jiangsu Jicui Yaokang Biotechnology Co., Ltd). Каждую мышь инокулировали подкожно в правую подмышечную (боковую) область опухолевые клетки MM.1R (2×10⁶) в 0,1 мл PBS с матригелем (V:V=1:1) для развития опухоли. Животных случайным образом группировали, когда объем опухоли достигал примерно 60 мм³, после чего начинали лечение для исследования эффективности. 37B9C4 в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг вводили внутривенно (в/в) в день 0, день 7, день 14. Эксперимент прекращали в день 19, когда средний объем опухоли в группе среды-носителя превышал 2000 мм³. Средний объем опухоли в группе PBS, группе 37B9C4 (1 мг/кг), группе 37B9C4 (3 мг/кг) и группе 37B9C4 (10 мг/кг) составлял 2498,58 мм³, 1196,15 мм³, 0,00 мм³ (6/6 CR) и 0,00 мм³ (6/6 CR) соответственно. Размер опухоли измеряли три раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем выражали в мм³ по формуле: $V = 0,5 a \times b^2$, где а и b - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Точки данных представляют среднее значение группы (n=6), планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM).

Вес тела мышей, несущих опухоли MM.1R, регулярно подвергали мониторингу в качестве косвенного показателя токсичности. На фиг. 14А показана кривая роста опухоли у мышей, несущих опухоли MM.1R, после введения 37B9C4. Антитело дозозависимым образом обеспечивало подавление роста опухоли в этой модели опухоли, и полное подавление опухоли достигалось при дозе 3 мг/кг или выше.

Подробные изменения веса тела и относительное изменение веса тела мышей с опухолями MM.1R после введения показаны на фиг. 14В. В течение периода введения все группы мышей не имели значительной потери веса тела, а мыши в группе введения характеризовались хорошей переносимостью, что свидетельствует о безопасности лечения.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться описанными конкретными вариантами осуществления, которые предназначены в качестве одиночных иллюстраций отдельных аспектов изобретения, и любые композиции или способы, которые функционально эквивалентны, входят в объем настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что в способах и композициях по настоящему изобретению могут быть сделаны различные модификации и вариации без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение охватывает модификации и варианты настоящего изобретения при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения, и их эквиваленты.

Все публикации и заявки на патенты, упоминаемые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и отдельно указана в качестве включенной посредством ссылки.

Перечень последовательностей

<110> LaNova Medicines Development Co., Ltd.
 <120> Моноклональные антитела к GPRC5D и варианты их применения
 <130> 70LG-325887-WO2
 <150> PCT/CN2021/070314
 <151> 2021-01-05
 <160> 86
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетический
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> синтетический

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Thr Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Arg Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3

<211> 113

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

048142

85

90

95

Ala Arg Asn Trp Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 4
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 5
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
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 Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Leu Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

048142

100

105

<210> 7
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 7

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Gly Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 106
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn
 20 25 30

048142

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Arg Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 9
<211> 124
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 9

Glu Val Asn Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Pro Leu Leu Trp Phe Arg Arg Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Ala Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Gly Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

<211> 122

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 13

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn
20 25 30

Ile Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Ile 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

Ala Arg Glu Glu Val Tyr Tyr Arg Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 14

<211> 111

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 14

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 15

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Glu Leu Arg Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 16

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 16

Gln Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 17

<211> 113

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Trp Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 18
 <211> 112
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 18

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 122
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 19

Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Leu Leu Leu Arg Val Leu Asp Phe Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 20

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 21

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 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 Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Leu Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 23

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 23

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ala Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Leu Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 24

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Ser	Asn
			20					25					30		

Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser
65					70					75					80

Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Asn	Ser	Pro	Trp
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100						105		

<210> 25

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 25

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Met	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25					30		

Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Glu	Asn	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	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	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ser Arg Trp Gly Leu Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 113
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Trp Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 28

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 28

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 29
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 29

Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 30
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 30

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 31
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 31

Gln Gly Gly Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 32
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 32

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn Leu His
 1 5 10

<210> 33
 <211> 7

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 33

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

<210> 34
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 34

Gln Gln Ser Asn Ser Arg Leu Thr
 1 5

<210> 35
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Gly Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 117
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Gly Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 117
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 37

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Gly Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Arg Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 39
 <211> 106
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Arg Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40
 <211> 106
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 40

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Arg Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 41

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Arg Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 42

Asp Tyr Trp Met Asn

1

5

<210> 43
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 43

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 44
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 44

Pro Leu Leu Trp Phe Arg Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 45

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 46
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 46

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 47

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe Thr
 1 5

<210> 48
 <211> 124
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Pro Leu Leu Trp Phe Arg Arg Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49
 <211> 124
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Pro Leu Leu Trp Phe Arg Arg Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50

<211> 124

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Pro Leu Leu Trp Phe Arg Arg Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 52

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

048142

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

<210> 53
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетический
 <400> 53

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

<210> 54
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 54

Gly Tyr Tyr Ile His
 1 5

<210> 55
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 55

Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 56
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 56

Thr Glu Leu Arg Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 57
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 57

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 1 5 10

<210> 58

<211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 58

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 59
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 59

Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
 1 5

<210> 60
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 60

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 61
 <211> 119
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 61

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 Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

Ala Arg Thr Glu Leu Arg Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 62

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 Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Val 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

Ala Arg Thr Glu Leu Arg Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 63
 <211> 119
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 63

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 Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Glu Leu Arg Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64
 <211> 119
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Glu Leu Arg Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 65

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66

<211> 106
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 66

Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 67
 <211> 106
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 67

Asp Thr Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

048142

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 68
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 68

Thr Tyr Thr Met His
1 5

<210> 69
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 69

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 70
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 70

Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 71
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 71

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Val
 1 5 10

<210> 72

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 72

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 73

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 73

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 74

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 74

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 Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

048142

Lys Asp 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

Ser Arg Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 75

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 Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala 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

Ala Arg Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala 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

Ala Ser Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 77

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

048142

Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala 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

Ala Ser Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 78

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys 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

Ala Ser Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Gly Lys 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

Ala Ser Leu Arg Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 80

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

048142

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 81

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 83

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 84

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 85
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический

<400> 85

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Thr Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 86

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Thr Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное(ый) с цитотоксическим лекарственным средством, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 42, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 43 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 44; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 45, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 46 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 47.

2. ADC по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, 48, 49 или 50.

3. ADC по п.1 или 2, где вариабельная область легкой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, 51, 52 или 53.

4. ADC по любому из пп.1-3, где

вариабельная область тяжелой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, 48, 49 или 50; и

вариабельная область легкой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, 51, 52 или 53.

5. ADC по любому из пп.1-4, где вариабельная область тяжелой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 и вариабельная область легкой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

6. ADC по любому из пп.1-4, где цитотоксическое лекарственное средство представляет собой майтанзиноид или ауристатин.

7. ADC по п.6, где цитотоксическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из майтанзина, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)- или N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзина (DM1); монометилауристатина-D (MMAD); монометилауристатина-E (MMAE); и монометилауристатина-F (MMAF).

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное(ый) с монометилауристатином-E (MMAE), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 42, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 43, и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 44; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 45, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 47.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное(ый) с монометилауристатином-E (MMAE), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; и

вариабельную область легкой цепи, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

10. Способ лечения рака, включающий:

введение пациенту, имеющему гематологический рак, конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное(ый) с монометилауристатином-E (MMAE), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 42, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 43, и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 44; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность опреде-

ляющей комплементарность области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 45, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 47.

11. Способ лечения рака, включающий:

введение пациенту, имеющему гематологический рак, конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное(ый) с монометилауристатином-Е (ММАЕ), где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства С рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; и

вариабельную область легкой цепи, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

12. Способ по п.10 или 11, где гематологический рак представляет собой множественную миелому.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства С рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 42, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 43, и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 44; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 45, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 47.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где вариабельная область тяжелой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, 48, 49 или 50.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13 или 14, где вариабельная область легкой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, 51, 52 или 53.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.13-15, где вариабельная область тяжелой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, 48, 49 или 50; и

вариабельная область легкой цепи предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, 51, 52 или 53.

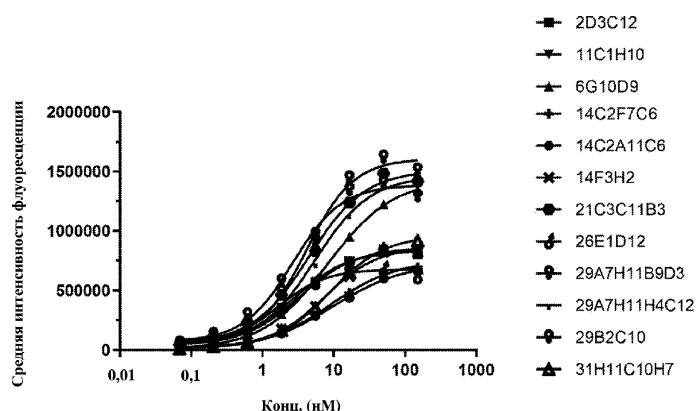
17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывается с белком, представляющим собой представителя D группы 5 семейства С рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), содержащее:

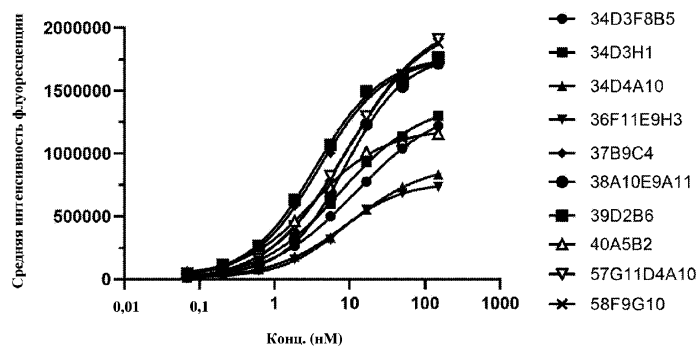
вариабельную область тяжелой цепи, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; и

вариабельную область легкой цепи, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

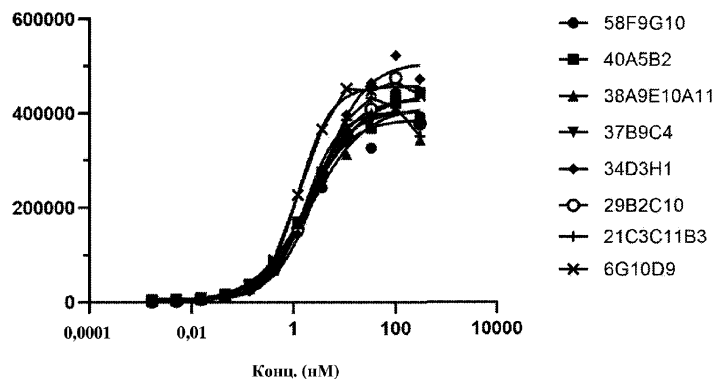
18. Способ лечения рака, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.13-17 пациенту, имеющему гематологический рак.

19. Способ по п.18, где гематологический рак представляет собой множественную миелому.

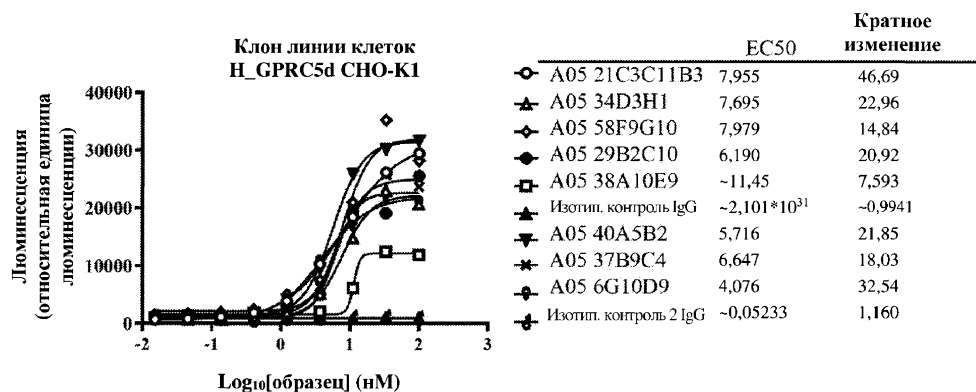




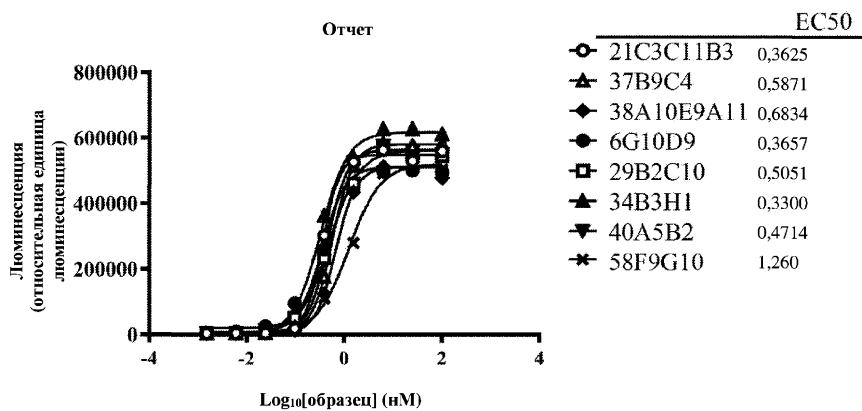
Фиг. 1



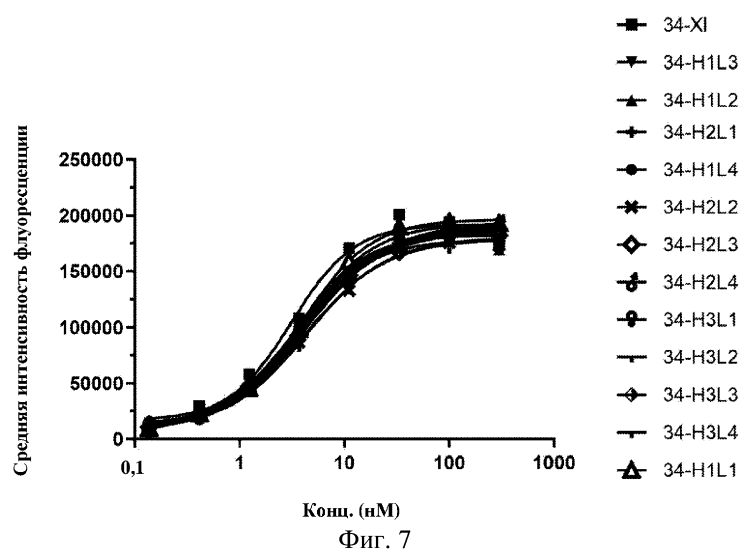
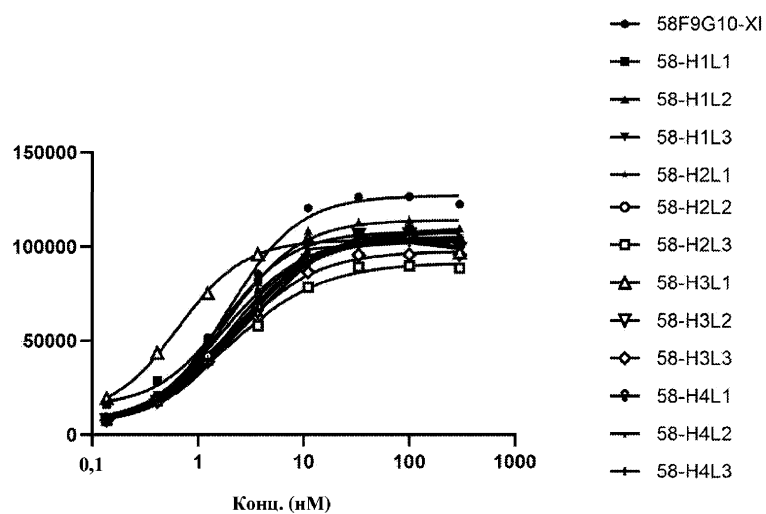
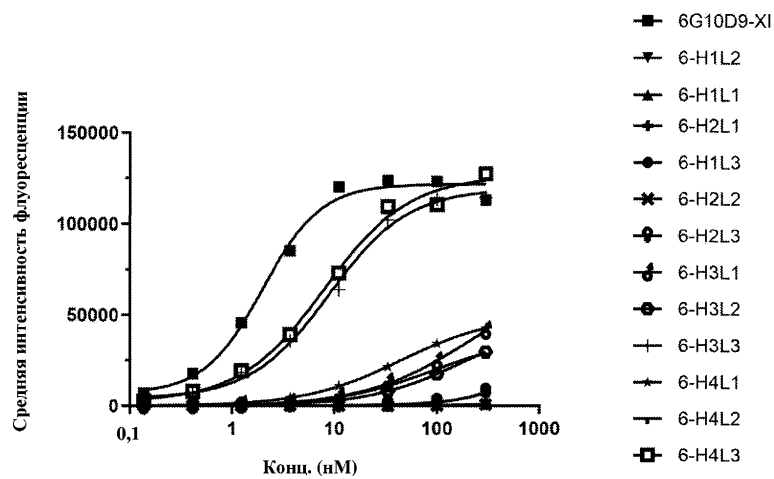
Фиг. 2

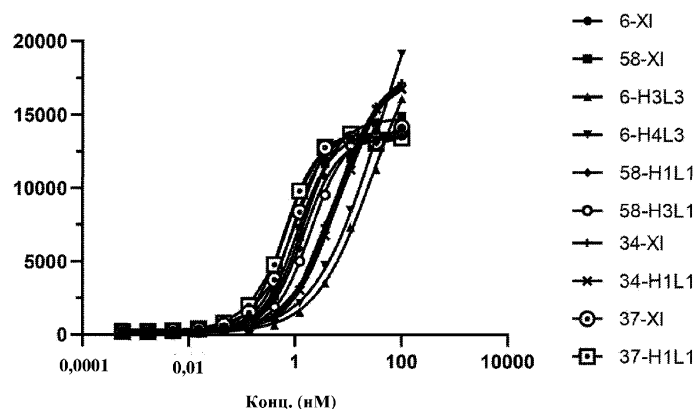
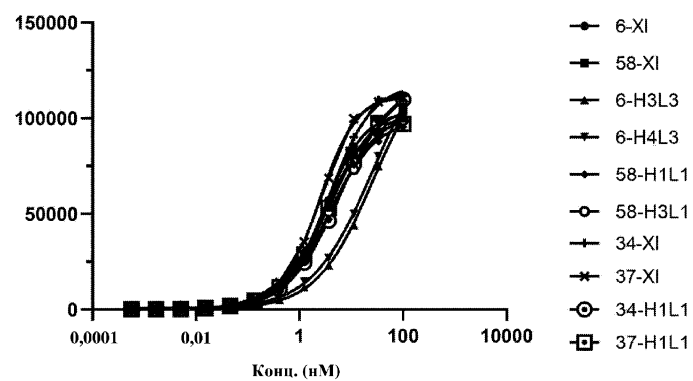
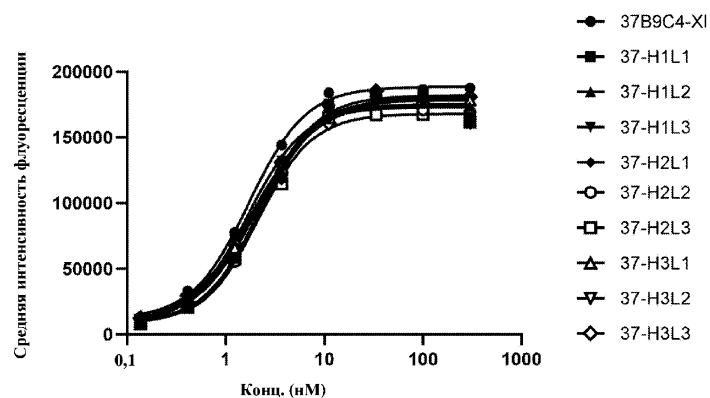


Фиг. 3

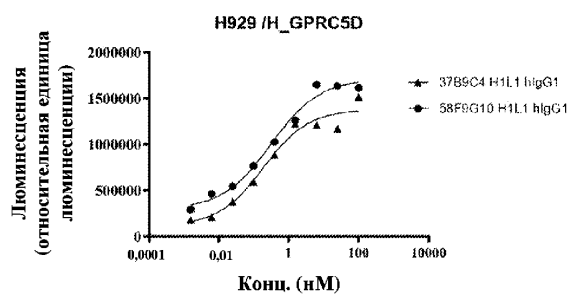
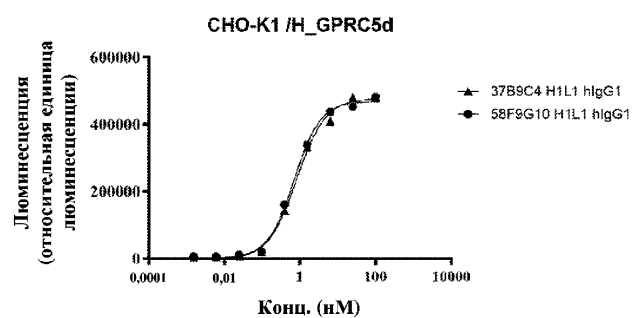


Фиг. 4

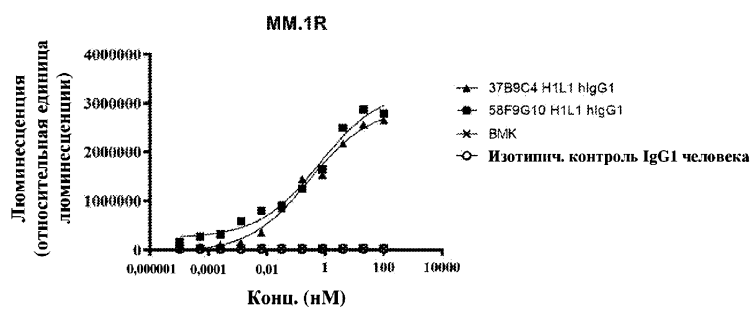
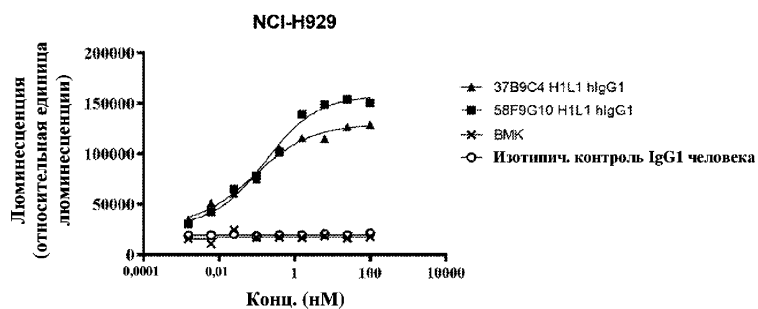




Линии клеток со сверхэкспрессией GPRC5D

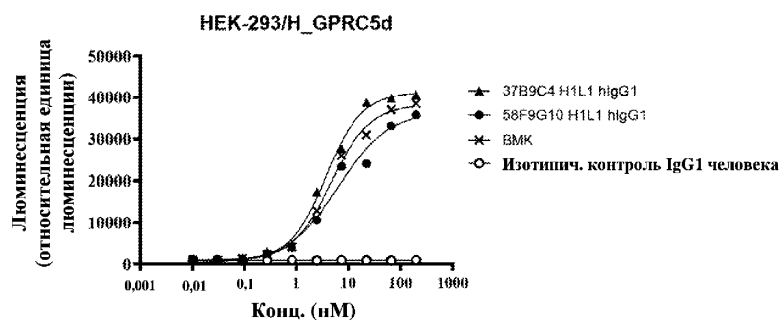
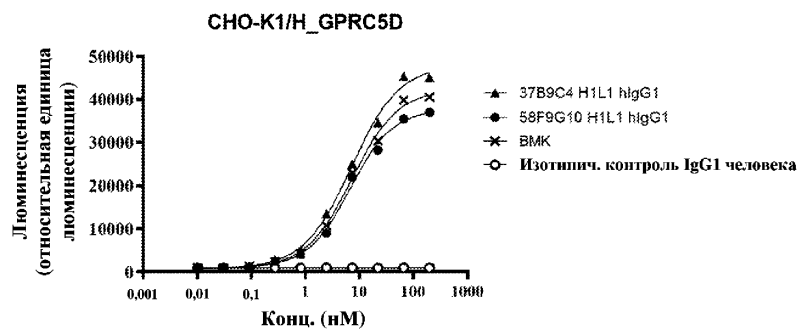


Линии клеток ММ с эндогенной экспрессией

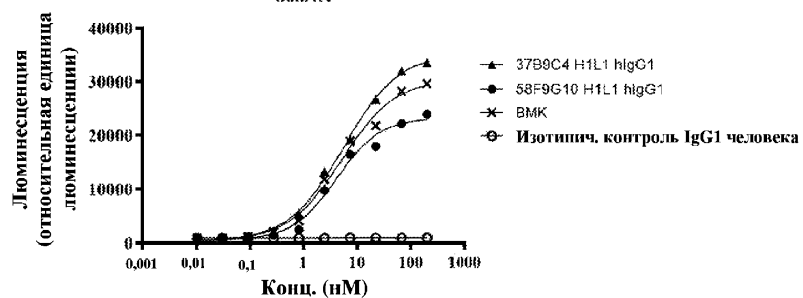
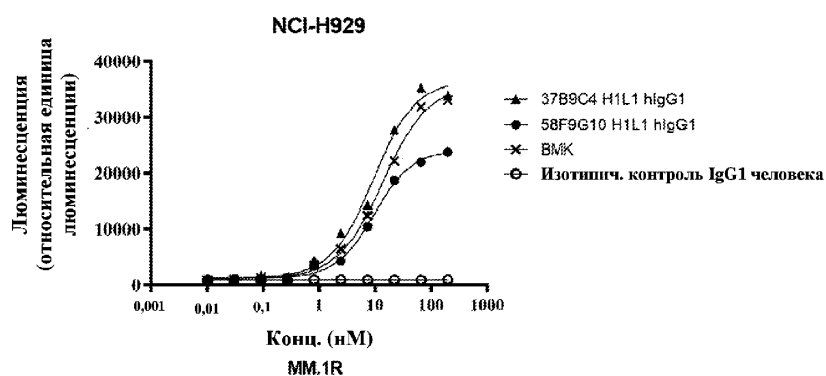


Фиг. 11

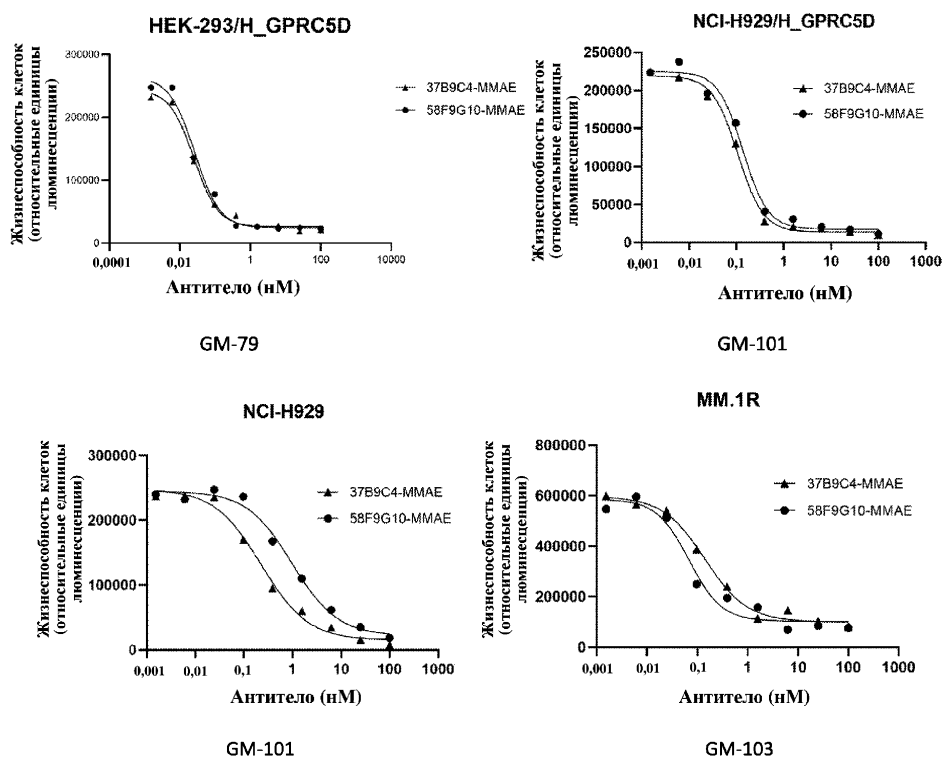
Линии клеток со сверхэкспрессией GPRC5D



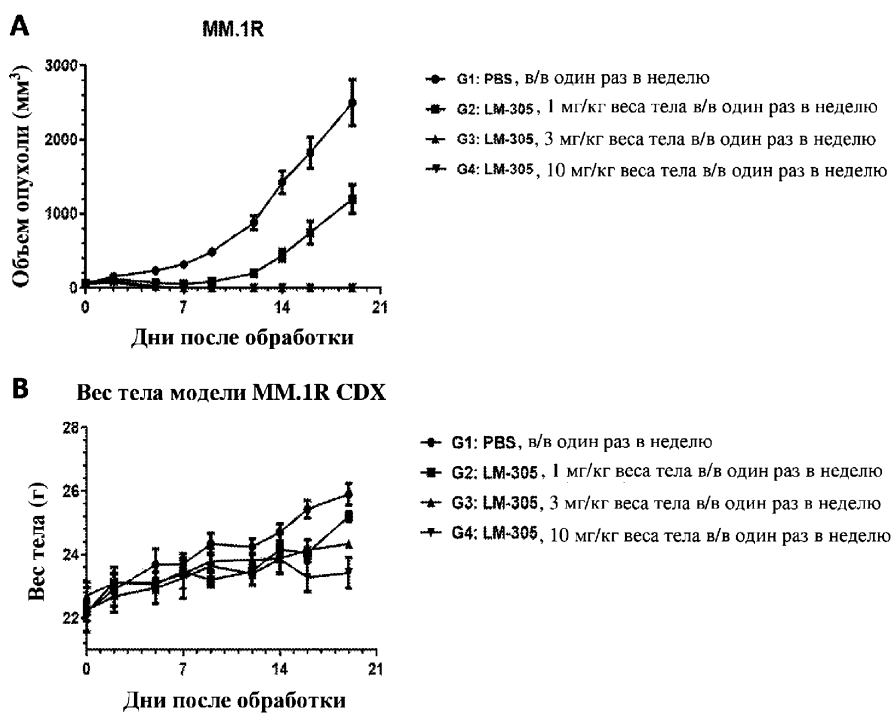
Линии клеток ММ с эндогенной экспрессией



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2