



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128431** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/18** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**C07K 16/40** (2006.01)**C12N 15/10** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)

A61P 35/00

A61P 43/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2021 02764	(72) Винахідник(и): Лю Цзе (US), Сомпаллі Кавіта (US)
(22) Дата подання заявки: 25.11.2019	(73) Володілець (володільці): ФОРТІ СЕВЕН, ІНК., 333 Lakeside Drive, Foster City, California 94404, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 11.07.2024	(74) Представник: Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/771,526	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2007253951 A1, 01.11.2007 US 8552157 B2, 08.10.2013 US 20120253017 A1, 04.10.2012 US 9932419 B1, 03.04.2018 US 2017081421 A1, 23.03.2017
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 26.11.2018	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.08.2021, Бюл.№ 32	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 10.07.2024, Бюл.№ 28	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2019/063091, 25.11.2019	

(54) ГУМАНІЗОВАНЕ АНТИТІЛО ДО c-Kit**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язується з c-Kit, та способу застосування такого антитіла для заміщення стовбурових клітин та лікування раку.

UA 128431 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНУ ЗАЯВКУ

Дана заявка заявляє пріоритет на підставі заявки 62/771,526, поданої 26 листопада 2018 р., яка включена у повному обсязі за допомогою посилання у відношенні всіх цілей.

ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 Дана заявка включає послідовності у текстовому файлі 540687US SL_ST25 розміром 31466 байт, створеному 25 листопада 2019 р., який включений шляхом посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

с-Kit (CD117) являє собою рецепторну тирозинкіназу типу III, яка зв'язується з фактором стовбурових клітин (SCF) - речовиною, що викликає ріст певних типів клітин, також відомим як "сталевий фактор" або "ліганд с-Kit". Коли вказаний рецептор зв'язується з фактором стовбурових клітин, він утворює димер, який активує його внутрішню тирозинкіназну активність, яка, у свою чергу, фосфорилує та активує сигнальні молекули, які розповсюджують вказаний сигнал у клітині. С-Kit являє собою маркер клітинної поверхні, застосовуваний для ідентифікації певних типів гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC) у кістковому мозку. Гемопоетичні стовбурові клітини (HSC), мультипотентні попередники (MPP) та загальні мієлоїдні попередники (CMP) експресують с-Kit на високому рівні. Було висловлено припущення, що антитіла до с-Kit можна застосовувати для видалення ендогенних клітин при замісній терапії стовбуровими клітинами (WO2016033201, WO2008067115).

СУТЬ ЗАЯВЛЕНОГО ВІНАХОДУ

20 Згідно з даним винаходом запропоновано антитіло, яке специфічно зв'язується з с-Kit людини, що містить зрілу варіабельну область важкого ланцюгу, що містить CDR H1, H2 та H3, визначені за нумерацією Кебота, представлені у SEQ ID NO: 2-4 відповідно, та зрілу варіабельну область легкого ланцюгу, що містить CDR L1, L2 та L3, визначені за нумерацією Кебота, представлені у SEQ ID NO: 6-8 відповідно, за винятком того, що присутні заміни 1, 2 або 3 залишків N на A у положенні 60 важкого ланцюгу, K на Q у положенні 64 важкого ланцюгу та N на Q у положенні 30 легкого ланцюгу, положення пронумеровані відповідно до Кебота.

Необов'язково, CDR H1, H2 та H3, визначені за нумерацією Кебота, являють собою SEQ ID NO: 2-4 відповідно, та CDR L1, L2 та L3, визначені за нумерацією Кебота, являють собою SEQ ID NO: 6-8 відповідно, за виключенням того, що присутні заміни K на Q у положенні 64 важкого ланцюгу та N на Q у положенні 30 легкого ланцюгу.

Необов'язково, CDR H1, H2 та H3, визначені за нумерацією Кебота, являють собою SEQ ID NO: 2-4 відповідно, та CDR L1, L2 та L3, визначені за нумерацією Кебота, являють собою SEQ ID NO: 6-8 відповідно, за виключенням того, що присутні заміни N на A у положенні 60 важкого ланцюгу, K на Q у положенні 64 важкого ланцюгу та N на Q у положенні 30 легкого ланцюгу.

35 Необов'язково, зріла варіабельна область важкого ланцюгу має щонайменше 85, 90, 95, 98 або 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 13, 17 або 21 (AH2, AH3 або AH4), та зріла варіабельна область легкого ланцюгу має щонайменше 85, 90, 95, 98, 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 53 (NL2) за умови, що будь-яке відхилення від зазначених SEQ ID NO знаходиться поза CDR.

40 Необов'язково, положення 1 важкого ланцюгу за нумерацією Кебота може бути зайняте E. Необов'язково, наступні положення зрілої варіабельної області легкого ланцюгу зайняті амінокислотами наступним чином: положення 9 зайняте L, положення 12 зайняте P, положення 14 зайняте T, положення 15 зайняте P, положення 18 зайняте P, положення 20 зайняте S, положення 22 зайняте S, положення 37 зайняте L, положення 43 зайняте S, положення 45 зайняте Q, положення 74 зайняте K, положення 77 зайняте R, положення 78 зайняте V, положення 79 зайняте E, положення 84 зайняте G. Необов'язково, зріла варіабельна область важкого ланцюгу має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 13, 17 або 21, за виключенням того, що положення 1 може бути зайняте E, та зріла варіабельна область легкого ланцюгу має послідовність SEQ ID NO: 53. Необов'язково, зріла варіабельна область важкого ланцюгу зв'язана з константною областю важкого ланцюгу, та зріла варіабельна область легкого ланцюгу зв'язана зі зрілою константною областю легкого ланцюгу. Необов'язково, константна область важкого ланцюгу являє собою IgG1 людини. Необов'язково, антитіло має посилене зв'язування з с-Kit людини у порівнянні з AMG191. Необов'язково, антитіло проявляє посилений антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP) у порівнянні з AMG191-IgG1. Необов'язково, антитіло проявляє посилену антитілозалежну клітино-опосередковану цитотоксичність (ADCC) у порівнянні з AMG191-IgG1.

Додатково, відповідно до даного винаходу запропонована фармацевтична композиція, що містить антитіло, описане вище, та фармацевтично прийнятний носій.

Додатково, відповідно до даного винаходу запропонований спосіб видалення ендогенних гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC), що включає введення антитіла, описаного вище, у ефективному режимі суб'єкту, який потребує їх видалення.

Додатково, відповідно до даного винаходу запропонований спосіб лікування раку, що експресує c-Kit, який включає введення антитіла у ефективному режимі суб'єкту, що має рак.

ВИЗНАЧЕННЯ

Моноклональні антитіла або інші біологічні об'єкти зазвичай забезпечують у виділеній формі. Це означає, що антитіло або інший біологічний об'єкт, як правило, не менше, ніж на 50 % мас./мас. очищені від супутніх білків та інших забруднюючих домішок, що утворюються у результаті його отримання або очищення, але не виключає можливості того, що моноклональне антитіло комбінують з надлишком фармацевтичні прийнятного носія(ів) або інших носіїв, призначених для полегшення його застосування. Іноді моноклональні антитіла щонайменше на 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 99 % мас./мас. очищені від супутніх білків та забруднюючих домішок, отриманих у результаті їх отримання або очищення. Часто виділене моноклональне антитіло або інший біологічний об'єкт являє собою переважний вид макромолекул, що залишається після їх очищення.

Специфічне зв'язування характеризується детектуємо більш високими абсолютними значеннями та відрізняється від неспецифічного зв'язування, яке проявляється у відношенні щонайменше однієї невідповідної мішені. Специфічне зв'язування може бути результатом утворення зв'язків між конкретними функціональними групами або певної просторової відповідності (наприклад, по типу замка та ключа), тоді як неспецифічне зв'язування зазвичай є результатом дії сил Ван-дер-Ваальса. Однак, специфічне зв'язування не обов'язково означає, що антитіло зв'язує тільки одну мішень. Антитіла відповідно до даного винаходу зазвичай специфічно зв'язуються з c-Kit з афінністю щонайменше 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} або 10^{12} M⁻¹.

Основною структурною одиницею антитіла є тетрамер субодиниць. Кожен тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, кожна з яких має один "легкий" (приблизно 25 кДа) та один "важкий" ланцюг (приблизно 50-70 кДа). Амінокінцева частина кожного ланцюгу включає варіабельну ділянку з приблизно 100-110 або більше амінокислот, у першу чергу відповідальних за розпізнавання антигену. Варіабельна область спочатку експресується зв'язаною з відщеплюваним сигнальним пептидом. Вказану область без сигнального пептиду іноді називають зрілою варіабельною областю. Таким чином, наприклад, зріла варіабельна область легкого ланцюгу означає варіабельну область легкого ланцюгу без сигнального пептиду легкого ланцюгу. Карбоксикінцева частина кожного ланцюгу визначає константну область, відповідальну у першу чергу за ефекторну функцію.

Легкі ланцюги поділяють на каппа- або лямбда-ланцюги. Важкі ланцюги поділяють на гамма-, мю-, альфа-, дельта- або епсилон-ланцюги, та зазначені ланцюги визначають ізотип антитіла: IgG, IgM, IgA, IgD та IgE, відповідно. У легкому та важкому ланцюгах варіабельні та константні області з'єднані областю "J" з приблизно 12 або більше амінокислот, при цьому важкий ланцюг також включає область "D" з приблизно 10 або більше амінокислот. Див. у цілому Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, розд. 7 (включений у повному обсязі за допомогою посилання для всіх цілей).

Варіабельна область легкого або важкого ланцюгу імуноглобуліну (яка також називається у цій заявці "варіабельний домен легкого ланцюгу" ("домен V_L") або "варіабельний домен важкого ланцюгу" ("домен V_H"), відповідно) складається з "каркасної" ділянки, що переривається трьома "ділянками, що визначають комплементарність" або "CDR". Каркасні ділянки слугують для вирівнювання CDR з метою специфічного зв'язування з епітопом антигену. CDR включають амінокислотні залишки антитіла, які у першу чергу відповідають за зв'язування антигену. Від амінокінця до карбоксильного кінця обидва домени V_L та V_H містять наступні каркасні ділянки (FR) та CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4. Ділянки, що визначають комплементарність 1, 2 та 3 домену V_L також вказані у цій заявці, відповідно, як CDR-L1, CDR-L2 та CDR-L3; ділянки, що визначають комплементарність 1, 2 та 3 домену V_H також вказані у цій заявці, відповідно, як CDR-H1, CDR-H2 та CDR-H3.

Розподіл амінокислот по кожному з доменів V_L та V_H відповідає будь-якому загальноприйнятому способу визначення CDR. Звичайні способи визначення включають визначення за Кеботом (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 і 1991)), визначення за Хотіа (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342: 878-883, 1989); комбінований спосіб за Хотіа-Кебот, у якому CDR-H1 являє собою комбінацію CDR за Хотіа та Кеботом; визначення AbM, що застосовується програмою моделювання антитіл Oxford Molecular; та спосіб визначення контактів за Мартіном та ін. (www.bioinfo.org.uk/abs). Згідно Кеботу запропоновані широко застосовувані правила

нумерації (нумерація за Кеботом), згідно з якими відповідним залишкам між різними важкими ланцюгами або між різними легкими ланцюгами привласнюються однакові номери. Якщо не вказано інше, нумерація положень у варіабельних областях антитіл являє собою нумерацію за Кеботом. Коли стверджується, що антитіло містить CDR відповідно до певного способу визначення CDR (наприклад, за Кеботом), такий спосіб визначення вказує на мінімальну кількість залишків CDR у антитілі (тобто CDR за Кеботом). Це не виключає того, що також присутні інші залишки, які підпадають під інший стандартний спосіб визначення CDR, але виходять за межі вказаного способу визначення. Наприклад, антитіло, що містить CDR, визначені за Кеботом, включає, серед інших варіантів, антитіло, що містять залишки CDR за Кеботом та не містять інших залишків CDR, або антитіло, у якому CDR H1 являє собою CDR H1 за комбінованим способом Хотіа-Кебота, та інші CDR містять залишки CDR за Кеботом та не містять додаткових залишків CDR за іншими способами визначень.

Термін "антитіло" включає інтактні антитіла та їх зв'язуючі фрагменти. Зазвичай фрагменти конкурують з інтактним антитілом, з якого вони були отримані, за специфічне зв'язування з мішенню, включаючи окремі важкі ланцюги, легкі ланцюги Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Dab, нанотіла та Fv. Фрагменти можуть бути отримані за способами рекомбінантних ДНК, або ферментативним або хімічним розділенням інтактних імуноглобулінів. Термін "антитіло" також включає біспецифічне антитіло та/або гуманізоване антитіло. Біспецифічне або біфункціональне антитіло являє собою штучно отримане гібридне антитіло, яке має дві різні пари важких/легких ланцюгів та два різні сайти зв'язування (див., наприклад, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelny et al. in., J. Immunol., 148: 1547-53 (1992)).

Приклади біспецифічних антитіл також можуть являти собою: (1) антитіло з двома варіабельними доменами (DVD-Ig), де кожен легкий та важкий ланцюг містить два варіабельні домени у тандемі, з'єднані через короткий пептидний зв'язок (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM), In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, який являє собою гібридну молекулу з двох однокланових діатіл, що утворюють чотиривалентне біспецифічне антитіло, яке має два сайти зв'язування для кожного з антигенів-мішеней; (3) флекситіло, яке являє собою комбінацію scFv з діатілом, та утворює полівалентну молекулу; (4) так звану молекулу "dock and lock", основану на "домени димеризації/докінгу" у протеїназі А, що при взаємодії з Fab може давати тривалентний біспецифічний зв'язуючий білок, що складається з двох ідентичних фрагментів Fab, зв'язаних з іншим Fab-фрагментом; або (5) так звану молекулу Scorpion, що містить, наприклад, два scFv, пов'язані з обома кінцями Fc-області людини. Приклади платформ, що застосовуються для отримання біспецифічних антитіл, включають BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab та Mab2 (F-star), Fc-модифікований IgG1 (Xencor) або DuoBody (на основі обміну Fab-ділянками, Genmab).

Термін "епітоп" відноситься до сайту антигену, з яким зв'язується антитіло. Епітоп може бути утворений послідовними амінокислотами або непослідовними амінокислотами, розміщеними поряд шляхом третинного фолдингу одного або декількох білків. Епітопи, утворені послідовними амінокислотами (також відомі як лінійні), зазвичай зберігаються при впливі денатуруючих розчинників, у той час як епітопи, утворені у результаті третинного фолдингу (також відомі як конформаційні), як правило, руйнуються при такій обробці. Епітоп зазвичай включає щонайменше 3, а частіше 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Способи визначення просторової конформації епітопів включають, наприклад, рентгенівську кристалографію та двовимірний ядерний магнітний резонанс. Див., наприклад, протоколи картування епітопів у Methods in Molecular Biology, том 66, Glenn E. Morris, вид. (1996).

Конкуренцію між антитілами визначають за допомогою аналізу, у якому тестоване антитіло інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном (див., наприклад, Junghans et al., Cancer Res. 50 1495, 1990). Тестоване антитіло конкурує з еталонним антитілом, якщо надлишок тестованого антитіла (наприклад, щонайменше, 2x, 5x, 10x, 20x або 100x) у аналізі конкурентного зв'язування пригнічує зв'язування еталонного антитіла щонайменше на 50 %. Деякі тестовані антитіла інгібують зв'язування еталонних антитіл щонайменше на 75 %, 90 % або 99 %. Антитіла, ідентифіковані за допомогою конкурентного аналізу (конкуруючі антитіла), включають антитіла, які зв'язуються з тим же епітопом, що і еталонне антитіло, та антитіла, які зв'язуються з сусіднім епітопом, досить близьким до епітопів, який зв'язує еталонне антитіло, для виникнення стеричних перешкод.

Термін "фармацевтично прийнятний" означає, що носій, розчинник, наповнювач або допоміжна речовина сумісні з іншими інгредієнтами складу та не роблять істотного шкідливого впливу на його реципієнта, та/або що такий носій, розчинник, наповнювач або допоміжна

речовина схвалені FDA для включення у фармацевтичну композицію для парентерального введення людині.

Термін "суб'єкт" включає людину та інших суб'єктів-ссавців, які будуть отримувати профілактичне або терапевтичне лікування.

З метою класифікації амінокислотних замін як консервативних або неконсервативних, амінокислоти згруповані наступним чином: група I (гідрофобні бічні ланцюги): met, ala, val, leu, ile; група II (нейтральні гідрофільні бічні ланцюги): cys, ser, thr; група III (кислотні бічні ланцюги): asp, glu; група IV (основні бічні ланцюги): asn, gln, his, lys, arg; група V (залишки, що впливають на орієнтацію ланцюгу): gly, pro; та група VI (ароматичні бічні ланцюги): trp, tyr, phe. Консервативні заміни включають заміни між амінокислотами одного і того ж класу. Неконсервативні заміни являються собою заміну представника одного з цих класів представником іншого.

Ідентичність послідовностей у відсотках визначають за послідовностями антитіл, максимально вирівняними за правилами нумерації Кебота. Після вирівнювання, якщо досліджувану область антитіла (наприклад, вся зріла варіабельна область важкого або легкого ланцюгу) порівнюють з тією ж областю еталонного антитіла, відсоток ідентичності послідовностей між досліджуваною та еталонною областями антитіла являє собою кількість положень, займаних однією і тією ж амінокислотою як у досліджуваній, так і у еталонній області антитіла, розділену на загальну кількість вирівняних положень двох областей без урахування пробілів, помножену на 100 для перетворення у відсоткову величину.

Композиції або способи, що "містять" або "включають" один або декілька перерахованих елементів, можуть включати у себе інші елементи, які не були зазначені конкретно. Наприклад, композиція, яка "містить" або "включає" антитіло, може містити антитіло окремо або у комбінації з іншими речовинами.

Позначення діапазону значень включає у себе всі цілі числа у межах діапазону або ті, що визначають його, та також всі піддіапазони, що визначаються цілими числами у межах діапазону.

Якщо інше не ясно з контексту, термін "приблизно" охоплює несуттєві варіації, наприклад, значення у межах стандартної межі похибки вимірювання (наприклад, SEM) встановленого значення.

Статистична значимість складає $p < 0,05$.

Гуманізоване антитіло являє собою генетично модифіковане антитіло, у якому CDR від "донорського" антитіла, яке не є антитілом людини, трансплантовані у послідовності "акцепторного" антитіла людини (див., наприклад, Queen, US 5,530,101 та 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; та Foote, US 6,881,557). Послідовності акцепторного антитіла можуть являти собою, наприклад, послідовність зрілого антитіла людини, комбінацію таких послідовностей, консенсусну послідовність з послідовностей антитіла людини або послідовність області зародкової лінії. Таким чином, гуманізоване антитіло являє собою антитіло, яке має CDR, отримані повністю або по суті з донорського антитіла, та каркасні послідовності варіабельної області та константні області, якщо вони присутні, повністю або по суті отримані з послідовностей антитіла людини. CDR у гуманізованому антитілі по суті походять з відповідних CDR антитіла, що не відноситься до людини, коли щонайменше 85 %, 90 %, 95 % або 100 % відповідних залишків (за визначенням Кебота) є ідентичними між відповідними CDR. Послідовності каркасної області варіабельної області ланцюгу антитіла або константної області ланцюгу антитіла по суті походять з послідовності каркасної області варіабельної області людини або константної області людини відповідно, коли щонайменше 85 %, 90 %, 95 % або 100 % відповідних залишків за визначенням Кебота ідентичні акцепторній послідовності людини.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

На Фіг. 1A та 1B показані зрілі варіабельні області важкого та легкого ланцюгів антитіла миші до c-Kit, які продукуються гібридомою, депонованою під номером HB-10716.

На Фіг. 2A та 2B показані зрілі варіабельні області важкого та легкого ланцюгів п'яти зрілих варіабельних областей гуманізованого важкого ланцюгу відповідно до даного винаходу та двох зрілих варіабельних областей гуманізованого легкого ланцюгу у порівнянні з акцепторними послідовностями миші та людини. Каркас варіабельної області гуманізованих послідовностей такий же, як і каркас AMG191, але CDR є різними.

На Фіг. 2C показане порівняння зв'язування AMG191 та його варіантів, що мають заміни CDR. Усі варіанти із заміною CDR продемонстрували посилене зв'язування.

На Фіг. 2D показане порівняння зв'язування AMG191 та його варіантів, що мають інші заміни CDR. Ці варіанти продемонстрували знижене зв'язування.

На Фіг. 3А та 3В представлені послідовності шести зрілих варіабельних областей гуманізованого важкого ланцюгу та трьох зрілих варіабельних областей гуманізованого легкого ланцюгу у порівнянні з AMG191, послідовностями миші та акцепторними послідовностями людини. У цих гуманізованих ланцюгах каркас варіабельної області відрізняється від каркаса у антитілі AMG191. Деякі з гуманізованих ланцюгів також відрізняються CDR.

На Фіг. 3С наведене порівняння зв'язування AMG191 з гуманізованим антитілом з тими ж CDR, але різними каркасами варіабельної області (що виникають у результаті застосування різних акцепторних послідовностей людини). Антитіло з новими каркасами має більш високу афінність.

На Фіг. 3D наведене порівняння зв'язування AMG191 з додатковими гуманізованими варіантами на основі нових каркасів, і також із замінами CDR відносно AMG191. Всі три варіанти антитіл мали більш високу афінність.

На Фіг. 4 наведене порівняння зв'язування AMG191 з трьома гуманізованими антитілами, що відрізняються від AMG191 наявністю заміни CDR та іншого каркасу варіабельної області легкого ланцюгу (каркас варіабельної області важкого ланцюгу залишається без змін). Всі три варіанти антитіл мали більш високу афінність.

На Фіг. 5 наведене порівняння фагоцитарної активності AMG191 та варіанту AMG191, що має константну область IgG1 дикого типу, з п'ятьма новими гуманізованими антитілами відповідно до даного винаходу. Нові варіанти, зокрема HF12 та NF112, показали збільшений фагоцитоз, особливо при тестуванні з більш низькими концентраціями.

На Фіг. 6 наведене порівняння антитілозалежної клітино-опосередкованої цитотоксичності (ADCC), спричиненої AMG191 з двома новими гуманізованими варіантами HF112 та HF12 та ізотипово подібним нерелевантним контролем. HF112 та HF12 викликали велику антитілозалежну клітино-опосередковану цитотоксичність (ADCC).

На Фіг. 7 наведене інгібування SCF-індукованої проліферації гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC) за допомогою HF12 та HF112 у порівнянні з AMG191, AMG191 з IgG1 людини та негативним контролем.

На Фіг. 8 наведене порівняння дегрануляції тучних клітин при застосуванні антитіл до c-Kit у порівнянні з позитивним контролем A23187 та IgE + анти-IgE.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1-4 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу та CDR-H1, H2 та H3 антитіла HB-10716.

SEQ ID NO: 5-8 являють собою зрілу варіабельну область легкого ланцюгу та CDR-L1, L2 та L3 антитіла HB-10716.

SEQ ID NO: 9-12 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу та CDR-H1, H2 та H3 гуманізованого важкого ланцюгу AH1.

SEQ ID NO: 13-16 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу та CDR-H1, H2 та H3 гуманізованого важкого ланцюгу AH2.

SEQ ID NO: 17-20 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу та CDR-H1, H2 та H3 гуманізованого важкого ланцюгу AH3.

SEQ ID NO: 21-24 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу та CDR-H1, H2 та H3 гуманізованого важкого ланцюгу AH4.

SEQ ID NO: 25-28 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу та CDR-H1, H2 та H3 гуманізованого важкого ланцюгу AH5.

SEQ ID NO: 29 являє собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу AMG191.

SEQ ID NO: 30 являє собою послідовність варіабельної області IGHV1-46*01.

SEQ ID NO: 31-34 являють собою зрілу варіабельну область легкого ланцюгу та CDR-L1, L2 та L3 гуманізованої варіабельної області легкого ланцюгу AL1.

SEQ ID NO: 35-38 являють собою зрілу варіабельну область легкого ланцюгу та CDR-L1, L2 та L3 гуманізованого легкого ланцюгу AL2.

SEQ ID NO: 39 являє собою зрілу варіабельну область легкого ланцюгу AMG191.

SEQ ID NO: 40-43 являють собою послідовність варіабельної області та три CDR-L1, L2 та L3 IGKV4-1*01.

SEQ ID NO: 44-50 являють собою зрілу варіабельну область важкого ланцюгу гуманізованих важких ланцюгів NH, NH1, NH2, NH3, NH4 та NH5 та IGHV3-23*01.

SEQ ID NO: 51-54 являють собою зрілі варіабельні області легкого ланцюгу гуманізованих легких ланцюгів NL, NL1, NL2 та IGKV2-28*01.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

I. Загальні положення

Згідно з даним винаходом запропоновані антитіла, які специфічно зв'язується з с-Kit людини (Swiss Prot P10721). Антитіла являють собою гуманізовані форми раніше описаного антитіла миші до с-Kit, що виділяється гібридомою, депонованою як HB-10716, яка має зрілі варіабельні області важкого та легкого ланцюгу SEQ ID NO: 1 та 5 відповідно. Це антитіло миші раніше було гуманізоване та позначене як AMG191 (див. US 7915391). CDR AMG191 за визначенням Кебота такі ж, як і у антитіла миші, з якого воно було отримано. AMG191 комерційно доступно від Creative Biolabs.

Антитіла відповідно до даного винаходу мають CDR по суті з антитіла миші, депонованого як HB-10716, вбудовані у акцепторні послідовності людини, необов'язково з замінами у певних положеннях, як додатково описано нижче.

Деякі антитіла містять зрілу варіабельну область важкого ланцюгу, що містить CDR H1, H2 та H3 з SEQ ID NO: 1, та зрілу варіабельну область легкого ланцюгу, що містить CDR L1, L2 та L3 з SEQ ID NO: 5, за умови, що присутня щонайменше одна заміна залишку CDR. CDR H1, H2 та H3 переважно містять SEQ ID NO: 2-4 відповідно, та CDR L1, L2 та L3 переважно містять SEQ ID NO: 6-8 (у відповідності з визначенням Кебота) за умови, що присутня щонайменше одна заміна CDR. Заміни у CDR переважно вибрані з N на A у положенні 60 важкого ланцюгу, K на Q у положенні 64 важкого ланцюгу та N на Q у положенні 30 легкого ланцюгу, положення пронумеровані відповідно до Кебота. Можуть бути присутні одна, дві або усі три заміни. Деякі антитіла містять заміни у положенні 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу. Деякі антитіла містять заміни у положенні 60 важкого ланцюгу, положенні 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу. Деякі антитіла містять заміни у положенні 60 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу. Деякі антитіла містять заміни у положенні 60 важкого ланцюгу та положенні 64 важкого ланцюгу. Деякі антитіла не містять замін CDR за Кеботом, за виключенням замін у положеннях 60 та 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу окремо або у перерахованих комбінаціях. Якщо присутні будь-які інші заміни CDR за Кеботом, переважно присутні не більше 1, 2, 3, 4 або 5 інших таких замін.

Деякі з антитіл у відповідності з даним винаходом відрізняються від AMG191 наявністю щонайменше однієї заміни залишку CDR відносно залишку, присутнього у AMG191. Кращими є заміни N на A у положенні 60 важкого ланцюгу, K на Q у положенні 64 важкого ланцюгу та N на Q у положенні 30 легкого ланцюгу, положення пронумеровані відповідно до Кебота. Можуть бути присутніми одна, дві або усі три заміни. Деякі антитіла містять заміни у положенні 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу. Деякі антитіла містять заміни у положенні 60 важкого ланцюгу, положенні 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу. Деякі антитіла містять заміни у положенні 60 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу. Деякі антитіла містять заміни у положенні 60 важкого ланцюгу та положенні 64 важкого ланцюгу. Деякі антитіла не містять замін відносно CDR AMG191 за нумерацією Кебота, за виключенням замін у положеннях 60 та 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу окремо або у перерахованих комбінаціях. Якщо присутні будь-які інші заміни CDR за Кеботом, переважно присутні не більше 1, 2, 3, 4 або 5 інших таких замін.

Заміни у CDR у положеннях 60 та 64 важкого ланцюгу та положенні 30 легкого ланцюгу окремо та у комбінації можуть забезпечувати збільшену афінність зв'язування з с-Kit людини. Заміни також являють собою заміщення залишку миші на залишок зародкової лінії людини у певному положенні, таким чином, при інших рівних умовах збільшуючи ступінь близькості до антитіла людини гуманізованого антитіла. У Таблиці 1, представленій нижче, наведено порівняння залишків, що займають положення 60 та 64 важкого ланцюгу та положення 30 легкого ланцюгу у антитілах миші, депонованих як HB-10716, AMG191 та трьох гуманізованих антитілах у відповідності з даним винаходом:

Таблиця 1

Залишок	HB-10716	AMG191	HF11	HF12	HF112
H60	N	N	A	N	A
H64	K	K	K	Q	Q
L30	N	N	Q	Q	Q

Додатково або альтернативно, деякі з гуманізованих антитіл у відповідності з даним винаходом відрізняються від антитіл AMG191 наявністю різних каркасних послідовностей варіабельної області. AMG191 було отримано шляхом трансплантації послідовностей CDR миші у каркас зародкових ліній IGHV1-46*01 та IGKV4-1*01 для важкого та легкого ланцюгів відповідно. У даному винаході запропонована трансплантація CDR у каркас варіабельної

області важкого ланцюгу IGН3-23*01 та каркас варіабельної області легкого ланцюгу IGKV2-28*01. Було виявлено, що ці каркаси надають вищу афінність зв'язування, ніж каркаси AMG191. Деякі кращі антитіла у відповідності з даним винаходом мають каркас варіабельної області важкого ланцюгу на основі IGНV1-46*01, що включає ті ж зворотні мутації, що і у варіабельній області важкого ланцюгу AMG191, та каркас варіабельної області легкого ланцюгу на основі IGKV2-28*01. Така комбінація каркасів поєднує переваги поліпшеної афінності у порівнянні з AMG191 та поліпшеної експресії у порівнянні з антитілами з комбінацією каркаса варіабельної області важкого ланцюгу IGН3-23*01 та каркаса варіабельної області легкого ланцюгу IGKV2-28*01.

Таким чином, деякі кращі антитіла у відповідності з даним винаходом мають зрілу варіабельну область важкого ланцюгу, що містить послідовність будь-якого з ланцюгів, позначених SEQ ID NO: 13, 17 або 21, що відповідають АН2, АН3 та АН4, та зрілу варіабельну область легкого ланцюгу, що має послідовність SEQ ID NO: 53, яка відповідає NL2. Послідовності варіабельної області важкого ланцюгу відрізняються одна від іншої наявністю заміни CDR тільки у положенні 60 важкого ланцюгу, тільки у положенні 64 важкого ланцюгу або положеннях 60 та 64 важкого ланцюгу, усі за нумерацією Кебота. За виключенням заміни CDR, послідовності варіабельної області аналогічні зрілим варіабельним областям важкого ланцюгу AMG191. Послідовності важкого ланцюгу SEQ ID NO: 13, 17 та 21 включають заміни каркасної області варіабельної області (тобто залишок акцептору людини на залишок донора миші) у положеннях 71 (R на A), 73 (T на K) та 78 (V на A) за Кеботом. Присутня додаткова заміна M на I у положенні 69.

Зріла варіабельна область легкого ланцюгу SEQ ID NO: 53 має заміну CDR у положенні 30. Зріла варіабельна область легкого ланцюгу SEQ ID NO: 53 також відрізняється від зрілої варіабельної області легкого ланцюгу AMG191 у декількох положеннях каркасу варіабельної області через різний вибір акцепторів:

- Положення 9 зайняте L
- Положення 12 зайняте P
- Положення 14 зайняте T
- Положення 15 зайняте P
- Положення 18 зайняте P
- Положення 20 зайняте S
- Положення 22 зайняте S
- Положення 37 зайняте L
- Положення 43 зайняте S
- Положення 45 зайняте Q
- Положення 74 зайняте K
- Положення 77 зайняте R
- Положення 78 зайняте V
- Положення 79 зайняте E
- Положення 84 зайняте G.

Зріла варіабельна область легкого ланцюгу SEQ ID NO: 53 не містить ніяких зворотних мутацій каркасної області варіабельної області зародкової лінії людини на залишки миші.

У відповідності з даним винаходом також запропоновані антитіла, які мають варіабельні області важких та легких ланцюгів, що являють собою варіанти наведених як приклади послідовностей. Наприклад, даний винахід включає антитіла, які мають зрілу варіабельну область важкого ланцюгу, що має щонайменше 85 %, 90 %, 95 %, 98 або 99 % ідентичності з будь-якою з SEQ ID NO: 13, 17 або 21, та зрілу варіабельну область легкого ланцюгу, що має щонайменше 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичності з SEQ ID NO: 53. Будь-яке відхилення від зазначених послідовностей в основному знаходиться за межами CDR, згідно з визначенням за Кебот. Варіації також в основному відсутні у положеннях каркасу варіабельної області зазначених послідовностей, схильних до зворотних мутацій (положення 71, 73 та 78 за нумерацією Кебота). У деяких антитілах усі заміни знаходяться у положеннях, відмінних від положення 69 важкого ланцюгу за нумерацією Кебота. У деяких антитілах варіації знаходяться у положеннях каркасу варіабельної області, відмінних від тих, по яким SEQ ID NO: 53 відрізняється від зрілої варіабельної області легкого ланцюгу AMG191. У інших антитілах варіації знаходяться у положеннях каркасної області варіабельної області, у яких SEQ ID NO: 53 відрізняється від зрілої варіабельної області легкого ланцюгу AMG191, необов'язково у комбінації з іншими положеннями каркасної області варіабельної області. У деяких антитілах зберігається щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 залишків каркасної області варіабельної області, по яким SEQ ID NO: 53 відрізняється від каркасу зрілої

варіабельної області легкого ланцюгу AMG191. У деяких антитілах варіації здійснюють шляхом консервативної заміни (замін). У деяких антитілах Q у положенні 1 важкого ланцюгу може бути замінений E зниженням потенціалу для перетворення піроглутамату (Liu, et al., 2011, J. Biol. Chem., 286: 11211–11217). Перетворення глутамінової кислоти (E) у піроглутамат (pE) відбувається повільніше, ніж з глутаміну (Q). Через втрату первинної аміногрупи при перетворенні глутаміну у pE антитіла стають більш кислими. Неповне перетворення викликає гетерогенність антитіл, яку можна спостерігати у вигляді множинних піків при застосуванні аналітичних методів, оснований на вимірюванні заряду. Відмінності у гетерогенності можуть вказувати на недостатній контроль процесу.

Антитіла можна досліджувати на афінність зв'язування з c-Kit людини, антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), антитілозалежну клітино-опосередковану цитотоксичність (ADCC) та інгібування SCF-індукованої проліферації гематопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC) із застосуванням методів аналізу, представлених у прикладах. Антитіла також можна піддавати скринінгу на моделях тварин, описаних у WO2016033201. Переважні антитіла у відповідності з даним винаходом мають посилену афінність зв'язування з c-Kit людини, посилений антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP) та/або посилену антитілозалежну клітино-опосередковану цитотоксичність (ADCC) та/або посилене інгібування SCF-індукованої проліферації гематопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC), які виміряні із застосуванням відповідних методів аналізу, у порівнянні з AMG191 або його формою IgG1 людини. Переважні антитіла також інгібують зв'язування c-Kit людини з його лігандом - фактором стовбурових клітин людини.

У відповідності з даним винаходом також запропоновані засоби для посилення зв'язування з c-Kit людини та/або антитілозалежної клітино-опосередкованої цитотоксичності (ADCC), та/або антитілозалежного клітинного фагоцитозу (ADCP) відносно клітин, які експресують c-Kit людини, у порівнянні з AMG191 або його формою IgG1 людини, при цьому посилення показника вимірюють згідно з цими прикладами. Прикладами є антитіла, які мають зрілу варіабельну область важкого ланцюгу будь-якої з SEQ ID NO: 13, 17 або 21 та зрілу варіабельну область легкого ланцюгу SEQ ID NO: 53 з константною областю важкого ланцюгу IgG1 людини та константною областю легкого каппа-ланцюгу людини. Заміни у CDR відносно AMG191 з N на A у положенні 60 важкого ланцюгу, K на Q у положенні 64 важкого ланцюгу та/або N на Q у положенні 30 легкого ланцюгу сприяють посиленню властивостей засобів, які приводяться у якості прикладу. Такі засоби можуть бути включені у фармацевтичну композицію з фармацевтично активним носієм.

Антитіла можуть піддаватися або не піддаватися післятрансляційній модифікації, такий як глікозилювання, в залежності від умов експресії або вибору константної області поряд з іншими факторами.

II. Вибір константної області

Описані вище варіабельні області важкого та легкого ланцюгів можуть бути пов'язані щонайменше з частиною константної області людини. Вибір константної області частково залежить від того, чи бажані антитілозалежна клітино-опосередкована цитотоксичність, антитілозалежний клітинний фагоцитоз та/або комплемент-залежна цитотоксичність. Наприклад, ізотипи IgG1 та IgG3 людини мають комплемент-залежну цитотоксичність, а ізотипи IgG2 та IgG4 людини не мають. IgG1 та IgG3 людини також індукують більш сильні клітино-опосередковані ефекторні функції, ніж IgG2 та IgG4 людини. IgG1 людини для антитіл у відповідності з даним винаходом є кращим. Константні області легкого ланцюгу можуть бути лямбда або каппа-ланцюгами.

Одна або декілька амінокислот на аміно- або карбокси-кінці легкого та/або важкого ланцюгу, наприклад, C-кінцевий лізин важкого ланцюгу, можуть бути відсутніми або бути дериватизованими у частині або у всіх молекулах. У константних областях можуть бути зроблені заміни для зменшення або збільшення ефекторних функцій, наприклад, комплемент-опосередкованої цитотоксичності, антитілозалежної клітино-опосередкованої цитотоксичності (ADCC), для видалення сайту глікозилювання (див., наприклад, Winter et al., Патент США № 5,624,821; Tso et al., патент США № 5,834,597 and Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), або подовження періоду напіввиведення у людей (див., наприклад, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Приклади замін включають Gln у положенні 250 та/або Leu у положенні 428 (у цьому абзаці для константної області застосовують нумерацію EU) для збільшення періоду напіввиведення антитіла. M252Y/S254T/T256E також збільшують період напіввиведення, як і N434A або S, T250Q або V3089P. Заміна у будь-якому з положень 234, 235, 236 та/або 237 або у всіх цих положеннях знижує афінність до рецепторів Fcγ, особливо до рецептору FcγRI (див., наприклад, US 6,624,821). Будь-яка з наступних замін збільшує

ефекторну функцію: F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S298A/E333A/K334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, та S298A/E333A/K334A.

Константні області людини демонструють наявність аллотипових варіацій та ізоаллотипових варіацій у різних індивідуумів, тобто константні області можуть відрізнятися у різних індивідуумів у одному або декількох поліморфних положеннях. Ізоаллотипи відрізняються від аллотипів тим, що сироватки, що розпізнають ізоаллотип, зв'язуються з неполіморфною областю одного або декількох інших ізотипів.

III. Експресія рекомбінантних антитіл

Гуманізовані антитіла зазвичай отримують за допомогою рекомбінантної експресії. Рекомбінантні полінуклеотидні конструкції зазвичай включають послідовність контролю експресії, функціонально зв'язану з послідовностями, що кодують ланцюги антитіл, включаючи природно зв'язані або гетерологічні елементи контролю експресії, такі як промотор. Послідовності контролю експресії можуть бути промоторними системами у векторах, здатних трансформувати або трансфікувати еукаріотичні або прокаріотичні клітини-хазяї. Після включення вектору у відповідного хазяїна останньому забезпечують умови, що дозволяють досягти високого рівня експресії нуклеотидних послідовностей, а також для збору та очищення антитіл, які перехресно реагують.

Ці вектори експресії зазвичай реплікуються у організмах-хазяях або у вигляді епісом, або у якості невід'ємної частини хромосомної ДНК. Зазвичай вони містять маркери селекції, наприклад, стійкості до ампіциліну або гігromіцину, щоб можна було виявити клітини, трансформовані бажаними послідовностями ДНК.

E. coli є прокаріотичним хазяїном, придатним для експресії антитіл, особливо фрагментів антитіл. Мікроорганізми, наприклад, дріжджі, також можна застосовувати для експресії. *Saccharomyces* являють собою клітини-хазяї дріжджів з підходящими векторами, що мають послідовності контролю експресії, точку початку реплікації, послідовності термінації та т.п., якщо необхідно. Типові промотори включають 3-фосфогліцераткіназу та інші гліколітичні ферменти. Індуковані промотори дріжджів включають, серед іншого, промотори алкогольдегідрогенази, ізоцитохрому C та ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози та галактози.

Клітини ссавців можна застосовувати для експресії нуклеотидних сегментів, що кодують імуноглобуліни або їх фрагменти. Див. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Був розроблений ряд відповідних ліній клітин-хазяїв, здатних секретувати інтактні гетерологічні білки, вони включають лінії клітин CHO, різні лінії клітин COS, клітини HeLa, клітини HEK293, L-клітини та мієломи, що не продукують антитіла, включаючи Sp2/0 та NS0. Клітини можуть бути отримані не від людини. Вектори експресії для цих клітин можуть включати у себе послідовності контролю експресії, такі як точка початку реплікації, промотор, енхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) та необхідні сайти процесингу інформації, такі як сайти зв'язування рибосом, сайти сплайсингу РНК, сайти поліаденілювання та послідовності термінаторів транскрипції. Послідовності контролю експресії можуть включати промотори, що походять з ендегенних генів, цитомегаловірусу, SV40, аденовірусу, вірусу папіломи великої рогатої худоби тощо. Див. Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

У якості альтернативи, кодуючі послідовності антитіл можуть бути включені у трансгени для введення у геном трансгенної тварини та подальшої експресії у його молоці (див., наприклад, патент США № 5,741,957; патент США № 5,304,489 та патент США № 5,849,992). Підходящі трансгени включають кодуючі послідовності для легких та/або важких ланцюгів, функціонально зв'язаних з промотором та енхансером з гену, специфічного для молочної залози, такого як ген, який кодує казеїн або бета-лактоглобулін.

Вектори, що містять сегменти ДНК, які представляють інтерес, можуть бути перенесені у клітку-хазяїна за способами, які залежать від типу клітини-хазяїна. Наприклад, трансфекцію хлоридом кальцію зазвичай застосовують для прокаріотичних клітин, тоді як обробку фосфатом кальцію, електропорацію, ліпофекцію, біолистику або трансфекцію на основі вірусів можна застосовувати для інших клітин-хазяїв. Інші методи, що застосовуються для трансформації клітин ссавців, включають застосування полібрену, злиття протопластів, ліпосом, електропорації та мікроін'єкції. Для отримання трансгенних тварин трансгени можуть бути введені за допомогою мікроін'єкцій у запліднені ооцити або включені у геном ембріональних стовбурових клітин, та ядра таких клітин можуть бути перенесені у енуклеїровані ооцити.

Після введення вектору(ів), що кодує важкий та легкий ланцюги антитіла, у культуру клітин, пули клітин можна піддати скринінгу на продуктивність росту та якість продукту у безсироватковому середовищі. Пули високопродукуючих клітин потім можна піддати процедурі клонування окремих клітин на основі флуоресцентного сортування клітин для створення

моноклональних ліній. Можна застосовувати клітини з питомою продуктивністю вище 50 пг або 100 пг/клітину на день, що відповідає титрам продукту вище 7,5 г/л культури. Зразки антитіл, які продукуються клонами окремих клітин, також можна тестувати на мутність, фільтраційні властивості, проводити аналіз із застосуванням ПААГ, ІЕФ, УФ-сканування, високоефективної ексклюзійної хроматографії, вуглеводень-олігосахаридного картування, мас-спектрометрії та аналізу зв'язування, такого як ІФА або Biacore. Обраний клон потім може бути поміщений у декілька флаконів та збережений у замороженому вигляді для подальшого застосування.

Після експресії антитіла можуть бути очищені відповідно до стандартних процедур, відомих у даній галузі, включаючи захоплення білком А, очищення за допомогою ВЕРХ, колонкову хроматографію, гель-електрофорез та т.п. (див. Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Можна застосовувати методологію комерційного виробництва антитіл, включаючи оптимізацію кодонів, вибір промоторів, вибір елементів транскрипції, вибір термінаторів, безсироваткове клонування окремих клітин, створення банку клітин, застосування селектуємих маркерів для ампліфікації кількості копій, термінатор CHO або поліпшення титрів білку (див., наприклад, US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; та US 5,888,809).

IV. Нуклеїнові кислоти

У відповідності з даним винаходом також були запропоновані нуклеїнові кислоти, що кодують будь-який з важких та легких ланцюгів, описаних вище. Необов'язково, такі нуклеїнові кислоти додатково кодують сигнальний пептид та можуть експресуватися з сигнальним пептидом, пов'язаним з константною областю. Кодуючі послідовності нуклеїнових кислот можуть бути функціонально зв'язані з регуляторними послідовностями, такими як промотор, енхансер, сайт зв'язування рибосоми, сигнал термінації транскрипції та т.п для забезпечення експресії кодуючих послідовностей. Нуклеїнові кислоти, що кодують важкі та легкі ланцюги, можуть перебувати у виділеній формі або бути клоновані у один або декілька векторів. Нуклеїнові кислоти можна синтезувати, наприклад, твердофазним синтезом або ПЛР олігонуклеотидів, що перекриваються. Нуклеїнові кислоти, які кодують важкий та легкий ланцюги, можуть бути з'єднані у вигляді однієї послідовної нуклеїнової кислоти, наприклад, у межах експресійного вектору, або можуть знаходитися окремо, наприклад, кожна може бути клонована у свій власний вектор експресії.

V. Кон'юговані антитіла

Антитіла у відповідності з даним винаходом можуть бути кон'юговані з цитотоксичними або цитостатичними групами для забезпечення додаткового механізму цитотоксичності.

Деякі такі антитіла можна модифікувати, щоб вони діяли як імунотоксини, див., наприклад, патент США № 5,194,594. Наприклад, рицин, клітинний токсин, що отримують з рослин, може бути пов'язаний з антитілами із застосуванням біфункціональних реагентів S-ацетилмеркаптобурштинового ангідриду для антитіла та сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонату для рицину, див. Pietersz et al., Cancer Res. 48 (16): 4469-4476 (1998). Це зв'язування призводить до втрати зв'язуючої активності В-ланцюга рицину, при цьому токсичний потенціал А-ланцюга та активність антитіла не порушуються. Точно так же сапорін, інгібітор збірки рибосом, можна пов'язати з антитілами через дисульфідний зв'язок між хімічно введеними сульфгідрильними групами. Див. Polito et al., Leukemia 18: 1215-1222 (2004).

Деякі такі антитіла можна зв'язати з радіоізотопами. Приклади радіоіотопів включають, наприклад, ітрій⁹⁰ (⁹⁰Y), індій ¹¹¹ (¹¹¹In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, радіоактивне срібло-¹¹¹, радіоактивне срібло-¹⁹⁹ та вісмут²¹³. Зв'язування радіоіотопів з антитілами можна здійснювати за допомогою звичайних біфункціональних хелатних сполук. Для зв'язку радіоактивного срібла-¹¹¹ та радіоактивного срібла-¹⁹⁹ можна застосовувати лінкери на основі сірки. Див. Hazra et al., Cell Biophys. 24-25: 1-7 (1994). Зв'язування радіоіотопів срібла може включати відновлення імуноглобуліну аскорбіновою кислотою. Для радіоіотопів ¹¹¹In та ⁹⁰Y, можна застосовувати ібритумомаб тіуксетану, який буде реагувати з ними з утворенням ¹¹¹In-ібритумомаб тіуксетану та ⁹⁰Y-ібритумомаб тіуксетану відповідно. Див. Witzig, Cancer Chemother. Pharmacol., 48, додаток 1: S91-S95 (2001).

Деякі такі антитіла можна кон'югувати з токсичними хіміотерапевтичними лікарськими засобами, такими як майтанзин, гелданаміцин, інгібіторами тубуліну, такими як речовини, що зв'язують тубулін (наприклад, ауристатини), або речовини, що зв'язуються з малими борозенками, такі як каліхеаміцин.

VI. Терапевтичні застосування

Антитіла, у відповідності з даним винаходом або фармацевтичні композиції, що містять такі антитіла, можна застосовувати для лікування різних станів. Наприклад, такі антитіла можна застосовувати для видалення ендogenous гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC) у суб'єкта, який цього потребує. Видалення ендogenous HSPC є початковим етапом замісної терапії стовбуровими клітинами. Замісна терапія стовбуровими клітинами зазвичай включає зменшення кількості або усунення ендogenous HSPC, які у деяких відношеннях є дефектними, та заміну їх на заміщуючі HSPC. Замищуючі HSPC можуть бути аутологічними, алогенними або ксеногенними. Ендogenous HSPC можуть мати дефекти через спадкову мутацію, що порушує їх функцію або експресію (наприклад, серповидноклітинну анемію або таласемію), у результаті гематологічного раку або пошкодження у результаті хіміотерапії, яка застосовується при лікуванні раку. Ендogenous HSPC також можуть бути замінені разом з трансплантатом органу, оскільки ендogenous HSPC можуть призводити до імунної атаки трансплантату.

Антитіла до c-Kit також можна застосовувати при лікуванні видів раку, що експресують c-Kit. Такі види раку включають гематологічні ракові захворювання, такі як гострий мієлоїдний лейкоз, та солідні пухлини, такі як мастоцитоз, стромальний рак яєчка, стромальний рак шлунково-кишкового тракту, меланома, рак грудей та легенів. За допомогою імуногістохімічного аналізу визначено, що експресія c-Kit як правило знаходиться на більш високому рівні, ніж у нормальних контрольних клітин, характерних для таких тканин.

Антитіла вводять у ефективному режимі, що включає дозування, шлях та частоту введення, які сприяють досягненню поставленої мети, тобто зменшення кількості ендogenous гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC) або ракових клітин, що експресують c-Kit. У деяких випадках ефективність може спостерігатися у окремого пацієнта відносно історичного контролю або його минулого досвіду. У інших випадках ефективність може бути продемонстрована у доклінічних або клінічних випробуваннях на популяції пацієнтів, які пройшли лікування у порівнянні з контрольною популяцією пацієнтів, які не пройшли лікування.

Приклади доз складають від щонайменше 0,05 мг/кг до 10 мг/кг, наприклад, фіксована доза може становити приблизно 0,05-10 мг/кг, 0,1-5 мг/кг, або 5-750 мг. Доза залежить, крім інших факторів, від стану пацієнта, відповіді на попереднє лікування, якщо таке відбувалося, від того, чи є лікування профілактичним чи терапевтичним, та також від того, чи є порушення гострим або хронічним.

Введення може бути парентеральним, внутрішньовенним, пероральним, підшкірним, внутрішньоартеріальним, внутрішньочерепним, інтратекальним, внутрішньоочеревинним, місцевим, інтраназальним або внутрішньом'язовим. Деякі антитіла можна вводити у системний кровотік шляхом внутрішньовенного або підшкірного введення. Внутрішньовенне введення може бути, наприклад, у вигляді інфузії протягом періоду у 30-90 хвилин.

Антитіло можна вводити одноразово або багаторазово. Якщо антитіло вводять багаторазово, процедуру можна повторювати щоденно, щотижнево, раз на два тижні, щомісячно або раз у квартал.

VI. Фармацевтичні композиції та способи застосування

Фармацевтичні композиції для парентерального введення, що містять антитіло, у відповідності з даним винаходом, можуть бути стерильними та по суті ізотонічними (250-350 мОсм/кг води) та вироблятися в умовах GMP. Фармацевтичні композиції можуть бути надані у формі одиничної дози (тобто дози для одноразового введення). Фармацевтичні композиції можуть бути складені із застосуванням одного або декількох фармацевтично прийнятних носіїв, розчинників, наповнювачів або допоміжних речовин. Склад залежить від обраного шляху введення. Антитіла для ін'єкцій можуть бути приготовані у вигляді водних розчинів, наприклад, у фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенка, розчин Рінгера, фізіологічний розчин або ацетатний буфер (для зменшення дискомфорту у місці ін'єкції). Розчин може містити допоміжні речовини, такі як суспендувачі, стабілізатори та/або диспергуючі агенти. У якості альтернативи, антитіла також можуть бути у ліофілізованій формі, яку перед застосуванням змішують з відповідним носієм, наприклад, стерильною апірогенною водою.

Можна застосовувати режими введення у комбінації з іншими агентами, ефективним при лікуванні відповідного стану (наприклад, хіміотерапевтичними агентами або біологічними препаратами для лікування раку).

Після лікування стан суб'єкта, що проходить лікування, можна відстежувати на предмет змін, що піддаються лікуванню (наприклад, зменшення кількості ендogenous гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC)) або зменшення кількості ракових клітин, що експресують c-Kit.

VII. Інші застосування

Антитіла у відповідності з даним винаходом, також можна застосовувати для виявлення с-Kit за допомогою імуноаналізу, наприклад, ІФА, вестерн-блотингу або імуноістохімії. Таке тестування може бути корисне для визначення того, чи експресує рак с-Kit, що робить

5 можливим лікування за допомогою перерахованих способів. Антитіла також можна застосовувати для збагачення гематопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC), що експресують с-Kit, при афінній хроматографії.

Приклади

1. Матеріали і методи

10 Клонування та секвенування антитіла V. Лінія клітин гібридами до с-kit людини була придбана у ATCC (HB-10716). Варіабельні області важкого (V_H) та легкого ланцюгу (V_L) клонували та секвенували за допомогою Genscript.

Гуманізація антитіл та заміни CDR. Гуманізацію HB-10716 проводили шляхом введення залишків CDR з антитіл миші у каркасні області зародкової лінії людини (FR). Якщо коротко, V_H миші гуманізували шляхом раціонального введення відповідних залишків CDR та декількох залишків каркасу (FR) у IGHV1-46*01 або IGHV3-23*01 людини. V_L миші гуманізували шляхом раціонального введення відповідних залишків CDR та декількох залишків каркасу (FR) у IGKV4-1*01 або IGKV2-28*01 людини. Відмінності між залишками FR миші та людини моделювали індивідуально, щоб дослідити їх можливий вплив на конформацію CDR. Для подальшої

15 гуманізації антитіла та збільшення афінності зв'язування гуманізованих антитіл залишки у CDR були відібрані та перетворені на відповідні залишки CDR послідовностей зародкової лінії людини.

Трансфекція клітин. Клітини 293F культивували у середовищі експресії FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Транзйентну трансфекцію виконували шляхом котрансфекції векторів експресії, що кодують важкий та легкий ланцюги антитіла, із застосуванням реагенту для трансфекції 293fectin (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Через чотири-п'ять днів супернатанти трансфікованих клітин збирали та аналізували секрецію антитіл за допомогою ІФА. Якщо

25 коротко, 96-лункові планшети (Nunc, Роскілле, Данія) покривали розчином, що містить 1 мкг/мл антитіла кози до Fc гамма людини у натрій-фосфатному буфері (PBS) протягом 16 годин при 4 °C. Після блокування протягом 1 години за допомогою 0,4 % розчину бичачого сироваткового альбуміну у натрій-фосфатному буфері при кімнатній температурі виділені супернатанти додавали у послідовні розведення 1/3 та інкубували протягом години при кімнатній температурі. Потім планшети тричі промивали та інкубували з кон'югованими з пероксидазою хрону антитілами кози до каппа-ланцюгу людини протягом години при кімнатній температурі. Після

30 промивання планшети проявляли набором TMB. Реакцію зупиняли 2M H_2SO_4 та вимірювали оптичну густина при 450 нм.

Очищення та характеристика антитіл. Супернатант культури наносили на колонки з протеїном A-сефарозою (GE Healthcare). Колонку промивали натрій-фосфатним буфером, та потім білок елюювали елююючим буфером (0,1 M натрійцитратний буфер, pH 3,0). Зібрані фракції нейтралізували 1 M тріс, pH 9,0. Нарешті, очищені зразки піддавали діалізу, щоб очистити від натрій-фосфатного буферу. Чистоту елюйованої фракції антитіл аналізували електрофорезом у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) на 10 % гелях у відновлюючих або невідновлюючих умовах. Смуги візуалізували фарбуванням Кумасі діамантовим синім.

45 Вимірювання антигенз'язуючої активності за допомогою ІФА. 96-лункові планшети (Nunc, Роскілле, Данія) покривали розчином, що містить 1 мкг/мл гібридного білку с-Kit-Fc людини у натрій-фосфатному буфері (PBS) впродовж 16 годин при 4 °C. Після блокування впродовж години за допомогою 0,4 % розчину бичачого сироваткового альбуміну у натрій-фосфатному буфері при кімнатній температурі додавали антитіла до с-Kit у послідовних розведеннях 1/3 та інкубували впродовж 1 години при кімнатній температурі. Потім планшети тричі промивали та інкубували з кон'югованими з пероксидазою хрону антитілами кози до каппа-ланцюгу людини впродовж години при кімнатній температурі. Після промивання планшети проявляли набором TMB. Реакцію зупиняли 2M H_2SO_4 та вимірювали оптичну густина при 450 нм.

55 Аналіз фагоцитозу in vitro. Ракові клітини MHC-1 промивали та підраховували, потім у кожному лунку додавали 25 мкл, що містять 1×10^5 клітин у безсироватковому середовищі IMDM. Препарат антитіла (у 25 мкл) з кінцевою концентрацією 10 мкг/мл додавали у лунки та інкубували при 37 °C впродовж 30 хвилин. Через 30 хвилин підраховували макрофаги, які раніше були зібрані за допомогою TrypLE, та висівали з 5×10^4 клітин у 50 мкл безсироваткового середовища IMDM. Планшети інкубували при 37 °C впродовж 2 годин (ефектор:мішень = 1:2).

Відсоток фагоцитозу розраховували за допомогою проточної цитометрії з пошуком макрофагів GFP+.

Аналіз антитілозалежної клітино-опосередкованої цитотоксичності (ADCC). Природні клітини-кілери виділяли з PBMC людини із застосуванням набору EasySep для позитивної селекції по CD56 людини від Stemcell Technologies (Банкувер, Британська Колумбія, Канада, каталожний № 17855). Виділені клітини культивували протягом ночі у середовищі RPMI 1640 з добавкою 10 % ембріональної бичачої сироватки та 100 од./мл рекомбінантного ІЛ-2 людини (PeproTech, Rocky Hill, NJ, каталожний № 200-02). Клітини GIST-T1 мітили 5 мкМ кальцеїну-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, каталожний № C3100MP) протягом 10 хвилин при 37 °С, потім двічі промивали. Антитіло до с-Kit або антитіло ізотипового контролю серійно розводили у 10 разів від 0,0003 до 30 мкг/мл та переносили у аналітичний планшет з V-подібним дном. Мічені GIST-T1 клітини додавали у аналітичний планшет, та потім активували природні клітини-кілери до кінцевого співвідношення мішені до ефектору 1: 5. Після 2 години інкубації супернатант збирали та переносили у чистий планшет з плоским дном. Планшет аналізували на флуоресцентному рідері SpectraMax M3 зі збудженням при 490 нм, емісією при 520 нм та відсіченням при 515 нм з програмним забезпеченням SoftMax Pro 7.0. Відсоток специфічного лізису розраховували на основі відносних одиниць флуоресценції (RFU) за наступною формулою: $[(\text{тестова RFU} - \text{середня фоновая RFU}) / (\text{середня максимальна RFU} - \text{середня фоновая RFU})] \cdot 100$, де фон - це ефекторні клітини + клітини-мішені без антитіл, та максимальний лізис - це ефекторні клітини + клітини-мішені з буфером для лізису. Дані були проаналізовані за допомогою GraphPad Prism 7.05. Був побудований графік залежності відсоткового специфічного антитілозалежного лізису від концентрації антитіл.

Аналіз проліферації гематопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC). Заморожені CD34+ стовбурові/прогеніторні клітини пуповинної крові (ALLCELLS Каталожний # CB005F) ресуспендували в утримуючому середовищі HSC, StemSpan SFEMII (STEMCELL technologies Каталожний # 09605) з додаванням 20 нг/мл рекомбінантного SCF людини (STEMCELL technologies Каталожний # 78062), 20 нг/мл рекомбінантного ліганду Flt3 людини (PeproTech каталожний № 300-19) та 20 нг/мл рекомбінантного тромбопоетину людини (PeproTech каталожний № 300-18). Приблизно 3000 стовбурових клітин висівали на лунку на трьох 96-лункових планшетах з наднизьким кластером COSTAR (Corning Каталожний # 7007). Планшети центрифугували при 1250 об./хвил. при 4 °С впродовж 5 хвилин та клітини ресуспендували у 200 мкл утримуючого середовища HSC з антитілами до с-Kit або без них у трьох повторях. Були досліджені чотири антитіла до с-Kit: AMG191, AMG191-G1, HF12 та HF112 при концентраціях 0,1, 1, 10 та 50 мкг/мл. Клітинну проліферацію тестували із застосуванням реактиву Countbright absolute Counting beads (Invitrogen™ Каталожний № C36950) на 1, 3, 5 та 11 день. AMG191 має заміну N на E у положенні 297, що забезпечує неглікозилзовану ефекторну функцію, що знижується. AMG191-G1 або -IgG1 має константну область IgG1 людини дикого типу.

2. Результати

(a) Клонування та секвенування варіабельної області гібридами до с-Kit

Лінія клітин гібридами до с-Kit людини була придбана у ATCC (HB-10716). Специфічність гібридомного клону HB-10716 досліджували за допомогою ІФА зв'язування з с-Kit людини. Варіабельні області важкого та легкого ланцюгів HB-10716 клонували з гібридами із застосуванням універсальних праймерів для антитіл. Множинні клони кожного продукту V-гену секвенували для відстежування помилок, що з'явилися при ПЛР. Були визначені нуклеотидні послідовності VH та VL HB-10716, визначені амінокислотні послідовності показані на Фіг. 1A та B відповідно.

(b) Гуманізація антитіла та заміни CDR

Для вибору каркасних областей антитіл людини (FR), які будуть застосовані у якості матриць для трансплантації CDR, області VL та VH HB-10716 миші порівнювали з аналогічними послідовностями зародкової лінії людини. Було виявлено, що FR області VL HB-10716 миші мають більш високу гомологію з підгрупою IGKV4-1, та FR області VH проявляють більш високу гомологію з підгрупою IGHV1-46 людини. Тому FR з IGKV4-1 та IGHV1-46 людини були застосовані у якості основи для конструювання гуманізованого HB-10716. Положення амінокислот на ділянках FR, які відрізняються між послідовностями HB-10716 та IGKV4-1/IGHV1-46 та які можуть впливати на зв'язування антигену, були ідентифіковані шляхом молекулярного моделювання. Ідентичні залишки у FR були збережені, та неідентичні залишки або залишені, або замінені на основі програми молекулярного моделювання. Крім того, за допомогою молекулярного моделювання були ідентифіковані залишки у CDR-ділянках VH та VL. Заміни CDR виконували за допомогою сайт-направленого мутагенезу.

- У Таблиці 2 приведені нові отримані гуманізовані антитіла та їх компоненти зрілої варіабельної області важкого та легкого ланцюгів. Коротко, антитіла, позначені AF, мають ті ж каркасні області варіабельної області, що і AMG191. Антитіла, позначені як NF, мають каркас варіабельної області, відмінний від AMG191. Антитіла, позначені як HF, мають ту ж каркасну область варіабельної області важкого ланцюгу, що і AMG191, та іншу каркасну область варіабельної області легкого ланцюгу. Цифри 2-1, 11, 12, 112 та 3 вказують на наявність замін CDR у положеннях H54/L30, H60/L30, H64/L30, H60/H64/L30, H95/L30 відповідно.

Таблиця 2

Гуманізовані антитіла	V _H	V _L
AF-2-1	AH1	AL2
AF11	AH2	AL2
AF12	AH3	AL2
AF112	AH4	AL2
AF-3	AH5	AL2
AF-1-1	AH4	AL1
NF	NH	NL
NF-2-1	NH1	NL2
NF11	NH2	NL2
NF12	NH3	NL2
NF112	NH4	NL2
NF-3	NH5	NL2
HF11	AH3	NL2
HF12	AH2	NL2
HF112	AH4	NL2

- Заміни CDR у H60, H64 та L30 збільшували зв'язування або окремо, або за допомогою комбінації (AF11, AF12 та AF112, Таблиця 2, Фіг. 2A-C). Важливіше всього, що залишки у H60 та H64 були мutowані назад у послідовності зародкової лінії людини, збільшуючи ступінь близькості до антитіла людини гуманізованих антитіл до с-Kit AF11, AF12 та AF112. Більше того, заміна у CDR однієї амінокислоти у H54, H95 або L27 (Таблиця 2, Фіг. 2A-B) порушувала зв'язування гуманізованих антитіл до с-Kit AF-2-1, AF-3 та AF-1-1 (Фіг. 2D).

- Гуманізоване антитіло до с-Kit NF було отримано шляхом трансплантації CDR із застосуванням у якості каркасів різних послідовностей зародкової лінії IGHV3-23*01 та IGKV2-28*01 людини (Таблиця 2, Фіг. 3A-B). Антитіло NF показало збільшену зв'язуючу активність у порівнянні з AMG191 (Фіг. 3C). Потім ті ж заміни CDR у H54, H60, H64, H95, L27 та L30 були застосовані до NF (Таблиця 2, Фіг. 3A-B). Заміни CDR у H60, H64 та L30 працювали не тільки з антитілами, що мають каркасні області IGKV4-1/IGHV1-46, але і з антитілами, що мають каркасні області IGHV3-23*01/IGKV2-28*01. Заміни CDR у H60, H64 та L30 або окремо, або у комбінації збільшували або зберігали зв'язуючу активність NF11, NF12 та NF112 (Фіг. 3D).

- Гуманізовані HF11, HF12 та HF112 були сконструйовані шляхом комбінування різних V_H та V_L, як показано у Таблиці 2, та усі вони показали збільшену активність зв'язування у порівнянні з AMG191 (Фіг. 4).

(с) Гуманізовані антитіла до с-Kit підвищують опосередкований макрофагами фагоцитоз

- Потім автори даного винаходу досліджували здатність гуманізованих антитіл до с-Kit забезпечувати фагоцитоз ракових клітин макрофагами, що походять з клітин периферичної крові людини. Оскільки у AMG191 активність Fc була інгібованою, автори винаходу створили AMG191-G1, який має ті ж послідовності, що і AMG191, за виключенням того, що AMG191-G1 має активну константну область Fc IgG1 людини. AMG191 не індукував фагоцитоз у порівнянні з контрольним натрій-фосфатним буфером; однак, AMG191-G1 індукував більш високу фагоцитарну активність, як і очікувалося, оскільки він має активний каркас IgG1 людини (Фіг. 5). AMG191-G1 індукував аналогічні рівні фагоцитарної активності при 0,1, 1 та 10 мкг/мл. На відміну від AMG191-G1, гуманізовані антитіла AF12, AF112, HF12, HF112 та NF112 були більш ефективними при більш низьких концентраціях та індукували більш високу фагоцитарну активність, ніж AMG191-G1 при 0,1, 1 або навіть при 10 мкг/мл, що передбачає застосування більш низької терапевтичної дози, необхідної для гуманізованих антитіл AF12, AF112, HF12, HF112 та NF112 (Фіг. 5). Дані показують, що у той час як AMG191-G1, AF12, AF112, HF12, HF112 та NF112 є антитілами людини з форматом IgG1, AF12, AF112, HF12, HF112 та NF112 більш

ефективні. Можливо, це пов'язано з більш високою афінністю зв'язування AF12, AF112, HF12, HF112 та NF112, обумовленою каркасами та/або замінами CDR.

(d) Гуманізовані антитіла до с-Kit індують сильну антитілозалежну клітино-опосередковану цитотоксичність (ADCC)

Здатність гуманізованого антитіла до с-Kit індукувати антитілозалежну клітино-опосередковану цитотоксичність (ADCC) аналізували на клітинах GIST. AMG191 не індукував ADCC при жодній з досліджуваних концентрацій. Індукція цитотоксичності HF12 та HF112 носить дозозалежний характер (Фіг. 6).

(e) Гуманізовані антитіла до с-Kit інгібують проліферацію гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин (HSPC)

Зрілі гемопоетичні клітини розвиваються з гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) за допомогою ієрархічно організованого процесу, який продукує все більш лінійно-специфічні клітини з проліферативним потенціалом, що зменшується. Тирозинкіназа с-Kit на клітинній поверхні взаємодіє зі своїм спорідненим лігандом, фактором стовбурових клітин (SCF), регулюючи самовідновлення ГСК. Блокуючи взаємодію с-Kit з фактором стовбурових клітин, автори винаходу перевірили, чи можуть гуманізовані антитіла до с-Kit пригнічувати проліферацію гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC). Як показано на Фіг. 7, за відсутності обробки будь-якими антитілами фактор стовбурових клітин індукував проліферацію HSPC. Однак, AMG191, AMG191-G1, HF12 та HF112 інгібували проліферацію HSPC (Фігура 7). Більш того, HF12 та HF112 більш ефективні у інгібуванні проліферації гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (HSPC), ніж AMG191 та AMG191-G1 (Фіг. 7). Можливо, це пов'язано з більш високою афінністю зв'язування HF12 та HF112, обумовленою каркасами та/або замінами CDR.

(f) Гуманізовані антитіла до с-Kit не викликають значної дегрануляції тучних клітин.

сKIT експресується на гемопоетичних стовбурових клітинах та зрілих здорових клітинах. Тучні клітини походять з гемопоетичних попередників CD34⁺ у кістковому мозку. При міграції у різні периферичні тканини ці клітини-попередники диференціюються у зрілі тучні клітини, які експресують сKIT разом з високоафінними рецептором IgE, FcεRI. Зв'язування антигену з праймованим IgE FcεRI на тучних клітинах запускає дегрануляцію та вивільнення хімічних медіаторів, таких як гістамін та триптаза, поряд з цитокінами, лейкотриєнами та протеазами. Вивільнення хімічних медіаторів викликає класичні симптоми алергії. При клінічному застосуванні бажано, щоб антитіло до сKIT зменшувало кількість гемопоетичних стовбурових клітин без індукції дегрануляції тучних клітин.

Фенотиповані зрілі тучні клітини (CD34⁻, FcεRIα⁺, сKIT⁺), диференційовані з цільної периферичної крові здорового донора-людини, інкубували з різними концентраціями гуманізованих антитіл до с-Kit HF12 та HF12 (10, 1, 0,1 та 0,01 мкг/мл) впродовж 7 годин. A23187 (10 мкМ) та IgE плюс анти-IgE (10 мкг/мл кожен) застосовували у якості позитивних контролів. Дегрануляцію кількісно оцінювали шляхом вимірювання вивільнення β-гексозамінідази із застосуванням абсорбційного методу, як описано у методах.

Первинні тучні клітини людини диференціювали *in vitro*, вони проявляли фенотип CD34⁻, FcεRIα⁺ та сKIT⁺ у кінці 9 тижня, що відповідало фенотиповим характеристикам зрілих тучних клітин. Потім клітини стимулювали кальцієвим іонофором A23187 або IgE у поєднанні з анти-IgE. A23187 та IgE + анти-IgE ефективно індукували дегрануляцію тучних клітин, що було виміряно за вивільненням β-гексозамінідази.

Пряма обробка клітин антитілами до с-Kit або перехресне зв'язування антитіл до с-Kit антитілом до IgG не викликало значної дегрануляції тучних клітин у порівнянні з обробкою A23187 та анти-IgE. (Фіг. 8). Імобілізація антитіл до с-Kit на планшетах також слабо впливала на дегрануляцію тучних клітин. Спільна інкубація тучних клітин та NK-клітин у присутності різних концентрацій антитіл до с-Kit також не викликала дегрануляції тучних клітин при будь-яких досліджуваних концентраціях.

На закінчення, антитіла до с-Kit HF12 та HF112 зробили незначний вплив на дегрануляцію первинних тучних клітин людини *in vitro* у порівнянні з такими при застосуванні кальцієвого іонофору A23187 або IgE у комбінації з обробкою анти-IgE.

Всі патентні заявки, веб-сайти, інші публікації, номери доступу тощо, цитовані вище або нижче, включені шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей у такій мірі, як якби кожен з цих документів був конкретно та індивідуально вказаний для включення шляхом посилання. Якщо різні версії послідовності пов'язані з номером доступу у різний час, то мається на увазі версія, пов'язана з номером доступу на дійсну дату подачі даної заявки. Дійсна дата подачі заявки означає більш ранню з дійсної дати подання або дати подання пріоритетної заявки, що посилається на номер доступу, за необхідності. Аналогічно, якщо різні версії публікації, веб-

сайту чи подібне опубліковані у різний час, тоді мається на увазі версія, опублікована самою останньою на дійсну дату подачі заявки, якщо не вказано інше. Будь-яка ознака, стадія, елемент, варіант реалізації або аспект винаходу може бути застосований у комбінації з будь-яким іншим, якщо спеціально не вказано інше. Незважаючи на те, що даний винахід описано досить докладно за допомогою ілюстрації та прикладу для прояснення та розуміння, буде зрозуміло, що деякі зміни та модифікації можуть бути зроблені у межах обсягу прикладеної Формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

10

<110> FORTY SEVEN, INC.
LIU, JIE
SOMPALLI, KAVITHA

15

<120> ГУМАНІЗОВАНІ АНТИТІЛА ДО C-KIT
<130> 063673-540687
<150> 62/771,526
<151> 2018-11-26
<160> 54

20

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> БІЛОК

25

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 1

30

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala 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 Ser Tyr
20 25 30

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

35

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

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

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

40

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

45

<210> 2

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

50

<220>

<223> Синтезована

<400> 2

Ser Tyr Asn Met His
1 5

55

<210> 3

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

60

<220>

<223> Синтезована

<400> 3
Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

5

<210> 4
<211> 8
<212> БІЛОК
10 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтезована
<400> 4
Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
15 1 5

<210> 5
<211> 111
<212> БІЛОК
20 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтезована
<400> 5
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
25 1 5 10 15
Leu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
20 25 30
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
30 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
35 85 90 95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
40 <211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтезована
45 <400> 6
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 7
50 <211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтезована
55 <400> 7
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 8
60 <211> 9
<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 8
 5 Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

 <210> 9
 <211> 117
 10 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 9
 15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Gln Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 30 115

 <210> 10
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 35 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 10
 Ser Tyr Asn Met His
 40 1 5

 <210> 11
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 45 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 11
 Val Ile Tyr Ser Gly Gln Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 50 1 5 10 15
 Gly

 <210> 12
 55 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 60 <400> 12
 Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn

1 5

<210> 13
 <211> 117
 5 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 13

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

<210> 14
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 30 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 14
 Ser Tyr Asn Met His
 35 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 15
 Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Lys
 45 1 5 10 15
 Gly

<210> 16
 50 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 55 <400> 16
 Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
 1 5

<210> 17
 60 <211> 117
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 17
 5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 10 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 15 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 20 115

 <210> 18
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 18
 Ser Tyr Asn Met His
 30 1 5

 <210> 19
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 35 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 19
 Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 40 1 5 10 15
 Gly

 <210> 20
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 50 <400> 20
 Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
 1 5

 <210> 21
 55 <211> 117
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 60 <400> 21
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 5 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 10 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 15 115

 <210> 22
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 22
 Ser Tyr Asn Met His
 25 1 5

 <210> 23
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 30 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 23
 Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 35 1 5 10 15
 Gly

 <210> 24
 40 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 45 <400> 24
 Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
 1 5

 <210> 25
 50 <211> 117
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 55 <400> 25
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 60 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 10 115

 <210> 26
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 26
 Ser Tyr Asn Met His
 20 1 5

 <210> 27
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 27
 Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 30 1 5 10 15
 Gly

 <210> 28
 35 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 40 <400> 28
 Asp Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
 1 5

 <210> 29
 45 <211> 117
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 50 <400> 29
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 55 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 60 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 Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 5 115
 <210> 30
 <211> 98
 <212> БІЛОК
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 15 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 20 Gln 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
 25
 <210> 31
 <211> 111
 <212> БІЛОК
 30 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 31
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 45 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 32
 50 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 55 <400> 32
 Arg Ala Ser Asp Ser Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
 1 5 10 15
 <210> 33
 60 <211> 7
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 33
 5 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

 <210> 34
 <211> 9
 10 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 34
 15 Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

 <210> 35
 <211> 111
 20 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 35
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 30 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 35 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 40 <210> 36
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> Синтезована
 <400> 36
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr Gly Gln Ser Phe Met His
 1 5 10 15

 50 <210> 37
 <211> 7
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> Синтезована
 <400> 37
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

 60 <210> 38
 <211> 9

<212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 5 <400> 38
 Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

 <210> 39
 10 <211> 111
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 15 <400> 39
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 25 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 30
 <210> 40
 <211> 101
 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 40
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 45 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro
 100
 50
 <210> 41
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 41
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala
 60
 <210> 42

<211> 7
 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 5 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

 <210> 43
 <211> 7
 10 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
 1 5
 15
 <210> 44
 <211> 117
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 40
 <210> 45
 <211> 117
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> Синтезована
 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Ser Tyr
 20 25 30
 50 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Gln Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala 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 Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 60 Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 46
 <211> 117
 5 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 46
 10 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 25 115
 <210> 47
 <211> 117
 <212> БІЛОК
 30 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 47
 35 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 45 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 50 115
 <210> 48
 <211> 117
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 55 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 48
 60 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

15 <210> 49
<211> 117
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтезована
20 <400> 49

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Ser Tyr
20 25 30
25 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala 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 Asp Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
35 Val Thr Val Ser Ser
115

40 <210> 50
<211> 98
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 50

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
55 Ala Lys

60 <210> 51
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтезована
 <400> 51
 5 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 10 Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 15 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 <210> 52
 20 <211> 111
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтезована
 25 <400> 52
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30
 30 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 35 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 40 <210> 53
 <211> 111
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Синтезована
 <400> 53
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 50 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 55 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 60

<210> 54
 <211> 100
 <212> БІЛОК
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 10 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 15 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro
 20 100

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло, що специфічно зв'язується з с-Kit людини, яке містить зрілу варіабельну область важкого ланцюга, що містить CDR H1, H2 та H3, визначені за Кеботом, представлені у SEQ ID NO: 14-16, відповідно, та зрілу варіабельну область легкого ланцюга, що містить CDR L1, L2 та L3, визначені за Кеботом, представлені у SEQ ID NO: 36-38, відповідно.
2. Антитіло за п. 1, у якому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга має щонайменше 95 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 13, та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга має щонайменше 95 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 53, при цьому будь-яка відмінність від SEQ ID NO: 13 та 53 знаходиться за межами CDR, визначених за Кеботом.
3. Антитіло за п. 2, у якому положення 1 важкого ланцюга за нумерацією Кебота являє собою Е.
4. Антитіло за п. 2, у якому наступні положення зазначеної зрілої варіабельної області легкого ланцюга, пронумеровані за Кеботом, зайняті амінокислотами наступним чином: положення 9 зайняте L; положення 12 зайняте Р; положення 14 зайняте Т; положення 15 зайняте Р; положення 18 зайняте Р; положення 20 зайняте S; положення 22 зайняте S; положення 37 зайняте L; положення 43 зайняте S; положення 45 зайняте Q; положення 74 зайняте К; положення 77 зайняте R; положення 78 зайняте V; положення 79 зайняте Е та положення 84 зайняте G.
5. Антитіло за п. 1, у якому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, за виключенням того, що положення 1 може являти собою Е, та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53.
6. Антитіло за п. 1, у якому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга зв'язана з константною областю важкого ланцюга, та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга зв'язана зі зрілою константною областю легкого ланцюга.
7. Антитіло за п. 6, у якому зазначена константна область важкого ланцюга являє собою IgG1 людини.
8. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за п. 1 та фармацевтично прийнятний носій.
9. Антитіло за п. 1, у якому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга має щонайменше 98 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 13, та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга має щонайменше 98 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 53, при цьому будь-яка відмінність від SEQ ID NO: 13 та 53 знаходиться за межами CDR, визначених за Кеботом.
10. Антитіло за п. 1, у якому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга має щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 13, та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга має щонайменше 99 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 53, при цьому будь-яка відмінність від SEQ ID NO: 13 та 53 знаходиться за межами CDR, визначених за Кеботом.

11. Антитіло за п. 5, у якому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга зв'язана з константною областю важкого ланцюга, та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга зв'язана зі зрілою константною областю легкого ланцюга.
12. Антитіло за п. 11, у якому зазначена константна область важкого ланцюга являє собою IgG1 людини.
13. Антитіло за будь-яким з пп. 1-12 для застосування у лікуванні раку, що експресує c-Kit, який включає введення антитіла у ефективному режимі суб'єкту, що має зазначений рак.
14. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за п. 5 та фармацевтично прийнятний носій.
15. Антитіло, що специфічно зв'язується з c-Kit людини, яке містить зрілу варіабельну область важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13 та зрілу варіабельну область легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53, при цьому зазначена зріла варіабельна область важкого ланцюга зв'язана з константною областю важкого ланцюга ізотипу IgG1 людини та зазначена зріла варіабельна область легкого ланцюга зв'язана зі зрілою константною областю легкого ланцюга.
16. Антитіло п. 15, експресоване з клітини CHO.
17. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за п. 15 та фармацевтично прийнятний носій.

CDR1
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGL

CDR2
EWIGVIYSGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQINSLTSEDSAVY

CDR3
YCARERDTRFGNWGQGTLVTVSA

Амінокислотна послідовність HB-10716 VH

Fig. 1A

CDR1
NIVLTQSPASLAVSLGLRATISCRASESVDIYGNSEFMHWYQQKPGQPPK

CDR2 CDR3
LLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDP

YTFGGGTKLEIK

Амінокислотна послідовність HB-10716 VL

Fig. 1B

	1	2	3	4	5	6
	123456789012345678901234567890123456789012345678901223456789					
HB-10716	QVQLQQPGAELVKPGA SVKMS CKASGYT FTS YNNHWVVKQTPQGSLNWIGVIYSNGSDT SY					
AH1	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIYSQGLSDT SY					
AH2	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIYSNGSDT SY					
AH3	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIYSNGSDT SY					
AH4	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIYSNGSDT SY					
AH5	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIYSNGSDT SY					
AM2191	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIYSNGSDT SY					
IGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVS CKASGYT FTS YNNHWVRQAPQGSLNMMQVIINPSSSDT SY					

	6	7	8	abc	9	10	11
	01234567890123456789012223456789012345678901234567890123						
HM-10716	<u>SGKFKGNA</u> RLTADKSTSTAYMQIRSLTSEDSAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	A		
AH1	<u>SGKFKGRV</u> TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	S		
AH2	<u>SGKFKGRV</u> TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	S		
AH3	<u>SGKFKGRV</u> TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	S		
AH4	<u>SGKFKGRV</u> TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	S		
AH5	<u>SGKFKGRV</u> TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	S		
ANK191	<u>SGKFKGRV</u> TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<u>EDRTR</u>	<u>FGHWGQGT</u>	<u>LVTVS</u>	S		
IGHV1-46*01	<u>SGKFKGRV</u> MTEDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR						

Вирівнювання послідовності УН гліцинованих антитіл до с-Хіт

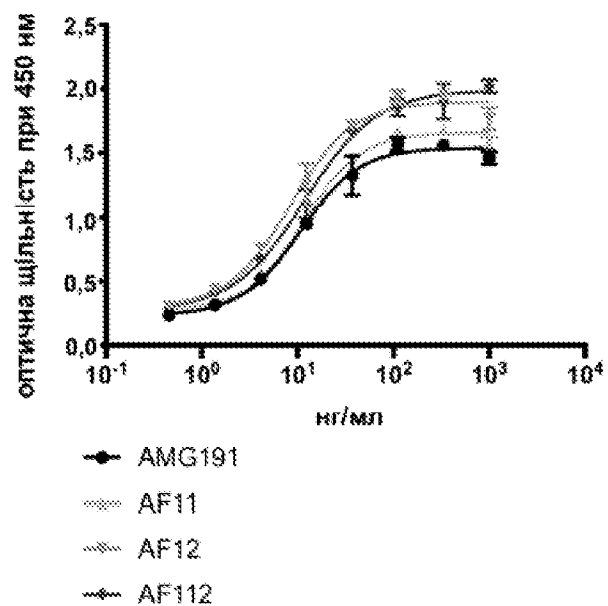
Fig. 2A

	1	2	abcd	3	4	5
12345678901	2345678901	2345677777	8901234	5678901234	5678901234	5678901234
HE-10716	NIVLTQSPA	SLAVSLGLRATI	SCRASE	SVDI	YGNSEFMH---	WYQKPGQPPKLLIYLASNLES
AL1	DIVMTQSPD	SLAVSLGERATI	NCRA	SESVDI	YGNSEFMH---	WYQKPGQPPKLLIYLASNLES
AL2	DIVMTQSPD	SLAVSLGERATI	NCRA	SESVDI	YGNSEFMH---	WYQKPGQPPKLLIYLASNLES
AMG191	DIVMTQSPD	SLAVSLGERATI	NCRA	SESVDI	YGNSEFMH---	WYQKPGQPPKLLIYLASNLES
IGKV4-1*01	DIVMTQSPD	SLAVSLGERATI	NC	KSSQS	VLYSSNNKNYLAW	YQKPGQPPKLLIYWASTRES

	6	7	8	9	10	
78901234567	8901234567	8901234567	8901234567	8901234567	8901234567	
HE-10716	GVPDRFSG	SGSGT	DFTLT	ISS	LQAEDVAVYY	COQNNEDPYT
AL1	GVPDRFSG	SGSGT	DFTLT	ISS	LQAEDVAVYY	COQNNEDPYT
AL2	GVPDRFSG	SGSGT	DFTLT	ISS	LQAEDVAVYY	COQNNEDPYT
AMG191	GVPDRFSG	SGSGT	DFTLT	ISS	LQAEDVAVYY	COQNNEDPYT
IGKV4-1*01	GVPDRFSG	SGSGT	DFTLT	ISS	LQAEDVAVYY	COQNNEDPYT

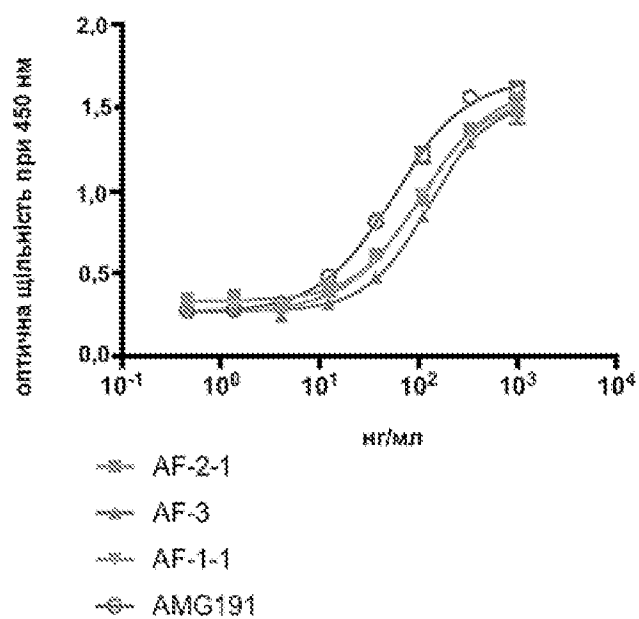
Вирівнювання послідовності VL гуманізованих антитіл до c-Hu

Fig. 2B



ІФА-визначення

Fig. 2C



ІФА-визначення

Fig. 2D

	1	2	3	4	5	a
HE-10716	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789					
NH	QVQIQQPGAEIVKPGASVKMSCKASGTTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
NH1	EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
NH2	EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
NH3	EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
NH4	EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
NH5	EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
AMG191	QVQIQVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGTTFTSYNMHWVQAPGQGLEWIGVIYSQNGDTSY					
IGHV3-23*01	EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMGWVQAPGQGLEWIGAISSGGSTYY					

	6	7	8	abc	9	10	11
HE-10716	01234567890123456789012223456789012345678901234567890123						
NH	NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNELTSEDSAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
NH1	NQKPKGRFTTISADKSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
NH2	NQKPKGRFTTISADKSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
NH3	NQKPKGRFTTISADKSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
NH4	NQKPKGRFTTISADKSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
NH5	NQKPKGRFTTISADKSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
AMG191	NQKPKGPVYITADKSYSTAYMELSLKSEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTIVTVSS						
IGHV3-23*01	ADSVTRFTTISKNSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCAR						

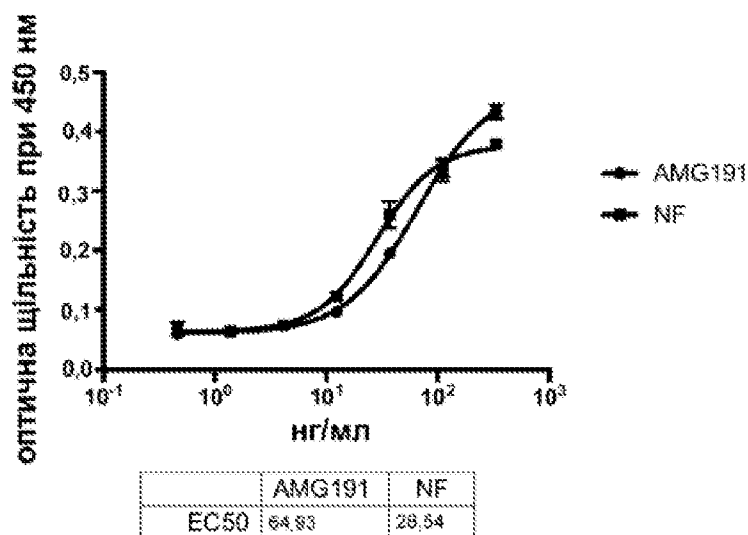
Вирівнювання послідовності VH гуманізованих антитіл до c-Ki

Фіг. 3A

	1	2	abcd	3	4	5
HE-10716	12345678901234567890123456777778901234					
NL	NIVLTQSPAQLAVEGLRATISCRASESVDIYGNSEFMH---WYLOKPGQSPQLLIYLASNLKS					
NL1	DIVMTQSPFLSLPVTPGERASTISCRASESVDIYGNSEFMH---WYLOKPGQSPQLLIYLASNLKS					
NL2	DIVMTQSPFLSLPVTPGERASTISCRASESVDIYGNSEFMH---WYLOKPGQSPQLLIYLASNLKS					
AMG191	DIVMTQSPDGLAVSLGERATINCRASESVDIYGNSEFMH---WYLOKPGQSPQLLIYLASNLKS					
IGKV2-28*01	DIVMTQSPFLSLPVTPGERASTISCRASESVDIYGNSEFMH---WYLOKPGQSPQLLIYLASNLKS					
	6	7	8	9	10	
HE-10716	78901234567890123456789012345678901234567					
NL	GVPARFSGSGSRTDFTLTISRVEAEDVGVYCCQNNEDPYTFGGGTKEIK					
NL1	GVPDRFSGSGSRTDFTLTISRVEAEDVGVYCCQNNEDPYTFGGGTKEIK					
NL2	GVPDRFSGSGSRTDFTLTISRVEAEDVGVYCCQNNEDPYTFGGGTKEIK					
AMG191	GVPDRFSGSGSRTDFTLTISRVEAEDVGVYCCQNNEDPYTFGGGTKEIK					
IGKV2-28*01	GVPDRFSGSGSRTDFTLTISRVEAEDVGVYCCQALQTF					

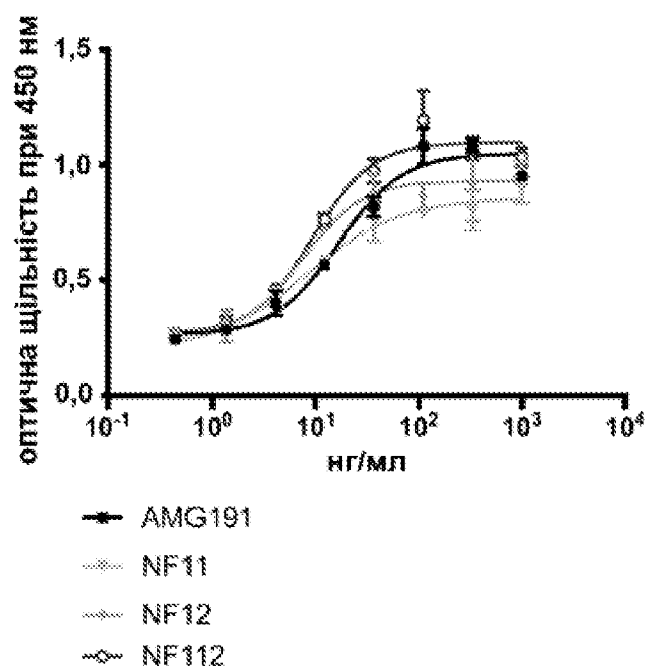
Вирівнювання послідовності VL гуманізованих антитіл до c-Ki

Фіг. 3B



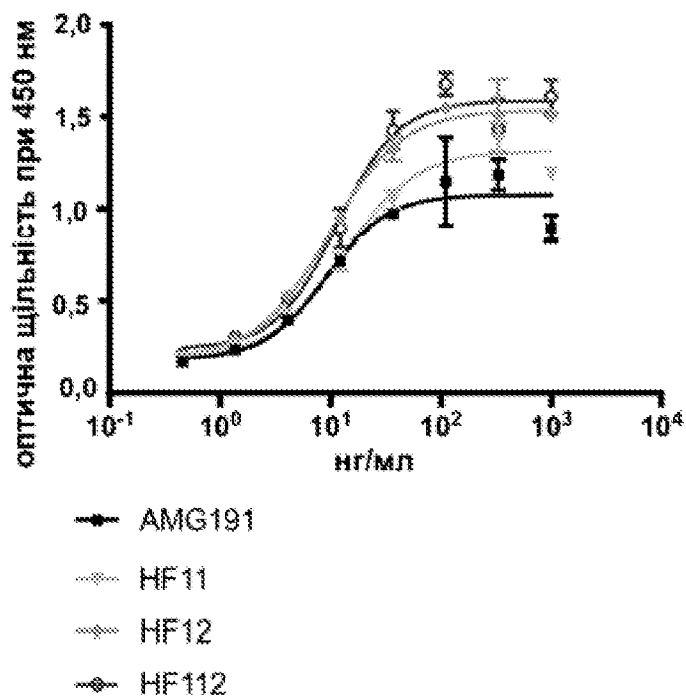
ІФА активності зв'язування

Fig. 3C



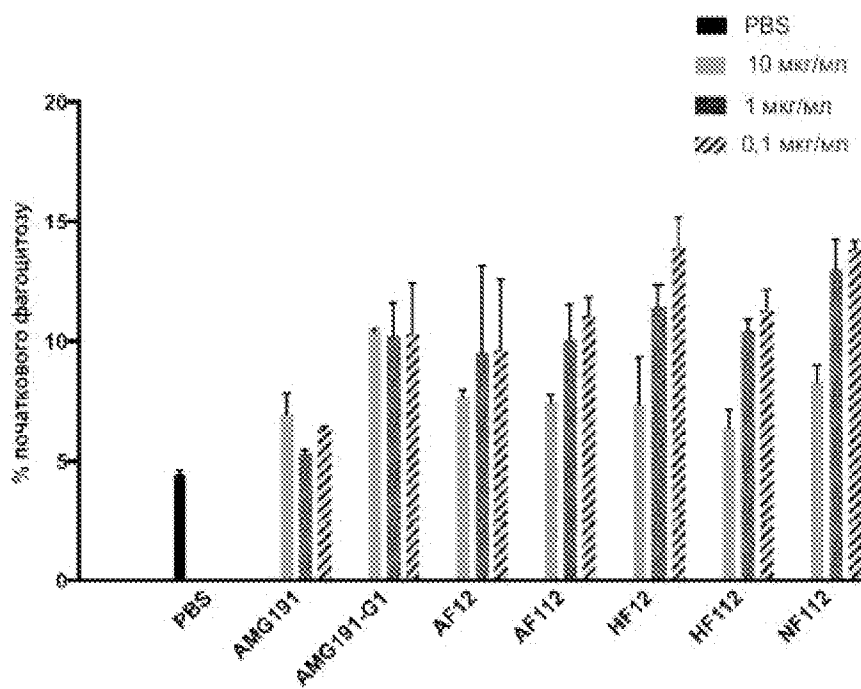
ІФА активності зв'язування

Fig. 3D



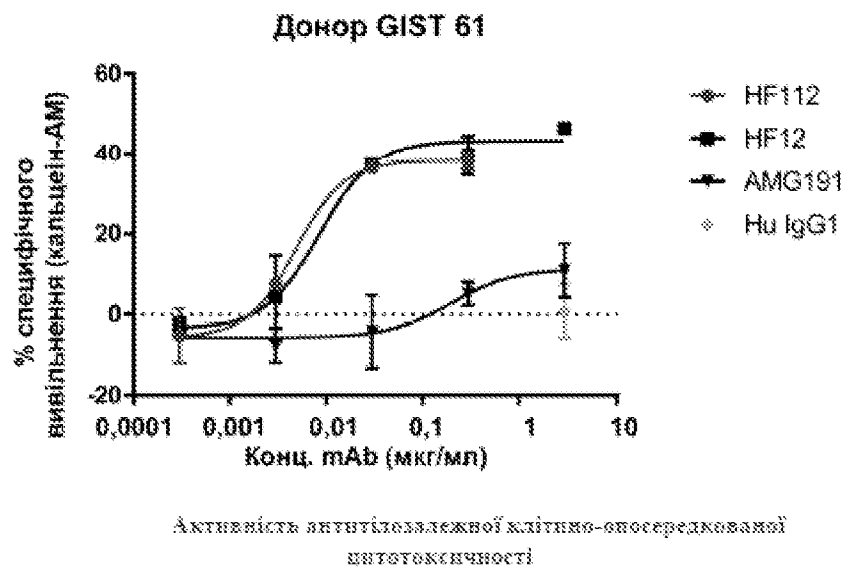
ІФА зв'язування

Фіг. 4

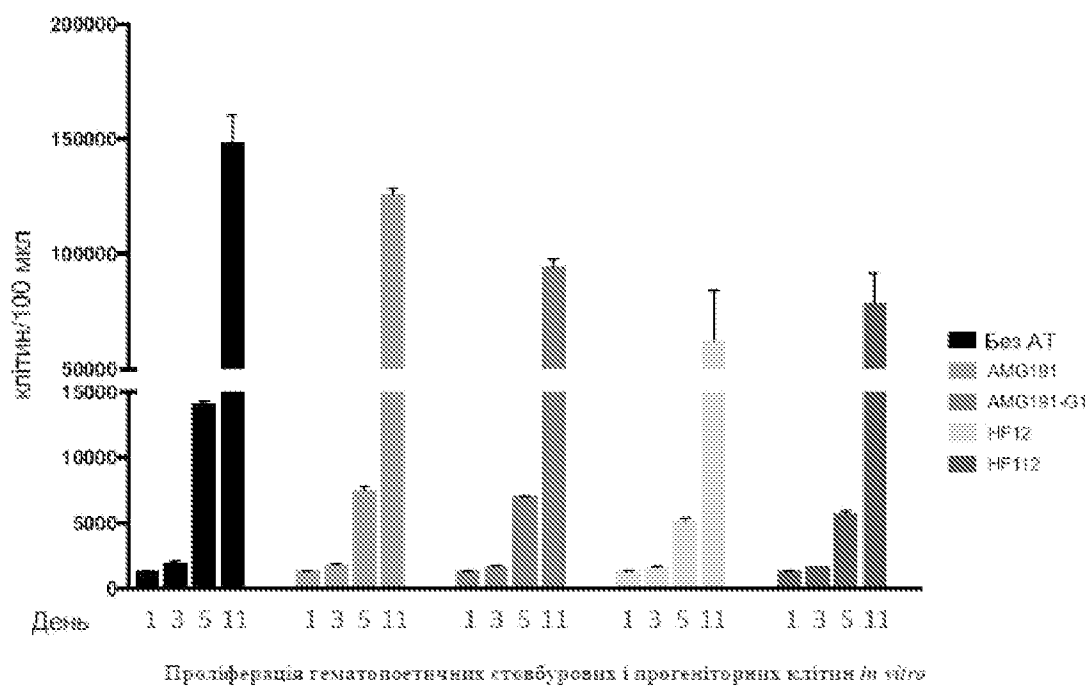


Фагоцитарна активність *in vitro*

Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

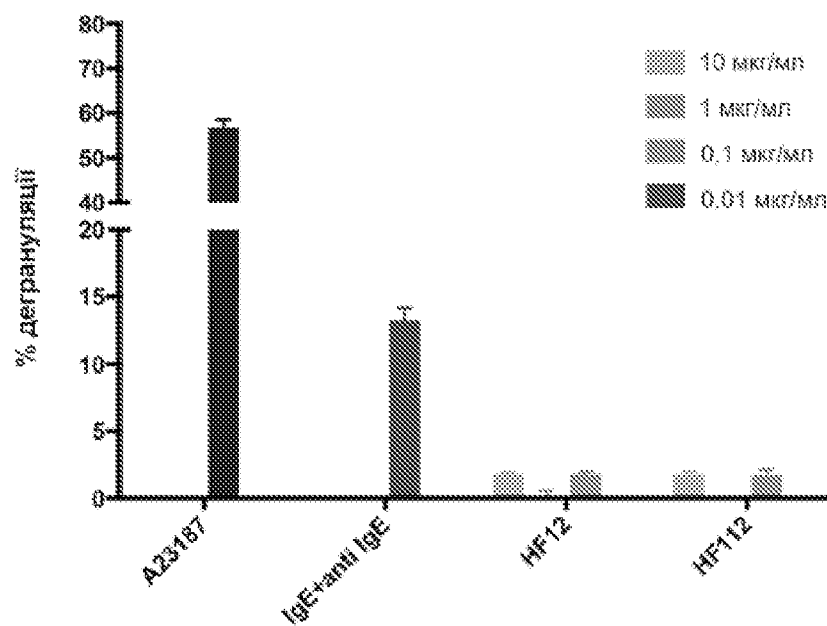


Fig. 8