



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.03.29

(21) Номер заявки
200801509

(22) Дата подачи заявки
2006.12.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) ВЫДЕЛЕННОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С
ПРОТЕИНТИРОЗИНКИНАЗОЙ 7 (РТК7) ЧЕЛОВЕКА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **60/748,373**

(32) **2005.12.08**

(33) **US**

(43) **2008.12.30**

(86) **PCT/US2006/046837**

(87) **WO 2007/067730 2007.06.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДАРЕКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Лу Ли-шэнг, Терретт Джонатан
Александр, Пэн Чин (US)**

(74) Представитель:
Дементьев В.Н. (RU)

(56) WO-A-2004017992
DATABASE BIOSLIDE [Online] bioslide; PTK7
monoclonal antibody (M02), clone 4C6 2005, DATA-
SHEET: [http://www.bioslide.com/productdetail.asp?
CartID=BIO@D8LJYEUPNU6HVNTB6QSFWSW2UHNJIL16BV54GIKEV61QEFT&sku=H00005754-M02,XP002446359, abstract](http://www.bioslide.com/productdetail.asp?CartID=BIO@D8LJYEUPNU6HVNTB6QSFWSW2UHNJIL16BV54GIKEV61QEFT&sku=H00005754-M02,XP002446359, abstract)
MOSSIE K. ET AL.: "COLON CARCINOMA
KINASE-4 DEFINES A NEW SUBCLASS OF
THE RECEPTOR TYROSINE KINASE FAMILY".
ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 11, no.
10, 16 November, 1995 (1995-11-16), pages 2179-2184,
XP000605662, ISSN: 0950-9232, abstract

JUNG JAE WON ET AL.: "Organization of the
human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine
kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA".
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 12 DEC 2002,

vol. 1579, no. 2-3, 12 December, 2002 (2002-12-12), pages
153-163, XP002446356, ISSN: 0006-3002, abstract

PARK S.-K. ET AL.: "CHARACTERIZATION
OF THE HUMAN FULL-LENGTH PTK7 CDNA
ENCODING A RECEPTOR PROTEIN TYROSINE
KINASE-LIKE MOLECULE CLOSELY RELATED TO
CHICK KLG1". JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,
JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY/OUJ, TOKYO, JP,
vol. 119, no. 2, 1996, pages 235-239, XP000605383, ISSN:
0021-924X, abstract

EASTY D.J. ET AL.: "Loss of expression of
receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in
metastatic melanoma". INTERNATIONAL JOURNAL OF
CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 71, no. 6, 1997, pages
1061-1065, XP001157104, ISSN: 0020-7136, abstract

KOBUS FELIX J. ET AL.: "The GxxxG-containing
transmembrane domain, of the CCK4 oncogene does not
encode preferential self-Interactions". BIOCHEMISTRY, 8
FEB 2005, vol. 44, no. 5, 8 February, 2005 (2005-02-08),
pages 1464-1470, XP002446357, ISSN: 0006-2960, abstract

LU XIAOWEI ET AL.: "PTK7/CCK-4 is a novel
regulator of planar cell polarity in vertebrates". NATURE.
1 JUL 2004, vol. 430, no. 6995, 1 July 2004 (2004-07-01),
pages 93-98, XP002446358, ISSN: 1476-4687, abstract

KYRIAKOS R.J. ET AL.: "THE FATE
OF ANTIBODIES BOUND TO THE SURFACE
OF TUMOR CELLS IN VITRO". CANCER
RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR
CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 52,
no. 4, 15 February, 1992 (1992-02-15), pages 835-842,
XP001248328, ISSN: 0008-5472, abstract

SHIH ET AL.: "The processing and fate of
antibodies and their radiolabels bound to the surface of tumor
cells in vitro: A comparison of nine radiolabels". JOURNAL
OF NUCLEAR MEDICINE, SOCIETY OF NUCLEAR
MEDICINE, RESTON, VA, US, vol. 35, no. 5, 1994, pages
899-908, XP002097375, ISSN: 0161-5505

(57) Изобретение включает выделенные моноклональные антитела, в частности человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с РТК7 с высокой аффинностью. Также предусматриваются нуклеотидные молекулы, кодирующие антитела по изобретению, векторы экспрессии, клетки-хозяева и способы экспрессирования антител по изобретению. Также охватываются иммуноконъюгаты, биспецифические молекулы и фармацевтические композиции, содержащие антитела по изобретению. Также изобретение включает способы обнаружения РТК7 и способы лечения различных заболеваний, включая рак и инфекционные заболевания, с применением антител против РТК7.

Предпосылки создания изобретения

Рецепторные тирозинкиназы (РТК, RTK) представляют собой трансмембранные передающие сигналы белки, которые передают биологические сигналы из внеклеточной среды внутрь клетки. Регуляция РТК сигналов важна для регуляции клеточного роста, дифференцировки, аксонного роста, эпителиального роста, развития, адгезии, миграции и апоптоза клеток (Prenzel et al. (2001), *Endocr. Relat. Cancer*. 8: 11-31; Hubbard and Till (2000), *Annu. Rev. Biochem.* 69: 373-98). Известно, что РТК участвуют в развитии и прогрессировании некоторых форм рака. В большинстве РТК-связанных форм рака наблюдается скорее амплификация рецепторного белка, нежели мутация гена (Kobus and Fleming (2005), *Biochemistry*. 44: 1464-70).

Протеинтирозинкиназа 7 (РТК7), член семейства рецепторных протеинтирозинкиназ, впервые была выделена из нормальных человеческих меланоцитов и клонирована методом RT-ПЦР (Lee et al. (1993), *Oncogene*. 8: 3403-10; Park et al. (1996), *J. Biochem.* 119: 235-9). Отдельно клонировали ген из клеточной линии карциномы толстой кишки человека и назвали киназой карциномы толстой кишки 4 (ССК4) (Mossie et al. (1995), *Oncogene*. 11: 2179-84). РТК7 относится к субпопуляции РТК (РТК), в которых отсутствует детектируемая тирозинкиназная активность, но сохраняется активность сигнальной трансдукции, и полагают, что она, вероятно, функционирует как молекула клеточной адгезии.

Найдено, что мРНК для РТК7 вариабельно экспрессируется в клеточных линиях карциномы толстой кишки, но её экспрессия не обнаружена во взрослых тканях толстой кишки человека (Mossie et al., *supra*). Экспрессия РТК7 также наблюдалась в линиях клеток меланомы и при биопсии меланомы (Easty, et al. (1997), *Int. J. Cancer*. 71: 1061-5). Найдено, что альтернативная сплайсированная форма экспрессируется в клетках гепатом и клетках карциномы толстой кишки (Jung et al. (2002), *Biochim Biophys Acta*. 1579: 153-63). Найдено, кроме того, что РТК7 в высокой степени сверхэкспрессирует в образцах острого миелоидного лейкоза (Muller-Tidow et al. (2004), *Clin. Cancer Res.* 10: 1241-9). С помощью иммуногистохимии опухолеспецифическое окрашивание РТК7 наблюдали при раке молочной железы, толстой кишки, лёгкого, поджелудочной железы, почки и мочевого пузыря, как описано в опубликованной заявке РСТ WO 04/17992.

Поэтому необходимы агенты, распознающие РТК7, и способы применения таких агентов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает выделенные моноклональные антитела, в частности человеческие моноклональные антитела, которые связываются с РТК7 и проявляют нужные различные свойства. Эти свойства включают высокоаффинное связывание с человеческой РТК7 и связывание с клетками опухоли Вильмса (нефробластомы). Также охватываются способы лечения различных заболеваний, опосредуемых РТК7, с применением антител и композиций по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку (фрагменту), отличающемуся тем, что это антитело:

(а) специфически связывается с человеческой РТК7;

(б) связывается с клетками линии опухоли Вильмса (ATCC Acc No. CRL-1441). Предпочтительно антитело является человеческим антителом, хотя альтернативные варианты изобретения могут представлять собой мышинное антитело, химерное антитело или "гуманизированное" антитело.

В более предпочтительных вариантах изобретения антитело связывается с клетками опухоли Вильмса с EC₅₀ 4,0 нМ или менее или антитело связывается с клетками опухоли Вильмса с EC₅₀ 3,5 нМ или менее.

В другом варианте изобретения антитело связывается с линией раковых клеток, выбранной из группы, состоящей из A-431 (ATCC Acc No. CRL-1555), Saos-2 (ATCC Acc No. HTB-85), SKOV-3 (ATCC Acc No. HTB-77), PC3 (ATCC Acc No. CRL-1435), DMS 114 (ATCC Acc No. CRL-2066), ACHN (ATCC Acc No. CRL-1611), LNCaP (ATCC Acc No. CRL-1740), DU 145 (ATCC Acc No. HTB-81), LoVo (ATCC Acc No. CCL-229) и MIA PaCa-2 (ATCC Acc No. CRL-1420) клеточных линий.

В другом варианте данное изобретение включает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент), отличающееся тем, что это антитело перекрёстно конкурирует за связывание с РТК7 с эталонным антителом, причём эталонное антитело:

(а) специфически связывается с человеческой РТК7;

(б) связывается с клетками линии опухоли Вильмса (ATCC Acc No. CRL-1441).

В различных вариантах изобретения эталонное антитело включает в себя:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

или эталонное антитело включает в себя:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 26;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 28;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40.

Другие предпочтительные антитела по изобретению, или их антигенсвязывающие участки включают в себя:

(а) варибельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

(б) варибельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

(а) варибельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

(б) варибельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

(а) варибельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

(б) варибельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

(а) варибельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

(б) варибельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

(а) варибельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

(б) варибельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Другая предпочтительная комбинация включает в себя:

(а) варибельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и

(б) варибельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Антитела по изобретению могут представлять собой, например, полноразмерные антитела, например IgG1 или IgG4 изотипа. Или же антитела могут представлять собой фрагменты антитела, такие как Fab или Fab₂ фрагменты. Изобретение также включает биспецифическую молекулу, содержащую антитело или его антигенсвязывающий участок, связанное(ый) со вторым функциональным фрагментом, обладающим специфичностью связывания, отличную от специфичности связывания указанного антитела или его антигенсвязывающего участка.

Также охватываются композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий участок, или иммуноконъюгат, или биспецифическое соединение по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Нуклеотидные молекулы, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие участки, по изобретению также охватываются данным изобретением, так же как векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы экспрессии. Кроме того, изобретение включает трансгенную мышь, содержащую трансгены тяжёлой и лёгкой цепей человеческих иммуноглобулинов, отличающуюся тем, что эта мышь экспрессирует антитело по изобретению, а также гибридомы, полученные из такой мыши, причём гибридомы продуцируют антитело по изобретению.

Ещё в одном аспекте изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения заболевания, характеризующегося ростом опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, заключающийся во введении субъекту антитела или его антигенсвязывающего участка по изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения заболевания. Заболевание может представлять собой, например, рак, например, толстой кишки (включая рак тонкого кишечника), рак лёгкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), острый миелоидный лейкоз, рак почки, рак мочевого пузыря, рак яичника и рак предстательной железы.

В предпочтительном варианте изобретение включает способ лечения рака *in vivo* с применением антитела против РТК7. Антитело против РТК7 может представлять собой мышшиное, химерное, "гуманизованное" или человеческое антитело. Примеры других раковых заболеваний, которые можно лечить, используя способы по изобретению, включают почечный рак (например, почечно-клеточный рак), глиобластому, опухоли мозга, хронические или острые лейкозы, включая острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ, ALL), Т-клеточный лейкоз взрослых (Т-ОЛЛ, Т-ALL), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфомы (например, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, лимфоцитарная лимфома, первичная лимфома ЦНС, лимфома Беркитта, анапластические крупноклеточные лимфомы (ALCL), нодулярные лимфомы из малых клеток с расщепленным ядром, периферические Т-клеточные лимфомы, лимфомы Леннерта, иммунобластные лимфомы, Т-клеточный(ые) лейкоз/лимфомы (ATLL), центробластно-центроцитарные (cb/cc) фолликулярные лимфомы, диффузные крупноклеточные В-клеточные лимфомы, Т-клеточная лимфома типа ангиоиммунобластной лимфаденопатии (AILD) и связанные с ВИЧ лимфомы полости тела), эмбриональные карциномы, недифференцированные карциномы носоглотки (например, опухоль Шминке), болезнь Кацльмана, саркому Капоши, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрома и другие В-клеточные лимфомы, назофарингеальные карциномы, рак кости, рак кожи, рак головы и шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, ректальный рак, анальный рак, рак желудка, рак яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак околощитовидной железы, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли у детей, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль позвоночника, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, раковые заболевания, вызванные загрязнением окружающей среды, включая рак, вызванный асбестозом, например мезотелиому, и комбинации указанных раковых заболеваний.

Другие признаки и преимущества данного изобретения будут ясны из нижеприведённого подробного описания и примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех ссылочных материалов, данных в GenBank, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых по всему изобретению, однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 41) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 1) варибельной области тяжёлой цепи человеческих моноклональных антител 3G8 и 3G8а. Определены области (границы областей) CDR1 (SEQ ID NO: 11), CDR2 (SEQ ID NO: 15) и CDR3 (SEQ ID NO: 19) и указано происхождение V, D и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 1В показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 45) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 5) варибельной области лёгкой цепи человеческого моноклонального антитела 3G8. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) и CDR3 (SEQ ID NO: 35) и указано происхождение V и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 1С показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 46) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 6) варибельной области лёгкой цепи человеческого моноклонального антитела 3G8а. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 36) и указано происхождение V и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 2А показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 42) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 4D5. Определены области (показаны области) CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 16) и CDR3 (SEQ ID NO: 20) и указано происхождение V, D и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 2В показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 47) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 7) варибельной области лёгкой цепи человеческого моноклонального антитела 4D5. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 31) и CDR3 (SEQ ID NO: 37) и указано происхождение V и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 3А показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 43) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 3) варибельной области тяжёлой цепи человеческих моноклональных антител 12С6. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 17) и CDR3 (SEQ ID NO: 21) и указано происхождение V, D и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 3В показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 48) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 8) варибельной области лёгкой цепи человеческого моноклонального антитела 12С6. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 32) и CDR3 (SEQ ID NO: 38) и указано происхождение V и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 3С показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 49) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 9) варибельной области лёгкой цепи человеческого моноклонального антитела 12С6а. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 27), CDR2 (SEQ ID NO: 33) и CDR3 (SEQ ID NO: 39) и указано происхождение V и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 4А показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 44) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 7С8. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 18) и CDR3 (SEQ ID NO: 22) и указано происхождение V, D и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 4В показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 50) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 10) варибельной области лёгкой цепи человеческого моноклонального антитела 7С8. Определены области CDR1 (SEQ ID NO: 28), CDR2 (SEQ ID NO: 34) и CDR3 (SEQ ID NO: 40) и указано происхождение V и J сегментов зародышевой линии.

На фиг. 5 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжёлой цепи 3G8 (SEQ ID NO: 1) и 3G8а (SEQ ID NO: 1) с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 51) V_H 3-30.3 человеческой зародышевой линии (зародышевая линия JH4b раскрывается как SEQ ID NO: 59).

На фиг. 6 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области тяжёлой цепи 4D5 (SEQ ID NO: 2) с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 51) V_H 3-30.3 человеческой зародышевой линии (зародышевая линия JH4b раскрывается как SEQ ID NO: 60).

На фиг. 7 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжёлой цепи 12С6 (SEQ ID NO: 3) и 12С6а (SEQ ID NO: 2) с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 52) V_H DP44 человеческой зародышевой линии (зародышевые линии 3-7, 3-23 и JH4b раскрываются как SEQ ID NO: 61-63 соответственно).

На фиг. 8 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области тяжёлой цепи 7С8 (SEQ ID NO: 4) с аминокислотной последовательностью человеческой зародышевой линии V_H 3-30.3 (SEQ ID NO: 53) (зародышевая линия JH6b раскрывается как SEQ ID NO: 64).

На фиг. 9 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельных областей лёгкой цепи 3G8 (SEQ ID NO: 5) и 3G8а (SEQ ID NO: 6) с аминокислотной последовательностью человеческой зародышевой линии V_K L15 (SEQ ID NO: 54) (зародышевая линия JK1 раскрывается как SEQ ID NO: 65).

На фиг. 10 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области лёгкой цепи 4D5 (SEQ ID NO: 7) с аминокислотной последовательностью человеческой зародышевой линии V_K A10 (SEQ ID NO: 55) (зародышевая линия JK5 раскрывается как SEQ ID NO: 66).

На фиг. 11 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области лёгкой цепи 12С6 (SEQ ID NO: 8) с аминокислотной последовательностью человеческой зародышевой линии V_K A27 (SEQ ID NO: 56) (зародышевая линия JK2 раскрывается как SEQ ID NO: 67).

На фиг. 12 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области лёгкой цепи 12С6а (SEQ ID NO: 9) с аминокислотной последовательностью человеческой зародышевой линии V_K L15 (SEQ ID NO: 54) (зародышевая линия JK2 раскрывается как SEQ ID NO: 68).

На фиг. 13 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области лёгкой цепи 7С8 (SEQ ID NO: 10) с аминокислотной последовательностью человеческой зародышевой линии V_K L6 (SEQ ID NO: 57) (зародышевая линия JK3 раскрывается как SEQ ID NO: 69).

На фиг. 14 показаны результаты экспериментов по проточной цитометрии, демонстрирующие, что человеческое моноклональное антитело 7С8 против человеческой РТК7 связывается с клеточной поверхностью клеток НЕК3, трансфицированных с помощью полноразмерной человеческой РТК7.

На фиг. 15 показаны результаты экспериментов ELISA, демонстрирующие, что человеческие моноклональные антитела против человеческой РТК7 специфически связываются с РТК7.

На фиг. 16 показаны результаты экспериментов по проточной цитометрии, демонстрирующие, что антитела против человеческой РТК7 связываются с клеточной поверхностью клеток опухоли Вильмса.

На фиг. 17 показаны результаты экспериментов по проточной цитометрии, демонстрирующие, что антитела против человеческой РТК7 связываются с клеточной поверхностью линии раковых клеток.

На фиг. 18 показаны результаты экспериментов по проточной цитометрии, демонстрирующие, что антитела против человеческой РТК7 связываются с клеточной поверхностью дендритных клеток.

На фиг. 19 показаны результаты экспериментов по проточной цитометрии, демонстрирующие, что антитела против человеческой РТК7 связываются с CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, но не с В-лимфоцитами.

На фиг. 20 показаны результаты экспериментов по интернализации NumZap, демонстрирующие, что человеческие моноклональные антитела против человеческой РТК7 можно интернализировать в РТК7⁺ клетки:

- (А) интернализация человеческих антител 3G8, 4D5 и 7C8 в клетки опухоли Вильмса;
- (В) интернализация человеческого антитела 12С6 в клетки опухоли Вильмса;
- (С) интернализация человеческих антител 7С8 и 12С6 в опухолевые клетки А-431;
- (D) интернализация человеческих антител 7С8 и 12С6 в опухолевые клетки РС3.

На фиг. 21 показаны результаты анализа клеточной пролиферации, демонстрирующие, что конъюгированные с токсином человеческие моноклональные антитела против РТК7 убивают человеческие клеточные линии рака почки.

На фиг. 22 показаны результаты анализа клеточной пролиферации, демонстрирующие, что конъюгированные с токсином человеческие моноклональные антитела против РТК7 убивают линии клеток, экспрессирующих РТК7 с уровнями экспрессии от низкого до высокого.

На фиг. 23 показаны результаты инвазивного анализа, демонстрирующие, что антитела против РТК7 ингибируют инвазивную подвижность клеток, экспрессирующих РТК7 на клеточной поверхности.

На фиг. 24 показаны результаты *in vivo* исследования опухолевого ксенотрансплантата, демонстрирующие, что конъюгированные с токсином антитела против РТК7 замедляют прогрессирование опухоли в клетках поджелудочной железы.

На фиг. 25 показаны результаты *in vivo* исследования опухолевого ксенотрансплантата, демонстрирующие, что конъюгированные с токсином антитела против РТК7 замедляют прогрессирование опухоли в клетках молочной железы.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам, в частности к человеческим моноклональным антителам, которые связываются с РТК7. В некоторых вариантах изобретения антитела по изобретению проявляют одно или более требуемых свойств, таких как высокоаффинное связывание с РТК7 и способность ингибировать рост опухолевых клеток *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах изобретения антитела по изобретению имеют особые структурные признаки, такие как CDR области, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. Изобретение включает выделенные антитела, способы получения таких антител, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы (соединения), содержащие такие антитела, и фармацевтические композиции, содержащие антитела, иммуноконъюгаты или биспецифические соединения (молекулы) по изобретению. Изобретение относится также к способам применения антител, например, для лечения заболеваний, таких как рак.

Для того чтобы было легче понять настоящее изобретение, сначала даются определения некоторых терминов. Дополнительные определения даются по всему описанию.

Термины "РТК7" и "ССК4" применяются взаимозаменяемо (поочередно) и включают варианты, изоформы и гомологи человеческой РТК7. Соответственно, человеческие антитела по изобретению могут, в некоторых случаях, перекрестно реагировать с РТК7 других видов, отличных от человеческого. В некоторых вариантах изобретения антитела могут быть абсолютно специфическими к одной или более человеческих РТК7 и могут не проявлять разновидностей или других типов перекрестной реактивности с белками РТК7 нечеловеческого происхождения. Полная аминокислотная последовательность типичной человеческой РТК7 имеет в Genbank регистрационный номер NM_002821 (SEQ ID NO: 58).

Термин "иммунный ответ" ("иммунная реакция") относится к действию, например, лимфоцитов, антиген-презентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимым макромолекулам, продуцируемым вышеуказанными клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному поражению, деструкции или удалению из человеческого организма инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случае ауто-иммунного или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

"Путь сигнальной трансдукции" относится к биохимической зависимости между различными молекулами сигнальной трансдукции в системе сигнальной трансдукции, которые участвуют в передаче сигнала от одного участка клетки к другому участку клетки. Выражение "поверхностный клеточный рецептор" по данному описанию включает, например, молекулы и комплексы молекул, способных получать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую клеточную мембрану. Примером "поверхностного клеточного рецептора" по настоящему изобретению является рецептор РТК7.

Термин "антитело" в данном описании включает целые антитела и его любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающий участок") или одиночные цепи. "Антитело" относится к гликопро-

теину, содержащему по меньшей мере две тяжёлые (H) и две лёгкие (L) цепи, соединённые между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающий участок. Каждая тяжёлая цепь состоит из переменной области тяжёлой цепи (в данном описании изображается аббревиатурой V_H) и константной области тяжёлой цепи. Константная область тяжёлой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая лёгкая цепь состоит из переменной области лёгкой цепи (в данном описании изображается аббревиатурой V_L) и константной области лёгкой цепи. Константная область лёгкой цепи состоит из одного домена C_L . Области V_H и V_L могут далее подразделяться на области гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (гипервариабельными участками или областями) (CDR), рассеянными между более консервативными областями, называемыми каркасными (остовными, скелетными) областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трёх CDR и четырёх FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжёлой и лёгкой цепей содержат связывающий домен (домен связывания), который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные ткани иммунной системы (например, эффекторных клетки), или первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

Термин "антигенсвязывающий участок (фрагмент)" антитела (или просто "участок (фрагмент) антитела") по данному описанию относится к одному или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, РТК7). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий участок" антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_H , V_L , C_L и C_{H1} ; (ii) $F(ab')_2$ фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fab' фрагмент, который практически представляет собой Fab с участком шарнирной области (см. FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) Fd фрагмент, состоящий из V_H и C_{H1} доменов; (v) Fv фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов единичной области (плеча) антитела; (vi) dAb фрагмент (Ward et al. (1989), Nature. 341: 544-546), который состоит из V_H домена; (vii) выделенную гипервариабельную область (CDR) и (viii) нанотело, переменную область тяжёлой цепи, содержащую один переменный домен и два константных домена. Кроме того, хотя два домена Fv фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть связаны с помощью методов рекомбинантной ДНК синтетическим линкером, который позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H соединяются, образуя одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988), Science. 242: 423-426 и Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий участок (фрагмент)" антитела. Эти фрагменты антитела получают обычными методами, известными специалистам в данной области техники, и эти фрагменты подвергают скринингу на полезность таким же образом, как интактные антитела.

Предполагается, что "выделенное антитело" по данному описанию относится к антителу, практически свободному от других антител, обладающих другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывает РТК7, практически не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от РТК7). Выделенное антитело, которое специфически связывает РТК7, может, однако, проявлять перекрёстную реактивность (кросс-реактивность) к другим антигенам, таким как молекулы РТК7 другого вида. Кроме того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" по данному описанию относится к препарату молекул антитела единого молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет общую (единую) специфичность и аффинность связывания с конкретным эпитопом.

Предполагается, что термин "человеческое антитело" по данному описанию включает антитела, содержащие различные области, в которых как каркасные, так и CDR области образованы из иммуноглобулиновых последовательностей человеческой зародышевой линии. Кроме того, если антитело содержит константную область, эта константная область также образована из иммуноглобулиновых последовательностей человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако не предполагается, что термин "человеческое антитело" по данному описанию включает антитела, в которых последовательности CDR из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, "прививают" на человеческие каркасные последовательности.

Термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, проявляющим единичную (общую) специфичность связывания, имеющие переменные области, в которых как каркасные, так и CDR области образованы из иммуноглобулиновых последовательностей человеческой зародышевой линии. В одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридо-

мой, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного, отличного от человека, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжёлой цепи и трансген лёгкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" по данному описанию включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создаются или выделяются методами рекомбинантной ДНК, такие как (а) антитела, выделенные из животных (например, мыши), трансгенных или трансхромосомных в отношении генов человеческих иммуноглобулинов или полученных из них гибридом (подробнее описанных ниже); (б) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной таким образом, чтобы экспрессировать человеческое антитело, например, из трансфектомы; (в) антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки человеческих антител; и (г) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов в другие ДНК-последовательности. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные области, в которых каркасные и CDR области образованы из иммуноглобулиновых последовательностей человеческой зародышевой линии. Однако в некоторых вариантах изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела могут подвергаться *in vitro* мутагенезу (или, когда используется животное, трансгенное в отношении человеческих Ig последовательностей, *in vitro* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя образованы из последовательностей и связаны с последовательностями V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут не существовать в природе в спектре антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

Термин "изотип" по данному описанию относится к классу антител (например, IgM или IgG1), которые кодируются генами константной области тяжёлой цепи.

Выражения "антитело, узнающее (распознающее) антиген" и "антитело, специфическое к антигену" применяются в данном описании на равных правах (взаимозаменяемо) с выражением "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Выражение "производные человеческих антител (антител человека, антител человеческого происхождения)" относится к любой модифицированной форме человеческого антитела, например конъюгату антитела и другого агента или антитела.

Предполагается, что термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, в которых CDR последовательности, образованные из зародышевой линии млекопитающего другого вида, такого как мышь, встроены в ("привиты" на) человеческие каркасные последовательности. Дополнительные модификации каркасной области можно осуществить в человеческих каркасных последовательностях.

Предполагается, что термин "химерное антитело" относится к антителам, в которых последовательности переменной области образованы из одного вида, а последовательности константной области образованы из другого вида, таким как антитело, у которого последовательности переменной области происходят из мышиного антитела, а последовательности константной области происходят из человеческого антитела.

Предполагается, что выражение "специфически связывается с человеческой РТК7" по данному описанию относится к антителу, которое связывается с человеческой РТК7 с K_D 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее.

Выражение по данному описанию "практически не связывается" с белком или клеткой означает не связывается или не связывается с высокой аффинностью с белком или клеткой, а именно связывается с белком или клеткой с K_D 1×10^{-6} М или более, более предпочтительно 1×10^{-5} М или более, более предпочтительно 1×10^{-3} М или менее, ещё более предпочтительно 1×10^{-2} М или более.

Предполагается, что термин " K_{assoc} ", или " K_a ", по данному описанию относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " K_{dis} ", или " K_d ", по данному описанию относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Предполагается, что термин " K_D " по данному описанию относится к константе диссоциации, которую получают как отношение K_d к K_a (т.е. K_d/K_a), она выражается в виде молярной концентрации (М). Величины K_D для антител можно определять общепринятыми в уровне техники методами. Предпочтительный метод определения K_D антитела представляет собой поверхностный плазменный резонанс, предпочтительно с применением биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Выражение по данному описанию "высокая аффинность" для IgG антитела относится к антителу, имеющему K_D в отношении целевого антигена 10^{-8} М или менее, более предпочтительно 10^{-9} М или менее или ещё более предпочтительно 10^{-10} М или менее. Однако "высокоаффинное" связывание (связывание с "высокой аффинностью") может меняться для других изотипов антитела. Например, "высокоаффинное" связывание для изотипа IgM относится к антителу, имеющему K_D 10^{-7} М или менее, более предпочтительно 10^{-8} М или менее или ещё более предпочтительно 10^{-9} М или менее.

Термин "субъект" по данному описанию включает человека или отличного от человека животного. Выражение "отличное от человека животное" включает всех позвоночных, например млекопитающих и

немлекопитающих, таких как нечеловеческие приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, земноводные, рептилии и т.д.

Различные аспекты изобретения описаны более подробно в нижеприведённых подразделах.

Антитела против РТК7.

Антитела по изобретению характеризуются конкретными функциональными признаками или свойствами антител. Например, антитела специфически связываются с РТК7. Предпочтительно антитело по изобретению связывается с РТК7 с высокой аффинностью, например с K_D 1×10^{-7} М или менее. Антитела против РТК7 по изобретению предпочтительно обладают одной или более следующих характеристик:

(а) специфически связываются с человеческой РТК7 или

(б) связываются с клеточной линией опухоли Вильмса (ATCC Acc No. CRL-1441).

Предпочтительно антитело связывается с человеческой РТК7 с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с человеческой РТК7 с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с человеческой РТК7 с K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с человеческой РТК7 с K_D между 5×10^{-8} и 1×10^{-10} М или менее. Предпочтительно антитело связывается с клетками опухоли Вильмса с EC_{50} 4,0 нМ или менее или связывается с клетками опухоли Вильмса с EC_{50} 3,5 нМ или менее. Стандартные анализы по оценке способности антител к связыванию с РТК7 известны в уровне техники, включая, например, анализы ELISA, Вестерн-блоттинг и РИА (RIA). Кинетику связывания (например, аффинность связывания) антител также можно оценить стандартными методами анализа, известными в уровне техники, такими как анализы ELISA, Скетчарда и Висоге. Ещё один пример, антитела по настоящему изобретению могут связываться с опухолевой клеточной линией карциномы почки, например с клеточной линией опухоли Вильмса. Соответствующие анализы по оценке вышеописанных характеристик подробно описаны в примерах.

Моноклональные антитела 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8.

Предпочтительными антителами по изобретению являются человеческие моноклональные антитела 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8, выделенные и структурно охарактеризованные, как описано в примерах 1 и 2. Рядовые специалисты в данной области техники знают, что антитела 3G8 и 3G8a, а также антитела 12C6 и 12C6a имеют одинаковую последовательность тяжёлой цепи, но отличные последовательности лёгкой цепи. V_H аминокислотные последовательности 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 1 (3G8b и 3G8a), 2 (4D5), 3 (12C6 и 12C6a) и 4 (7C8). V_L аминокислотные последовательности 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 и 10 соответственно.

С учётом того что каждое из этих антител может связываться с РТК7, последовательности V_H и V_L могут быть "смешанными и соединёнными попарно (совмещающимися)", чтобы создать другие молекулы связывающих антител против РТК7 по изобретению. Связывание с РТК7 таких "смешанных и согласованных (совмещающихся, соединённых попарно)" антител можно проверять с помощью анализов связывания, описанных выше и в примерах (например, анализы ELISA). Предпочтительно, когда V_H и V_L цепи являются смешанными и совмещающимися, а V_H последовательность конкретной пары V_H/V_L заменена на сходную по структуре V_H последовательность. Аналогично, предпочтительно V_L последовательность конкретной пары V_H/V_L заменена на сходную по структуре V_L последовательность.

Соответственно, в одном аспекте изобретение включает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее в себя:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. Предпочтительные комбинации тяжёлой и лёгкой цепей включают в себя:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и (б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; или

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 3; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте изобретение предусматривает антитела, которые содержат CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой и лёгкой цепей антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 V_H антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 11 (3G8 и 3G8a), 12 (4D5), 13 (12C6 и 12C6a) и 14 (7C8). Аминокислотные последовательности CDR2 V_H антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 15 (3G8 и 3G8a), 16 (4D5), 17 (12C6 и 12C6a) и 18 (7C8). Аминокислотные последовательности CDR3 V_H антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 19 (3G8 и 3G8a), 20 (4D5), 21 (12C6 и 12C6a) и 22 (7C8). Аминокислотные последовательности CDR1 V_K антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_K антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_K антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 показаны в SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно. Области CDR изображены с применением системы Kabat (Kabat, E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

С учётом того что каждое из этих антител может связываться с РТК7 и специфичность связывания с антигеном обеспечивается, прежде всего, областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_K CDR1, CDR2 и CDR3 могут быть "смешаны и соединены попарно (спарены)" (т.е. CDR различных антител могут быть смешаны и соединены (спарены), хотя каждое антитело должно содержать V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и V_K CDR1, CDR2 и CDR3) для того, чтобы создать другие связывающие РТК7 молекулы антител против РТК7 по изобретению. Связывание РТК7 такими "смешанными и согласованными (совмещающимися, соединёнными попарно)" антителами можно проверять с помощью анализов связывания, описанных выше и в примерах (например, анализы ELISA, Biacore). Предпочтительно, когда V_H CDR последовательности являются смешанными и совмещающимися, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 конкретной последовательности V_H заменена на сходную(ые) по структуре CDR последовательность(и). Аналогично, предпочтительно V_K CDR последовательности являются смешанными и совмещающимися, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 конкретной последовательности V_K заменена на сходную(ые) по структуре CDR последовательность(и). Рядовому специалисту в данной области техники совершенно очевидно, что новые V_H и V_L последовательности можно создать, заменяя последовательности областей CDR цепей V_H и/или V_L сходными по структуре CDR последовательностями, раскрываемыми в данном описании для моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8.

Соответственно, в другом аспекте изобретение включает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент), содержащий:

(а) CDR1 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14;

(б) CDR2 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18;

(в) CDR3 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22;

(г) CDR1 вариабельной области лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28;

(д) CDR2 вариабельной области лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34;

(е) CDR3 вариабельной области лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40;

причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. В предпочтительном варианте изобретения антитело включает в себя:

(а) CDR1 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11;

(б) CDR2 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15;

(в) CDR3 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19;

(г) CDR1 вариабельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23;

(д) CDR2 вариабельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 29;

(е) CDR3 вариабельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 35.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело включает в себя:

(а) CDR1 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11;

- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 24;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 25;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 26;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33;
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело включает в себя:

- (а) CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14;
- (б) CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18;
- (в) CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22;
- (г) CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 28;
- (д) CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34; и
- (е) CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40.

В уровне техники хорошо известно, что CDR3 домен, независимо от CDR1 и/или CDR2 домена (доменов), один может определять специфичность связывания антитела с узнаваемым антигеном и что при наличии общей CDR3 последовательности можно прогнозировать получение множества антител, имеющих такую же специфичность связывания. См., например, Klimka et al., *British J. of Cancer*. 83(2): 252-260 (2000) (где описывается продуцирование гуманизованного антитела против CD30 с применением лишь CDR3 варибельного домена тяжёлой цепи мышинового антитела против CD30 Ki-4); Weiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296: 833-849 (2000) (где описываются рекомбинантные антитела к эпителиальному гликопротеину-2 (EGP-2), полученные только при использовании последовательности CDR3 тяжёлой цепи исходного мышинового антитела MOC-31 против EGP-2); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Set U.S.A.* 95: 8910-8915 (1998) (где описывается панель гуманизованных антител против интегрина $\alpha_v\beta_3$, полученная с применением CDR3 варибельного домена тяжёлой и лёгкой цепей мышинового антитела против интегрина $\alpha_v\beta_3$ LM609, причём в этом наборе антител каждое антитело, за исключением CDR3 домена, имеет отличную (отдельную) последовательность и способно связываться с тем же самым эпитопом, что и исходное мышиноое антитело, с аффинностью, такой же или более высокой, чем исходное мышиноое антитело); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116: 2161-2162 (1994) (где раскрывается, что CDR3 домен вносит (обеспечивает) наиболее значительный вклад в связывание антигена); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 2529-2533 (1995) (где описывается включение ("прививка") CDR3 последовательностей трёх Fab (SI-1, SI-40 и SI-32) против человеческой плацентарной ДНК только в тяжёлую цепь Fab против столбнячного токсина, тем самым заменяется имеющийся CDR3 тяжёлой цепи и демонстрируется, что один лишь домен CDR3 сообщает специфичность связывания); и Ditzel et al., *J. Immunol.* 157: 739-749 (1996) (где описываются исследования по "прививке", в которых переноса лишь CDR3 тяжёлой цепи исходного полиспецифического Fab LNA3 в тяжёлую цепь моносспецифического IgG, связывающего столбнячный токсин антитела Fab p313, было достаточно для сохранения специфичности связывания исходного Fab). Каждый из этих ссылочных материалов при этом вводится ссылкой в данное описание во всей полноте.

Соответственно, настоящее изобретение включает моноклональные антитела, содержащие один или более доменов CDR3 тяжёлой и/или лёгкой цепи антитела человека или отличного от человека животного, причём моноклональное антитело способно специфически связываться с РТК7. В некоторых аспектах

настоящее изобретение включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 домен тяжёлой и/или лёгкой цепи антитела нечеловеческого происхождения, такого как мышье или крысиное антитело, отличающиеся тем, что моноклональное антитело способно специфически связываться с РТК7. В некоторых вариантах изобретения такие антитела по изобретению, содержащие один или более CDR3 домен тяжёлой и/или лёгкой цепи антитела нечеловеческого происхождения, (а) способны конкурировать за связывание с соответствующим исходным нечеловеческим антителом; (б) сохраняют функциональные характеристики соответствующего исходного нечеловеческого антитела; (в) связываются с тем же эпитопом, что и соответствующее исходное нечеловеческое антитело; и/или (г) имеют аффинность связывания, аналогичную аффинности связывания соответствующего исходного нечеловеческого антитела.

В других аспектах настоящее изобретение включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 домен тяжёлой и/или лёгкой цепи человеческого антитела, такого, например, как человеческое антитело, полученное от отличного от человека животного, причём человеческое антитело способно специфически связываться с РТК7. В других аспектах настоящее изобретение включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 домен тяжёлой и/или лёгкой цепи первого человеческого антитела, такого, например, как человеческое антитело, полученное от отличного от человека животного, причём первое человеческое антитело способно специфически связываться с РТК7, и при этом CDR3 домен из первого человеческого антитела заменяет CDR3 домен в человеческом антителе, у которого отсутствует специфичность связывания с РТК7, с целью получить второе человеческое антитело, которое способно специфически связываться с РТК7. В некоторых вариантах изобретения такие антитела по изобретению, содержащие один или более CDR3 домен тяжёлой и/или лёгкой цепи первого человеческого антитела, (а) способны конкурировать за связывание с соответствующим исходным первым человеческим антителом; (б) сохраняют функциональные характеристики соответствующего исходного первого человеческого антитела; (в) связываются с тем же эпитопом, что и соответствующее исходное первое человеческое антитело; и/или (г) имеют аффинность связывания, аналогичную аффинности связывания соответствующего исходного первого человеческого антитела. В предпочтительных вариантах изобретения первое человеческое антитело представляет собой 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8.

Антитела, имеющие конкретные последовательности зародышевой линии.

В некоторых вариантах изобретения антитело по изобретению содержит варибельную область тяжёлой цепи, полученную при использовании конкретного гена зародышевой линии тяжёлой цепи иммуноглобулина и/или варибельную область лёгкой цепи, полученную при использовании конкретного гена зародышевой линии лёгкой цепи иммуноглобулина.

Например, в предпочтительном варианте изобретение включает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_H 3-30.3, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. В другом предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_H DP44, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. В другом предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_H 3-33, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. Ещё в одном предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область лёгкой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_K L15, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. Ещё в одном предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область лёгкой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_K A10, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. Ещё в одном предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область лёгкой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_K A27, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. Ещё в одном предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) варибельную область лёгкой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_K L6, причём антитело специфически связывает РТК7, предпочтительно человеческую РТК7. Ещё в одном предпочтительном варианте изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, отличающееся тем, что это антитело:

(а) содержит вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_H 3-30.3, DP44 или 3-33 (этот ген кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, 52 или 53 соответственно);

(б) содержит вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом, или образована при использовании, человеческого гена V_K L15, A10, A27 или L6 (этот ген кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, 55, 56 или 57 соответственно); и

(в) специфически связывается с РТК7.

Примерами антител, имеющих V_H и V_K из V_H 3-30.3 и V_K L15 соответственно, являются 3G8 и 3G8a. Примером антитела, имеющего V_H и V_K из V_H 3-30.3 и V_K A10 соответственно, является 4D5. Примером антитела, имеющего V_H и V_K из V_H DP44 и V_K A27 соответственно, является 12C6. Примером антитела, имеющего V_H и V_K из V_H DP44 и V_K L15 соответственно, является 12C6. Примером антитела, имеющего V_H и V_K из V_H 3-33 и V_K L6 соответственно, является 7C8.

По данному описанию человеческое антитело содержит вариабельные области тяжёлой или лёгкой цепи, которые являются "продуктом" или "образованы при использовании" конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные области антитела получены с помощью системы, которая использует гены зародышевой линии человеческого иммуноглобулина. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены человеческого иммуноглобулина, представляющим интерес антигеном или скрининг библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов с помощью фагового дисплея с представляющим интерес антигеном. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "образовано при использовании" последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, можно идентифицировать как таковое, сравнивая аминокислотную последовательность человеческого антитела с аминокислотными последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов и выбирая человеческую последовательность зародышевой линии иммуноглобулина, которая является наиболее близкой по последовательности (т.е. с наибольшим % идентичности) с последовательностью человеческого антитела. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "образовано при использовании" конкретной последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, может иметь аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии вследствие, например, природных соматических мутаций или прицельной сайт-направленной мутации. Однако выбранное человеческое антитело имеет последовательность, как правило, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, и содержит аминокислотные остатки, которые позволяют идентифицировать человеческое антитело как являющееся человеческим при сравнении с аминокислотными последовательностями зародышевой линии иммуноглобулинов другого вида (например, последовательностями мышинной зародышевой линии). В некоторых случаях человеческое антитело может иметь аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина. Обычно человеческое антитело, образованное при использовании конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, выявляет не более 10 различий аминокислот от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может иметь (выявлять) не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 различия в аминокислотах от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина.

Гомологичные антитела.

Ещё в одном варианте изобретения антитело по изобретению содержит вариабельные области тяжёлой и лёгкой цепей, включающие аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям предпочтительных антител по данному описанию, и при этом антитела сохраняют заданные (нужные) функциональные свойства антител против РТК7 по изобретению.

Например, изобретение включает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент), содержащее(ий) вариабельную область тяжёлой цепи и вариабельную область лёгкой цепи, где:

(а) вариабельная область тяжёлой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4;

(б) вариабельная область лёгкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 и 10; и

антитело проявляет одно или более из следующих свойств:

(в) связывается с человеческой РТК7 с K_D 1×10^{-7} М или менее;

(г) связывается с линией клеток опухоли Вильмса.

В других вариантах изобретения V_H или V_L аминокислотные последовательности могут быть на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичны последовательностям, представленным выше. Антитело, содержащее V_H или V_L области, имеющие высокую (а именно, 80% или выше) гомологию с V_H или V_L облас-

тиями представленных выше последовательностей, можно получать мутагенезом (например, сайт-направленным или ПЦР-опосредованным мутагенезом) нуклеотидных молекул, кодирующих SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50, с последующим тестированием кодированного изменённого антитела на сохранённую функцию (а именно, функции, представленные выше, в пп. (в) и (г)) с применением функциональных анализов по данному описанию.

По данному описанию выраженная в процентах гомология между двумя аминокислотными последовательностями эквивалентна выраженной в процентах идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии = число (#) идентичных положений/общее число (#) положений \times 100), учитывающую число гэпов, и протяжённость каждого гэпа, которые следует ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнять, используя математический алгоритм, как описано в неограничивающих примерах, представленных ниже.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с помощью алгоритма Ю. Майерса и В. Миллера (E. Meyers and W. Miller. *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)), который включён в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять, используя алгоритм Нидльмана и Вунша (Needleman and Wunsch. *J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)), который включён в программу GAP в пакете программ GCG (представленном на сайте www.gcg.com), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250 и средневзвешенное гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и средневзвешенное длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Помимо этого или в качестве альтернативы, белковые последовательности по настоящему изобретению можно далее использовать в качестве "запрашиваемой последовательности" для проведения поиска в общих базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такой поиск можно осуществлять, используя программу XBLAST (вариант 2.0) (Altschul, et al. (1990). *J. Mol. Biol.* 215: 403-10). BLAST поиск белков можно проводить, используя программу XBLAST, количественный показатель = 50, длину слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам антитела по изобретению. Для проведения выравнивания с гэпами (промежутками) с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). (См. www.ncbi.nlm.nih.gov).

Антитела с консервативными модификациями.

В некоторых вариантах изобретения антитело по изобретению содержит переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, причём одна или более этих CDR последовательностей содержит заданные аминокислотные последовательности на основе предпочтительных антител по данному описанию (например, 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8) или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют нужные функциональные свойства антител против РТК7 по изобретению. Соответственно, изобретение предусматривает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент), содержащее(ий) переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, где:

(а) последовательность CDR3 переменной области тяжёлой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22 и их консервативных модификаций;

(б) последовательность CDR3 переменной области лёгкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 и их консервативных модификаций;

и антитело проявляет одно или более из следующих свойств:

(в) специфически связывается с человеческой РТК7;

(г) связывается с линией клеток опухоли Вильмса (ATCC Acc No. CRL-1441).

В предпочтительном варианте изобретения последовательность CDR2 переменной области тяжёлой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18 и их консервативных модификаций; а последовательность CDR2 переменной области лёгкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34 и их консервативных модификаций. В другом предпочтительном варианте изобретения последовательность CDR1 переменной области тяжёлой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14 и их консервативных модификаций; а последовательность CDR1 переменной области лёгкой цепи со-

держит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28 и их консервативных модификаций.

Предполагается, что выражение "консервативные модификации последовательностей" относится к аминокислотным модификациям, которые незначительно влияют или изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно вводить в антитело по изобретению стандартными методами, известными в уровне техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком с аналогичной (сходной) боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные аминокислотные боковые цепи, охарактеризованы в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), разветвлённые в бета-положении боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в CDR областях антитела по изобретению могут быть заменены на другие аминокислотные остатки семейства с такой же боковой цепью, и изменённое антитело можно проверить на сохранённую функцию (а именно, функции, представленные выше, в пп. (в) и (г)) с помощью функциональных анализов по данному описанию.

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом, как антитела против РТК7 по изобретению.

В другом варианте изобретение предусматривает антитела, которые связываются с тем же эпитопом на человеческой РТК7, что любые другие моноклональные антитела к РТК7 по изобретению (т.е. антитела, которые обладают способностью перекрёстно конкурировать за связывание с РТК7 с любыми моноклональными антителами по изобретению). В предпочтительных вариантах изобретения эталонное антитело для исследований перекрёстной конкуренции может являться моноклональным антителом 3G8 (имеющим V_H и V_L последовательности, показанные в SEQ ID NO: 1 и 5 соответственно), или моноклональным антителом 3G8a (имеющим V_H и V_L последовательности, показанные в SEQ ID NO: 1 и 6 соответственно), или моноклональным антителом 4D5 (имеющим V_H и V_L последовательности, показанные в SEQ ID NO: 2 и 7 соответственно), или моноклональным антителом 12C6 (имеющим V_H и V_L последовательности, показанные в SEQ ID NO: 3 и 8 соответственно), или моноклональным антителом 12C6a (имеющим V_H и V_L последовательности, показанные в SEQ ID NO: 3 и 9 соответственно), или моноклональным антителом 7C8 (имеющим V_H и V_L последовательности, показанные в SEQ ID NO: 4 и 10 соответственно). Такие перекрёстно-конкурирующие (конкурентные) антитела можно идентифицировать на основании их способности перекрёстно конкурировать с 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8 в стандартных анализах связывания РТК7. Например, анализ Вiasore, анализы ELISA или проточную цитометрию можно использовать для демонстрации перекрёстной конкуренции с антителами по настоящему изобретению. Способность испытуемого антитела ингибировать связывание, например, 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8 с человеческой РТК7 демонстрирует, что испытуемое антитело может конкурировать с 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8 за связывание с человеческой РТК7 и, следовательно, связывается с тем же самым эпитопом на человеческой РТК7, что и 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8. В предпочтительном варианте изобретения антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом на человеческой РТК7, что и 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8, представляет собой человеческое моноклональное антитело. Такие человеческие моноклональные антитела можно получать и выделять, как описано в примерах.

Генно-инженерные (рекомбинантные) и модифицированные антитела.

Помимо этого, антитело по изобретению можно получать, используя антитело, имеющее V_H и/или V_L последовательности, раскрываемые в данном описании, в качестве исходного материала для создания модифицированного антитела, причём это модифицированное антитело может иметь изменённые свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно создать (сконструировать), модифицируя один или более остатков в одной или в обеих переменных областях (т.е. в V_H и/или V_L), например в одной или более CDR областей, и/или в одной или более каркасных областях. Кроме того или в качестве альтернативы, антитело можно создать, модифицируя остатки в константной (константных) области (областях), например, с целью изменения эффекторной (эффекторных) функции (функций) антитела.

Одним из способов создания переменной области, который можно осуществлять, является "CDR прививка". Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно за счёт аминокислотных остатков, локализованных в шести гипервариабельных областях (CDR) тяжёлой и лёгкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности внутри CDR более различаются между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Так как последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антиген-антитело, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые

имитируют свойства специфических природных антител, конструируя векторы экспрессии, которые включают CDR последовательности специфического природного антитела, привитые на каркасные последовательности другого антитела с отличающимися свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998), *Nature*. 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986), *Nature*. 321: 522-525; Queen, C. et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033; патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

Соответственно, другой вариант изобретения относится к выделенному моноклональному антителу, или его антигенсвязывающему участку (фрагменту), содержащему варибельную область тяжёлой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14, SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18 и SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22 соответственно, и варибельную область лёгкой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34 и SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно. Таким образом, такие антитела содержат V_H и V_L CDR последовательности моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8, но ещё могут содержать различные каркасные последовательности этих антител.

Такие каркасные последовательности можно получать из общих баз данных ДНК или опубликованных ссылочных материалов, которые включают последовательности гена зародышевой линии антитела. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для человеческих генов варибельной области тяжёлой и лёгкой цепей можно найти в базе данных последовательности человеческой зародышевой линии "VBase" (на сайте в Интернете www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992), "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops". *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; и Cox, J.P.L. et al. (1994), "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage". *Eur. J. Immunol.* 24: 827-836; содержание каждого из этих ссылочных материалов однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки. Другой пример, последовательности ДНК зародышевой линии для человеческих генов варибельной области тяжёлой и лёгкой цепей можно найти в базе данных Genbank. Например, следующие последовательности зародышевой линии тяжёлой цепи, найденные у мыши HCo7 HuMAb, доступны в Genbank под следующими номерами: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 и BC070333), 3-33 (NG_0010109 и NT_024637) и 3-7 (NG_0010109 и NT_024637). Другой пример, следующие последовательности зародышевой линии тяжёлой цепи, найденные у мыши HCo12 HuMAb, доступны в Genbank под следующими номерами: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 и BC070333), 5-51 (NG_0010109 и NT_024637), 4-34 (NG_0010109 и NT_024637), 3-30.3 (?) и 3-23 (AJ406678).

Белковые последовательности антител сравнивают с собранной базой данных последовательностей белков, используя один из методов поиска сходства последовательностей, называемый Gapped BLAST (Altschul et al. (1997). *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402), хорошо известный специалистам в данной области техники. BLAST представляет собой эвристический алгоритм в том смысле, что статистически значимое выравнивание между последовательностью антитела и последовательностью из базы данных, по-видимому, содержит пары сегментов с максимальным сходством (HSP) выравненных слов. Пары сегментов, показатели которых нельзя улучшить расширением или уменьшением, называются попадание (hit). Коротко говоря, нуклеотидные последовательности, взятые из VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>), транслируют и область между и включая каркасную область от FR1 до FR3 сохраняют. Последовательности из базы данных имеют среднюю длину 98 оснований. Идентичные последовательности (дубликаты), которые являются точным повторением по всей длине белка, удаляются. BLAST поиск белков с применением программы blastp с характеристиками по умолчанию, стандартными параметрами, за исключением фильтра участков кода пониженной сложности, который выключен, и матрицы замен BLOSUM62, фильтрует максимальные 5 попаданий (hit), дающих совпадения последовательностей. Нуклеотидные последовательности транслируются во всех шести рамках считывания, и рамка, в которой отсутствует стоп-кодон в соответствующем (парном) сегменте последовательности из базы данных, рассматривается как возможное попадание (hit). В свою очередь, это подтверждают, используя BLAST программу tblastx, которая позволяет транслировать последовательность антитела во всех шести рамках считывания и сравнивает эти трансляции с VBASE нуклеотидными последовательностями, динамически транслируемыми во всех шести рамках считывания.

Идентичности (тождества) представляют собой точные совпадения аминокислот последовательности антитела и белка из базы данных по всей длине последовательности. Позитивности (тождества + совпадающая замена ("под пару")) не являются идентичными, но при аминокислотных заменах руководствуются матрицей замен BLOSUM62. Если последовательность антитела совпадает с двумя из последовательностей из базы данных с одинаковой идентичностью, решают, что попадание (hit) с наибольшими позитивами является соответствующим попаданием (hit) последовательности.

Предпочтительными каркасными последовательностями для применения в антителах по изобретению являются такие последовательности, которые сходны по структуре с каркасными последовательностями

стями, используемые выбранными антителами по изобретению, сходными, например, с каркасными последовательностями V_H 3-30.3 (SEQ ID NO: 51), и/или с каркасными последовательностями V_H DP44 (SEQ ID NO: 52), и/или с каркасными последовательностями V_H 3-33 (SEQ ID NO: 53), и/или с каркасными последовательностями V_K L15 (SEQ ID NO: 54), и/или с каркасными последовательностями V_K A10 (SEQ ID NO: 55), и/или с каркасными последовательностями V_K L15 (SEQ ID NO: 54), и/или с каркасными последовательностями V_K A27 (SEQ ID NO: 56), и/или с каркасными последовательностями V_K L15 (SEQ ID NO: 54), и/или с каркасными последовательностями V_K L6 (SEQ ID NO: 57), используемыми в предпочтительных моноклональных антителах по изобретению. CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 цепи V_K можно привить на каркасные области, в которых имеется последовательность, идентичная последовательности в гене иммуноглобулина зародышевой линии, при использовании которого получают каркасную последовательность, или CDR последовательности можно привить на каркасные области, которые содержат одну или более мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, найдено, что в некоторых случаях предпочтительно осуществлять мутацию остатков в каркасных областях для того, чтобы сохранить или повысить антигенсвязывающую способность антитела (см., например, патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в V_H и/или V_K областях CDR1, CDR2 и/или CDR3, чтобы тем самым улучшить одно или более свойств связывания (например, аффинность) представляющего интерес антитела. Сайт-направленный мутагенез ПЦР-опосредованного мутагенеза можно осуществлять для введения мутации(й) и воздействия на связывание антитела или другое представляющее интерес функциональное свойство можно определять в *in vitro* или *in vivo* анализах, представленных в данном описании и приведённых в примерах. Предпочтительно вводятся консервативные модификации (обсуждаемые выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции, но предпочтительно они представляют собой замены. Кроме того, обычно в CDR области меняется не более одного, двух, трёх, четырёх или пяти остатков.

Соответственно, в другом варианте изобретение предусматривает выделенные моноклональные антитела против РТК7 или их антигенсвязывающие участки, содержащие вариабельную область тяжёлой цепи, включающую:

(а) V_H CDR1 область, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14;

(б) V_H CDR2 область, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18;

(в) V_H CDR3 область, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22;

(г) V_K CDR1 область, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28;

(д) V_K CDR2 область, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34; и

(е) V_K CDR3 область, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 35, 36, 37; 38, 39 и 40.

Созданные генной инженерией (рекомбинантные) антитела по изобретению включают антитела, в которых сделаны модификации в каркасных остатках в V_H и/или V_K , например, с целью улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации в каркасной области совершают с целью понизить иммуногенность антитела. Например, один подход заключается в том, чтобы "мутировать обратно" один или более каркасных остатков в соответствующие остатки последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое претерпело соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой образовано антитело. Такие остатки можно идентифицировать, сравнивая каркасные последовательности антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой образовано антитело.

Например, в случае 3G8 (и 3G8a) аминокислотный остаток #28 (в FR1) V_H представляет собой изолейцин, тогда как этот остаток в соответствующей последовательности зародышевой линии V_H 3-30.3 представляет собой треонин. Чтобы вернуть последовательности каркасной области в конфигурацию их зародышевой линии, соматическую мутацию можно "обратно мутировать" в последовательность зародышевой линии, например, сайт-направленным мутагенезом или ПЦР-опосредованным мутагенезом (например, остаток #28 FR1 V_H 3G8 (и 3G8a) можно "обратно мутировать" из изолейцина в треонин).

Другой пример, в случае 12С6 (и 12С6а) аминокислотный остаток #44 (в FR2) V_H представляет собой треонин, тогда как этот остаток в соответствующей последовательности зародышевой линии V_H DP44 представляет собой глицин. Чтобы вернуть последовательности каркасной области в конфигурацию их зародышевой линии, например, остаток #44 (остаток #9 FR2) V_H 12С6 (и 12С6а) можно "обратно мутировать" из треонина в глицин. Предполагается, что такие антитела с "обратной мутацией" также охватываются изобретением.

Другой тип каркасной модификации включает мутацию одного или более остатков в каркасной области или даже внутри одной или более CDR областей для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы тем самым понизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот метод также называют "деиммунизацией", подробнее он описан в опубликованной патентной заявке США № 20030153043 Carr et al.

Помимо или вместо модификаций внутри каркасных или CDR областей, можно сконструировать антитела по изобретению таким образом, чтобы они включали модификации внутри Fc области, обычно, чтобы изменить одно или более функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, Fc-рецепторное связывание и/или антиген(тело?)зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело по изобретению может быть химически модифицированным (например, к антителу могут быть присоединены одна или более химических частиц) или модифицированным таким образом, чтобы изменить его гликозилирование, чтобы снова изменить одно или более функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов изобретения подробнее описан ниже. Нумерация остатков в Fc области соответствует EU индексу Kabat.

В одном варианте изобретения шарнирная область C_{H1} модифицируется таким образом, что число цистеиновых остатков в шарнирной области меняется, например увеличивается или уменьшается. Этот метод подробнее описан в патенте США № 4677425 Bodmer et al. Число цистеиновых остатков в шарнирной области меняется, например, для того, чтобы упростить сборку лёгкой и тяжёлой цепей или повысить или понизить стабильность антитела.

В другом варианте изобретения мутация в Fc шарнирной области антитела понижает биологический период полужизни антитела. Более конкретно, одна или более мутаций аминокислот вводят в область контакта (раздела) домена CH2-CH3 Fc-шарнирного фрагмента таким образом, чтобы ослаблялось связывание антитела с белком Staphylococcal A (SpA) по сравнению со связыванием нативного Fc-шарнирного домена SpA. Этот метод подробнее описан в патенте США № 6165745 Ward et al.

В другом варианте изобретения антитело модифицируют с целью повысить его биологический период полужизни. Возможны различные подходы. Например, могут быть введены одна или более следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375, выданном Ward. Или же для повышения биологического периода полужизни антитела можно изменять в C_{H1} или C_L области таким образом, чтобы оно содержало эпитоп, связывающий salvage рецептор (рецептор-"утилизатор"), причём этот эпитоп взят из двух петель CH2 домена Fc области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 Presta et al.

В других вариантах изобретения Fc область изменяют, заменяя по меньшей мере один аминокислотный остаток на другой аминокислотный остаток с целью изменения эффекторной(ых) функции(ий) антитела. Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить на другой аминокислотный остаток таким образом, что антитело будет обладать изменённой аффинностью к эффекторному лиганду, но сохранит антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяется, может представлять собой Fc-рецептор или C1 компонент комплемента. Этот метод описан подробнее в патентах США № 5624821 и 5648260, оба принадлежат Winter et al.

В другом примере одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменить на другой аминокислотный остаток таким образом, что антитело будет проявлять изменённое связывание C1q и/или пониженную или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) или не иметь её совсем. Этот метод подробнее описан в патенте США № 6194551, выданном Idusogie et al.

В другом примере один или более аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231 и 239 изменяют, чтобы при этом изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот метод подробнее описан в опубликованной заявке PCT WO 94/29351 Bodmer et al.

Ещё в одном примере Fc область модифицируют с целью повышения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ, ADCC) и/или с целью повышения аффинности антитела к Fc γ -рецептору, модифицируя одну или более аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330,

331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Этот метод подробнее описан в опубликованной заявке РСТ WO 00/42072 Presta. Кроме того, сайты связывания на человеческом IgG1 с FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn картированы и варианты с повышенным связыванием описаны (см. Shields, R.L. et al. (2001), *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604). Было показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, было показано, что следующие комбинированные мутанты повышают связывание с FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

Ещё в одном варианте изобретения модифицируется гликозилирование антитела. Например, можно получать агликозилированное антитело (т.е. антитело, не имеющее гликозилирования). Гликозилирование можно изменять с целью, например, повысить аффинность антитела к антигену. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, изменяя один или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно сделать одну или более аминокислотных замен, которые вызывают элиминирование одного или более каркасных сайтов гликозилирования варибельной области, тем самым отменяют гликозилирование по этому сайту. Такое гликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Этот метод подробнее описан в патентах США № 5714350 и 6350861 Co et al.

Кроме того или вместо того, можно получать антитело, которое имеет изменённый тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, содержащее уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее повышенное содержание GlcNac структур с бисекторными плоскостями. Показано, что такие изменённые паттерны гликозилирования повышают ADCC способность антител. Такие модификации углеводов можно выполнять, например экспрессируя антитело в клетке-хозяине с изменённым механизмом гликозилирования. Клетки с изменённым механизмом гликозилирования описаны в уровне техники и их можно использовать в качестве клеток-хозяев для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению и, тем самым, для продуцирования антитела с изменённым гликозилированием. Например, в линиях клеток Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (альфа (1,6) фукозилтрансфераза), так что в углеводах антител, экспрессируемых в Ms704, Ms705 и Ms709 клеточных линиях, отсутствует фукоза. Линии клеток Ms704, Ms705 и Ms709 FUT8^{-/-} были созданы целевой дизрупцией (разрывом) гена FUT8 в CHO/DG44 клетках с применением двух векторов замен (см. опубликованную патентную заявку США № 20040110704, принадлежащую Yamane et al. and Yamane-Ohnuki et al. (2004), *Biotechnol Bioeng.* 87: 614-22). Другой пример, в Европейском патенте EP 1176195, выданном Hanai et al., описывается линия клеток с разорванным FUT8 геном, который кодирует фукозилтрансферазу, так что в антителах, экспрессированных в такой линии клеток, наблюдается гипофукозилирование за счёт уменьшения или элиминирования фермента, относящегося к ферменту с альфа-1,6-связью. Hanai et al. описывают также линии клеток с низкой ферментной активностью в отношении присоединения фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc областью антитела, или не проявляет ферментной активности, например, в отношении линии клеток крысиной миеломы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В опубликованной заявке РСТ WO 03/035835 Presta описывает вариант CHO клеточной линии, клетки Lec13, с пониженной способностью связывать фукозу с Asn(297)-связанными углеводами, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессированных в такой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 272: 26733-26740). В опубликованной заявке РСТ WO 99/54342 Umana et al. описывают клеточные линии, созданные генной инженерией для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что у антител, экспрессированных в созданных клеточных линиях, наблюдаются повышенные бисекторные GlcNac структуры, которые вызывают повышенную ADCC антител (см. также Umana et al. (1999), *Nat. Biotech.* 17: 176-180). Или же остатки фукозы от антитела можно отщеплять, используя фермент фукозидазу. Например, фукозидаза альфа-L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител (Tarentino, A.L. et al. (1975), *Biochem.* 14: 5516-23).

Другой модификацией антител по данному описанию, которая рассматривается изобретением, является пэгилирование. Антитело можно пэгилировать, например, для повышения биологического (например, в сыворотке) периода полужизни антитела. Обычно для пэгилирования антитело или его фрагмент реагирует с полиэтиленгликолем (ПЭГ, PEG), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегид ПЭГ, в условиях, в которых одна или более групп ПЭГ связывается с антителом или фрагментом антитела. Предпочтительно пэгилирование проводят с помощью реакции ацилирования или алкилирования реакционноспособной молекулы ПЭГ (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Предполагается, что термин "полиэтиленгликоль" по данному описанию охватывает любую форму ПЭГ (PEG), которая используется для дериватизации других белков, такую как моно (C₁-C₁₀)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. В некоторых вариантах изобретения пэгилируемое антитело представляет собой агликозилированное антитело. Способы пэгилирования белков известны в уровне техники и могут быть применены к антителам по изобретению. См., например, Европейский патент EP 0154316, выданный Nishimura et al. и EP 0401384, выданный Ishikawa et al.

Физические свойства антител.

Антитела по настоящему изобретению можно подробнее характеризовать различными физическими свойствами антител против РТК7. С учётом этих физических свойств для обнаружения и/или установления различия разных классов антител можно применять различные методы анализа.

В некоторых вариантах антитела по настоящему изобретению могут содержать один или более сайтов гликозилирования в вариабельной области либо лёгкой, либо тяжёлой цепи. Наличие одного или более сайтов гликозилирования в вариабельной области может привести к повышенной иммуногенности антитела или изменению рК антитела вследствие изменения связывания с антигеном (Marshall et al. (1972), *Annu. Rev. Biochem.* 41: 673-702; Gala F.A. and Morrison S.L. (2004), *J. Immunol.* 172: 5489-94; Wallick et al. (1988), *J. Exp. Med.* 168: 1099-109; Spiro R.G. (2002), *Glycobiology.* 12: 43R-56R; Parekh et al. (1985), *Nature.* 316: 452-7; Mimura et al. (2000), *Mol. Immunol.* 37: 697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. Гликозилирование вариабельной области можно проверять, используя анализ Glycoblot, в ходе которого антитело расщепляют, получая Fab, а затем тестируют на гликозилирование, используя анализ, в котором определяют окисление периодатом и образование основания Шиффа. Или же гликозилирование вариабельной области можно определять жидкостной хроматографией на системе Dionex (Dionex-LC), в ходе которой сахараиды из Fab расщепляют до моносахаридов и анализируют содержание отдельного сахараида. В некоторых примерах предпочтительно иметь антитело против РТК7, которое не содержит гликозилирования вариабельной области. Этого можно достичь либо отбором антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариабельной области, либо мутацией остатков в мотиве гликозилирования стандартными методами, общеизвестными в уровне техники.

В предпочтительном варианте антитела по настоящему изобретению не содержат сайтов изомеризации (isomerism?) аспарагина. Деамидирование или эффект изоаспарагиновой кислоты может осуществляться на последовательностях N-G и D-G соответственно. Деамидирование или эффект изоаспарагиновой кислоты приводит к образованию изоаспарагиновой кислоты, которая понижает стабильность антитела за счёт образования изогнутой (изломанной) структуры скорее у карбоксиконца боковой цепи, нежели главной цепи. Образование изоаспарагиновой кислоты можно определять (измерять) с помощью количественного анализа с применением обращённо-фазовой ВЭЖХ для тестирования изоаспарагиновой кислоты.

Каждое антитело имеет единственную изоэлектрическую точку (pI), но обычно антитела попадают в интервал рН между 6 и 9,5; pI для антитела IgG1 обычно попадает в интервал рН 7-9,5, а pI для антитела IgG4 обычно попадает в интервал рН 6-8. Антитела могут иметь pI вне этого интервала. Хотя эффекты обычно неизвестны, имеется предположение, что антитела с pI вне нормального интервала могут проявлять в условиях *in vivo* некоторое раскручивание и нестабильность. Изоэлектрическую точку можно определять методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ), который формирует градиент рН, а для повышенной точности можно использовать лазерное фокусирование (Janini et al. (2002), *Electrophoresis.* 23: 1605-11; Ma et al. (2001), *Chromatographia.* 53: S75-89; Hunt et al. (1998), *J. Chromatogr. A* 800: 355-67). В некоторых примерах предпочтительно иметь антитело против РТК7, имеющее значение pI, попадающее в нормальный интервал. Этого можно достичь либо отбором антител с pI в нормальном интервале, либо мутацией заряженных остатков на поверхности стандартными методами, хорошо известными в уровне техники.

Каждое антитело имеет температуру плавления, которая является показателем термической стабильности (Krishnamurthy R. and Manning M.C. (2002), *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3: 361-71). Более высокая термическая стабильность указывает на более высокую общую стабильность *in vivo*. Температуру плавления антитела можно определять такими методами, как дифференциальная сканирующая калориметрия (Chen et al. (2003), *Pharm. Res.* 20: 1952-60; Ghirlando et al. (1999), *Immunol. Lett.* 68: 47-52). T_{M1} указывает температуру начального раскручивания антитела; T_{M2} указывает температуру полного раскручивания антитела. Обычно предпочтительно чтобы T_{M1} антитела по настоящему изобретению была выше 60°C, предпочтительно выше 65°C, ещё более предпочтительно выше 70°C. Или же термическую стабильность антитела можно определять методом кругового дихроизма (Murray et al. (2002), *J. Chromatogr. Sci.* 40: 343-9).

В предпочтительном варианте изобретения выбирают антитела, которые не разлагаются быстро. Фрагментацию антитела против РТК7 можно измерять с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS, хорошо изученных в уровне техники (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995), *Anal. Chem.* 67: 3626-32).

В другом предпочтительном варианте изобретения выбирают антитела, которые имеют минимальные эффекты агрегации. Агрегация может привести к запуску нежелательного иммунного ответа и/или изменённых или нежелательных фармакокинетических свойств. Обычно антитела являются приемлемыми с агрегацией 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, ещё более предпочтительно 15% или менее, ещё более предпочтительно 10% или менее и ещё более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию можно измерять несколькими методами, хорошо известными в уровне техники, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на колонке для гель-проникающей хроматографии

(SEC) и рассеяние света, для идентификации мономеров, димеров, тримеров или мультимеров.

Методы создания (генной инженерией) антител.

Как обсуждается выше, антитела против РТК7, имеющие V_H и V_K последовательности, раскрываемые в данном описании, можно использовать для создания новых антител против РТК7, модифицируя V_H и/или V_K последовательности или связанную(ые) с ними константу(ые) область(и). Поэтому в другом аспекте изобретения структурные признаки антитела против РТК7 по изобретению, например 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8, используют для создания родственных по структуре антител против РТК7, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител по изобретению, такое как связывание с человеческим РТК7. Например, одну или более областей CDR антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8 или их мутации можно объединять методами рекомбинантной ДНК с известными каркасными областями и/или другими CDR для создания дополнительных рекомбинантных антител против РТК7 по изобретению, обсуждаемых выше. Исходным материалом для метода генной инженерии является одна или более последовательностей V_H и/или V_K по данному описанию или одна или более их CDR областей. Для создания рекомбинантного (генно-инженерного) антитела нет необходимости фактически получить (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или более V_H и/или V_K последовательностей по данному описанию или одну или более их CDR областей. Скорее информацию, содержащуюся в последовательности(ях), используют в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) "второго поколения", образованной(ых) из первоначальной(ых) последовательности(ей), а затем получают последовательность(и) "второго поколения" и экспрессируют в виде белка.

Поэтому в другом варианте изобретение предусматривает способ получения антитела против РТК7, включающий:

(а) предоставление (получение): (i) последовательности вариабельной области тяжёлой цепи антитела, содержащей CDR1 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14, CDR2 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18, и/или CDR3 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22; и/или (ii) последовательности вариабельной области лёгкой цепи антитела, содержащей CDR1 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, CDR2 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34, и/или CDR3 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40;

(b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в вариабельной области тяжёлой цепи антитела и/или в вариабельной области лёгкой цепи антитела с целью создания по меньшей мере одной изменённой последовательности антитела;

(c) экспрессию изменённой последовательности антитела в виде белка.

Для получения и экспрессии последовательности изменённого антитела можно применять обычные методы молекулярной биологии.

Предпочтительно антитело, кодируемое последовательностью(ями) изменённого антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, некоторые или все из функциональных свойств антител против РТК7 по данному описанию, причём эти функциональные свойства включают, но без ограничения:

(а) антитело связывается с человеческим РТК7 с K_D 1×10^{-7} М или менее;

(б) антитело связывает линию клеток опухоли Вильмса.

Функциональные свойства изменённых антител можно оценивать стандартными анализами, имеющимися в уровне техники и/или представленными в данном описании, такими, которые приводятся в примерах (например, проточная цитометрия, анализы связывания).

В некоторых вариантах способов получения антител с помощью генной инженерии (рекомбинантной ДНК) мутации можно вводить случайно (произвольно) или селективно по всей последовательности или на части последовательности, кодирующей антитело против РТК7, и полученные модифицированные антитела против РТК7 можно подвергать скринингу на активность связывания и/или другие функциональные свойства по данному описанию. Методы мутации описаны в уровне техники. Например, в опубликованной заявке РСТ WO 02/092780 Short описывает методы создания и скрининга мутаций в антителе с помощью насыщающего мутагена, синтетической сборки сшиванием (лигированием) или их комбинацией. Или же в опубликованной заявке РСТ WO 03/074679, принадлежащей Lazar et al., описывается применение методов компьютерного скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

Нуклеотидные молекулы, кодирующие антитела по изобретению.

Другой аспект изобретения относится к нуклеотидным молекулам, которые кодируют антитела по изобретению. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточных лизатах или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "практически чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, включая обработку щелочным SDS, центрифугирование с $CsCl_2$, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном

геле и другие общеизвестные методы. См. F. Ausubel, et al., ed. (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота по изобретению может представлять собой, например, ДНК, РНК и может содержать или может не содержать интронные последовательности. В предпочтительном варианте изобретения нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты по изобретению можно получать обычными методами молекулярной биологии. В случае антител, экспрессированных в гибридомах (например, гибридомах, полученных от трансгенных мышей, несущих гены человеческого иммуноглобулина, подробнее описанные ниже), кДНК, кодирующие лёгкую и тяжёлую цепи антитела, полученного при использовании гибридомы, можно получать обычными методами ПЦР-амплификации или кДНК клонирования. В случае антител, полученных при использовании библиотеки генов иммуноглобулинов (например, методом фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно получать из библиотеки.

Предпочтительными нуклеиновыми кислотами по изобретению являются такие нуклеиновые кислоты, которые кодируют V_H и V_L последовательности моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a или 7C8. Последовательности ДНК, кодирующие V_H последовательности моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8, показаны в SEQ ID NO: 41 (3G8 и 3G8a), 42 (4D5), 43 (12C6 и 12C6a) и 44 (7C8). Последовательности ДНК, кодирующие V_L последовательности моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8, показаны в SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50 соответственно.

Когда получены фрагменты ДНК, кодирующие сегменты V_H и V_L , эти фрагменты ДНК можно далее обрабатывать стандартными методами рекомбинантной ДНК, например превращать гены варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены фрагмента Fab или в ген scFv. В ходе этой обработки фрагмент ДНК, кодирующий V_L или V_H , функционально связывается с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Предполагается, что выражение "функционально связанный" в данном контексте означает, что два фрагмента ДНК связываются таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую V_H область, можно превратить в полноразмерный ген тяжёлой цепи функциональным связыванием ДНК, кодирующей V_H , в другую ДНК, кодирующую константные области тяжёлой цепи (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Последовательности генов константных областей человеческой тяжёлой цепи известны в уровне техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), а ДНК фрагменты, охватывающие эти области, можно получать стандартной ПЦР-амплификацией. Константная область тяжёлой цепи может быть константной областью IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительно является константной областью IgG1 или IgG4. Для гена Fab фрагмента тяжёлой цепи ДНК, кодирующая V_H , может быть функционально связана с другой ДНК, кодирующей только константную область тяжёлой цепи C_{H1} .

Выделенную ДНК, кодирующую область V_L , можно превратить в полноразмерный ген лёгкой цепи (а также в ген Fab лёгкой цепи) функциональным связыванием ДНК, кодирующей V_L , с другой ДНК, кодирующей константную область лёгкой цепи, C_L . Последовательности генов, кодирующих константную область человеческой лёгкой цепи, известны в уровне техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication. No. 91-3242), а ДНК фрагменты, охватывающие эти области, можно получать стандартной ПЦР-амплификацией. Константная область лёгкой цепи может быть константной областью каппа или лямбда, но наиболее предпочтительно является константной областью каппа цепи.

Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие V_H и V_L , функционально связываются с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)₃, так что последовательности V_H и V_L могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, при этом V_L и V_H области соединены гибким (подвижным) линкером (см., например, Bird et al. (1988), *Science*. 242: 423-426; Huston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 5879-5883; McCafferty et al. (1990), *Nature*. 348: 552-554).

Получение моноклональных антител по изобретению.

Моноклональные антитела (mAbs) по настоящему изобретению можно получать различными методами, включая обычные методы получения моноклональных антител, например стандартные методы гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein (1975), *Nature*. 256: 495. Хотя методы гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе, можно применять другие методы получения моноклонального антитела, например трансформацию В лимфоцитов под действием вирусов или онкогенов.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышьяная система. Получение гибридом в мыши является общепринятой процедурой. Протоколы иммунизации и методы выделения спленоцитов иммунизированных мышей для слияния известны в уровне техники. Партнёры по слиянию (например, клетки мышьяной миеломы) и методы слияния также известны.

Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению можно получать исходя из последовательности мышинового моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующие тяжёлые и лёгкие цепи иммуноглобулинов, можно получать из представляющей интерес мышинной гибридомы и стандартными методами молекулярной биологии преобразовывать таким образом, чтобы они содержали немышинные (например, человеческие) иммуноглобулиновые последовательности. Например, для создания химерного антитела мышинные варибельные области можно связывать с человеческими константными областями, используя методы, известные в уровне техники (см., например, патент США № 4816567, выданный Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR области можно включить в человеческую каркасную область методами, известными в уровне техники (см., например, патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

В предпочтительном варианте антитела по изобретению представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела к РТК7 можно получать, используя трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих фрагменты скорее человеческой, нежели мышинной иммунной системы. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в данном описании НуМАб мыши и КМ мыши™ соответственно и в целом называемых в данном описании "мышь с человеческим Ig".

НуМАб мышь® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, которые кодируют переаранжированные человеческие последовательности тяжёлой (μ и γ) и лёгкой к цепей иммуноглобулина, вместе с нацеленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и κ цепей (см., например, Lonberg, et al. (1994), *Nature*. 368(6474): 856-859). Поэтому у мышей наблюдается пониженная экспрессия мышинового IgM или κ , и в ответ на иммунизацию введённые трансгены человеческой тяжёлой и лёгкой цепей претерпевают переключение класса и соматические мутации, давая высокоаффинное моноклональное человеческое антитело IgGк (Lonberg, N. et al. (1994), см. выше; обзор в Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology*. 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995), *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 и Harding, F. and Lonberg, N. (1995), *Ann. NY. Acad. Sci.* 764: 536-546). Получение и применение НуМАб мышей и геномных модификаций, которые несут эти мыши, подробнее описано в Taylor, L. et al. (1992), *Nucleic Acids Research*. 20: 6287-6295; Chen, J. et al. (1993), *International Immunology*. 5: 647-656; Tuailon et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 3720-3724; Choi et al. (1993), *Nature. Genetics*. 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993), *EMBOJ*. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994), *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L. et al. (1994), *International Immunology*. 6: 579-591 и Fishwild, D. et al. (1996), *Nature Biotechnology*. 14: 845-851, содержание всех этих ссылочных материалов вводится ссылкой в данное описание во всей полноте. См. далее патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; все они выданы Lonberg and Kay; патент США № 5545807, выданный Surani et al.; опубликованные заявки РСТ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все выданные Lonberg and Kay, и опубликованную заявку РСТ WO 01/14424, выданную Korman et al.

В другом варианте можно получать человеческие антитела по изобретению, используя мышь, несущую последовательности человеческих иммуноглобулинов на трансгенах и трансхромосомах, такую как мышь, несущую трансген человеческой тяжёлой цепи и трансхромосому с геном человеческой лёгкой цепи. Такие мыши, называемые в данном описании "КМ мыши™", подробно описаны в опубликованной заявке РСТ WO 02/43478 Ishida et al.

Далее, альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены человеческих иммуноглобулинов, имеются в уровне техники и могут использоваться для получения антител по изобретению, специфичных к РТК7. Например, может использоваться альтернативная трансгенная система, названная Xenomouse (Abgenix, Inc.), такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, выданных Kucherlapati et al.

Кроме того, альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующие гены человеческих иммуноглобулинов, имеются в уровне техники и могут использоваться для получения антител по изобретению, специфичных к РТК7. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому с геном человеческой тяжёлой цепи, так и трансхромосому с геном человеческой лёгкой цепи, названных "ТС мыши", такие мыши описаны Tomizuka et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 722-727. Далее, в уровне техники описаны коровы, несущие трансхромосомы с генами человеческой тяжёлой и лёгкой цепей (Kuroiwa et al. (2002), *Nature Biotechnology*. 20: 889-894), и их можно использовать для получения антител по изобретению, специфичных к РТК7.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению можно также получать методами фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческого иммуноглобулина. Такие методы фагового дисплея для выделения человеческих антител известны в уровне техники. См., например, патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698, выданные Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717, выданные Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197, выданные McCafferty et al.; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданные Griffiths et al.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению можно также получать, используя мышей SCID, у которых человеческие иммунные клетки были восстановлены таким образом, что в ответ на иммунизацию вырабатывается человеческое антитело. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767, выданных Wilson et al.

Иммунизация мышей с человеческим Ig.

Если для выработки человеческих антител по изобретению используют мышей с человеческим Ig, таких мышей можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом РТК7 антигена и/или рекомбинантным РТК7 или слитым белком РТК7, как описано Lonberg, N. et al. (1994), Nature. 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996), Nature Biotechnology. 14: 845-851 и в опубликованных заявках РСТ WO 98/24884 и WO 01/14424. Предпочтительно в момент первой инфузии мышам должно быть 6-16 недель. Например, для интраперитонеальной иммунизации мышей с человеческим Ig можно использовать очищенный или рекомбинантный препарат (5-50 мкг) РТК7 антигена.

Методы получения полностью человеческих моноклональных антител к РТК7 подробно описаны ниже, в примере 1. Опыт, накопленный в ходе работы с различными антигенами, показал, что у трансгенных мышей ответ вырабатывается, когда их сначала иммунизируют интраперитонеально (и.п., IP) антигеном в полном адьюванте Фрейнда с последующими иммунизациями IP через неделю (всего вплоть до 6 иммунизаций) антигеном в неполном адьюванте Фрейнда. Однако найдено также, что эффективными могут быть другие адьюванты, нежели адьювант Фрейнда. Кроме того, найдено, что целые клетки в отсутствие адьюванта являются высокоиммуногенными. В процессе протокола иммунизации можно проводить мониторинг иммунного ответа, используя образцы плазмы, полученные при ретроорбитальном кровоизлиянии. Скрининг плазмы можно проводить методами ELISA (как описано ниже), и мышей с достаточными титрами человеческого иммуноглобулина против РТК7 можно использовать для слияния. Мышей можно иммунизировать с помощью внутривенной бустер-инъекции за 3 дня до умерщвления и извлечения селезенки. Для каждого антигена обычно иммунизируют от 6 до 24 мышей. Обычно используют как HCo7, так и HCo12 штаммы. Кроме того, как HCo7, так и HCo12 трансген можно выращивать совместно в одной мышце, несущей два различных трансгена человеческой тяжелой цепи (HCo7/HCo12). Или же или вместо этого, можно использовать штамм KM мышиTM, как описано в примере 1.

Получение гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела по изобретению.

Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела по изобретению, можно выделять спленоциты и/или клетки лимфатических узлов из иммунизированных мышей и сливать их с подходящей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия мышинной миеломы. Полученные в результате гибридомы можно подвергнуть скринингу на продуцирование антигенспецифических антител. Например, суспензии одиночных клеток, лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей можно сливать с одной шестой от числа P3X63-Ag8.653 несекретирующих клеток мышинной миеломы (ATCC, CRL 1580) с 50% ПЭГ. Клетки засевают при плотности около 2×10^5 в плоскодонный титрационный микропланшет, а затем инкубируют в течение двух недель в селективной среде, содержащей 20% фетальной сыворотки для клонирования, 18% кондиционированной среды "653", 5% оригена (IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1X HAT (Sigma); HAT добавляют через 24 ч после слияния). Примерно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменяют на HT. Затем отдельные лунки можно подвергать скринингу с помощью ELISA на человеческие моноклональные антитела IgM и IgG. Когда происходит интенсивный рост гибридом, за средой можно наблюдать обычно через 10-14 дней. Антитело, секретирующее гибридомы, можно переосеивать, снова проводить скрининг, и в случае положительной пробы на IgG моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды при ограниченном разведении. Стабильные субклоны можно затем культивировать *in vitro* для получения малых количеств антитела в тканевой культуральной среде с целью определения характеристик.

Для очистки человеческих моноклональных антител выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Перед аффинной хроматографией на протеин А-сефарозе (Pharmacia, Piscataway, N.J.) супернатанты можно отфильтровать и концентрировать. Элюированный IgG можно проверять с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS и концентрацию можно определить с помощью OD₂₈₀, используя коэффициент экстинкции 1.43. Аликвоты моноклональных антител можно хранить при -80°C.

Получение трансфектом продуцирующих моноклональные антитела по изобретению.

Антитела по изобретению также можно продуцировать в трансфектоте клетки-хозяина, используя, например, комбинацию методов рекомбинантной ДНК и методов трансфекции (встраивания) генов, хорошо известную в уровне техники (например, Morrison, S. (1985), Science. 229: 1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов антител ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные лёгкие и тяжёлые цепи, можно получать обычными методами молекулярной биологии (на-

пример, ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК, используя гибридому, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес), и ДНК можно включить в векторы экспрессии так, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями, контролирующими транскрипцию и трансляцию. Предполагается, что в этом контексте выражение "функционально связаны" означает, что ген антитела лигируют в вектор таким образом, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе выполняют свою предполагаемую функцию регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующий вектор и последовательности регуляции экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген лёгкой цепи антитела и ген тяжёлой цепи антитела можно вставить в отдельный вектор или, чаще, оба гена встраивают в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела встраивают в вектор экспрессии стандартными методами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции к фрагменту гена антитела и вектору или лигированием по тупым концам, если отсутствуют сайты рестрикции). Варибельные области лёгкой и тяжёлой цепей антител по данному описанию можно использовать для создания полноразмерных генов антител по данному описанию любого изотипа антител, встраивая их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные области тяжёлой цепи и константные области лёгкой цепи заданного изотипа, так, чтобы V_H сегмент функционально связывался с C_H сегментом (сегментами), а V_K сегмент функционально связывался с C_L сегментом внутри вектора. Кроме того или вместо того, вектор рекомбинантной экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид связывался в рамке считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

Помимо генов цепей антитела, векторы экспрессии рекомбинантных генов по изобретению несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы аденилирования), которые регулируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалист в данной области техники понимает, что дизайн вектора экспрессии, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, которую следует трансформировать, уровень экспрессии нужного белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке млекопитающего-хозяина включают вирусные элементы, которые управляют высоким уровнем экспрессии белка в клетках млекопитающего, такие как промоторы и/или энхансеры цитомегаловируса (CMV), вируса симиан-40 (SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP) и вируса полиомы). Или же можно использовать невирусные регуляторные последовательности из различных источников, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Далее, можно использовать регуляторные элементы, такие как SR α промоторная система, которая содержит последовательности раннего промотора SV40 и длинный концевой поворт вируса человеческого T-клеточного лейкоза типа I (Takebe, Y. et al. (1988), *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472).

Помимо генов цепей антитела и регуляторных последовательностей, векторы экспрессии рекомбинантных генов по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетке-хозяине (например, оридзины репликации) и селективные маркерные гены (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017, все выданы Axel et al.). Например, обычно селективный маркерный ген придаёт резистентность к лекарствам, таким как G418, гигромицину или метотрексату, клетке-хозяину, в которую вектор введён. Предпочтительные селективные маркерные гены включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах для селекции/амплификации с метотрексатом) и ген neo (для G418 селекции).

Для экспрессии лёгкой и тяжёлой цепей вектор(ы) экспрессии, кодирующий(ие) тяжёлую и лёгкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина обычными методами. Предполагается, что различные формы термина "трансфекция" охватывают широкий ряд методов, применяемых обычно для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию с применением DEAE-декстрана и т.п. Хотя теоретически возможно экспрессировать антитела по изобретению либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках-хозяевах, более предпочтительна экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно в клетках хозяев-млекопитающих, так как такие эукариотические клетки, и в особенности клетки млекопитающих, скорее чем прокариотические, подходят для сборки и секретирования соответствующим образом сложенного и иммунологически активного антитела. Сообщалось, что экспрессия антитела в прокариотических клетках неэффективна для получения активного антитела с высоким выходом (Boss, M.A. and Wood, C.R. (1985), *Immunology Today*. 6: 12-13).

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (включая "дрейфующие" (drift)-CHO клетки, описанные Urlaub and Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4216-4220, применяемые с DHFR селективным маркером, например, описанным R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982), Mol. Biol. 759: 601-621), клетки NSO миеломы, клетки COS и клетки SP2. В частности, для применения с клетками миеломы NSO другая предпочтительная система представляет собой систему экспрессии GS гена, описанную в международных патентных заявках WO 87/04462, WO 89/01036 и в Европейском патенте EP 338841. Если векторы экспрессии рекомбинантной ДНК вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, антитела продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно для секреции антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделить из культуральной среды стандартными методами очистки белков.

Характеристика связывания антитела с антигеном.

Антитела по изобретению можно проверить на связывание с РТК7, например, стандартным методом ELISA. Коротко говоря, микротитрационные планшеты покрывают очищенной РТК7 с концентрацией 0,25 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Разведения антитела (например, разведения плазмы иммунизированных РТК7 мышей) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты отмывают PBS/Твин (Tween), а затем инкубируют вторичным реагентом (например, для человеческих антител специфическим поликлональным реагентом-антителом козы против человеческого IgG Fc), конъюгированным со щелочной фосфатазой, в течение 1 ч при 37°C. После отмывания планшеты проявляют рNPP-субстратом (1 мг/мл) и анализируют при OD 405-650. Предпочтительно для слияния берут мышей с наивысшими титрами.

Анализ ELISA, описанный выше, можно использовать также для скрининга на гибридомы, которые проявляют позитивную реактивность в отношении РТК7 иммуногена. Гибридомы, которые с высокой avidностью связываются с РТК7, субклонировать и характеризуют более детально. Один клон каждой гибридомы, который сохраняет реактивность родительских клеток (методом ELISA), можно выбрать для создания банка клеток из 5-10 ампул, которые хранят при -140°C, и для очистки антитела.

Для очистки антител против РТК7 выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Перед аффинной хроматографией на протеин-А-сефарозе (Pharmacia, Piscataway, NJ) супернатанты можно профильтровать и концентрировать. Элюированный IgG можно проверять с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS и концентрацию можно определить с помощью OD₂₈₀, используя коэффициент экстинкции 1,43. Аликвоты моноклональных антител можно хранить при -80°C.

Для того чтобы проверить, действительно ли селективные моноклональные антитела против РТК7 связываются с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать, используя продажные реагенты (Pierce, Rockford, IL). Изучение конкурентного связывания с применением немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно проводить, используя покрытые РТК7 планшеты для ELISA, описанные выше. Связывание биотинилированного mAb можно обнаруживать с помощью комплекса стреп (strept)-авидин-щелочная фосфатаза.

Для определения изотипа очищенных антител можно проводить анализ ELISA изотипов с применением реагентов, специфических к антителам конкретного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки микротитрационных планшетов можно покрывать антителом против человеческого иммуноглобулина с концентрацией 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C. Блокируют с помощью 1% BSA, планшеты оставляют реагировать с тестируемыми моноклональными антителами или с очищенными контрольными изотипами с концентрацией 1 мкг/мл или менее при комнатной температуре в течение 1-2 ч. Затем лунки оставляют для реакции с зондами реагентов, специфических либо к человеческому IgG1, либо к человеческому IgM, конъюгированных со щелочной фосфатазой. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Далее методом Вестерн-блоттинга можно проверять реактивность человеческих IgG против РТК7 в отношении антигена РТК7. Коротко говоря, можно получить РТК7 и провести его электрофорез в акриламидном геле в системе додецилсульфата. После электрофореза разделённые РТК7 переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 10% фетальной телячьей сывороткой и анализируют с помощью зондов испытуемых моноклональных антител. Связывание с человеческим IgG можно детектировать, используя щелочную фосфатазу против человеческого IgG и проявляя таблетками субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Иммуноконъюгаты.

В другом аспекте настоящее изобретение включает антитело против РТК7 или его фрагмент, конъюгированное(ый) с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, лекарство (например, иммунодепрессант (иммуносупрессор)) или радиотоксин. Такие конъюгаты в данном описании называются "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают один или более цитотоксинов, называют "иммунотоксинами." Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который является

пагубным для клеток (например, убивает их). Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические агенты включают также, например, антимаетаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-флуорурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманит, стрептозотоцин, митомицин С и цисдихлордиаминплатина (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие предпочтительные примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителом по изобретению, включают дуокармицины, калихеамицины, майтанзины (maytansines) и ауристатины (auristatines) и их производные. Пример конъюгата калихеамицина с антителом является продажным (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst). Примеры терапевтических цитотоксинов можно найти, например, в патентах США № 6548530 и 6281354 и патентных заявках США № US 2003/0064984, US 2003/0073852 и US 2003/0050331.

Цитотоксины можно конъюгировать с антителами, используя линкеры, известные в уровне техники. Примеры типов линкеров, которые используются для конъюгации цитотоксина с антителом, включают, но без ограничения, гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Можно выбирать линкер, который, например, чувствителен к расщеплению при низких pH в лизосомном компартменте или чувствителен к расщеплению протеазами, такими как протеазы, преимущественно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D).

Более подробное обсуждение типов цитотоксинов, линкеров и методов конъюгации терапевтических агентов с антителами см. также в Saito, G. et al. (2003), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail, P.A. et al. (2003), *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003), *Cancer Cell.* 3: 207-212; Allen, T.M. (2002), *Nat. Rev. Cancer.* 2: 750-763; Pastan, I. and Kreitman, R.J. (2002), *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 3: 1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264.

Антитела по настоящему изобретению можно также конъюгировать с радиоактивным изотопом с образованием цитотоксических радиофармацевтических веществ, также называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для диагностического или терапевтического применения, включают, но без ограничения, йод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий и лютеций¹⁷⁷. Способ получения радиоиммуноконъюгатов широко известен в уровне техники. Примеры иммуноконъюгатов являются продажными, включая Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) и Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные методы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов, в которых используются антитела по изобретению.

Конъюгаты антител по изобретению можно использовать для модификации данного биологического ответа, а лекарственный агент не следует рассматривать как ограничивающийся классическими химическими терапевтическими агентами. Например, лекарственный агент может представлять собой белок или полипептид, обладающий заданной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *pseudomonas* или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухолевых клеток или интерферон-γ; или модификаторы биологического ответа, например лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF") или другие факторы роста.

Методы конъюгации такого терапевтического агента с антителами хорошо известны, см., например, Anion et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

Биспецифические молекулы.

В другом аспекте настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, содержащие антитело против РТК7 или его фрагмент по изобретению. Антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом к рецептору), для получе-

ния биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или целевыми молекулами. На самом деле антитело по изобретению может быть дериватизировано или связано более чем с одной другой функциональной молекулой с образованием полиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или целевыми молекулами; предполагается, что такие полиспецифические молекулы также охватываются термином "биспецифическая молекула" по данному описанию. Для создания биспецифической молекулы по изобретению антитело по изобретению можно функционально связывать (например, химической связью, генетическим слиянием, нековалентной ассоциацией или иным способом) с одной или более других связывающих молекул, таких как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или миметик связывания, так что образуется биспецифическая молекула.

Поэтому настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания с РТК7 и вторую специфичность связывания второго целевого эпитопа. В конкретном варианте изобретения второй целевой эпитоп представляет собой Fc-рецептор, например рецептор человеческого FcγRI (CD64) или человеческого Fcα (CD89). Таким образом, изобретение включает биспецифические молекулы, способные связываться как с эффекторными клетками, экспрессирующими FcγR или FcαR (например, моноцитами, макрофагами или полиморфнонуклеарными клетками (PMN)), так и с клетками-мишенями, экспрессирующими РТК7. Эти биспецифические молекулы нацеливают клетки, экспрессирующие РТК7, на эффекторные клетки и запускают (инициируют) опосредованные Fc-рецептором активности эффекторных клеток, такие как фагоцитоз экспрессирующих РТК7 клеток, антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ, ADCC), высвобождение цитокина или образование супероксид-аниона.

В одном варианте изобретения, в котором биспецифическая молекула является полиспецифической, молекула должна дополнительно включать третью специфичность связывания, помимо специфичности связывания с антителом против Fc и специфичности связывания с антителом против РТК7. В одном варианте изобретения третья специфичность связывания представляет собой участок антитела к фактору усиления (активации) (EF), например молекула, которая связывается с поверхностным белком, включённым в цитотоксическую активность и, тем самым, повышает иммунный ответ против целевой клетки. "Участок антитела к фактору усиления" может представлять собой антитело, функциональный фрагмент антитела или лиганд, который связывается с данной молекулой, например антигеном или рецептором, и, тем самым, приводит к усилению эффекта связывания детерминант с рецептором для Fc-фрагмента или антигеном целевой клетки. "Участок против фактора усиления" может связывать рецептор для Fc-фрагмента или антиген целевой клетки или же "участок антитела против фактора усиления" может связываться с объектом, отличным от объекта, с которым связываются первая и вторая специфичности. Например, участок против фактора усиления может связывать цитотоксическую Т-клетку (например, через посредство CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 или другую иммунную клетку, что приводит к повышению иммунного ответа на целевую клетку).

В одном варианте изобретения биспецифические молекулы по изобретению содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или его антительный фрагмент, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело может также представлять собой димер лёгкой или тяжёлой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv, или одноцепочечную конструкцию, такую как описана Ladner et al. патент США № 4946778, содержание которого однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки.

В одном варианте изобретения специфичность связывания с Fcγ рецептором обеспечивается моноклональным антителом, связывание которого не блокируется человеческим иммуноглобулином G (IgG). Термин "IgG рецептор" по данному описанию относится к любому из восьми генов γ-цепи, локализованных на хромосоме 1. Эти гены кодируют в целом 12 трансмембранных или растворимых рецепторных изоформ, которые сгруппированы в три класса Fcγ рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). В одном предпочтительном варианте изобретения Fcγ рецептор представляет собой высокоаффинный FcγRI. Человеческий FcγRI представляет собой молекулу протяжённостью 72 кДа, обладающую высокой аффинностью к IgG (10^8 - 10^9 M⁻¹).

Получение и определение характеристик некоторых предпочтительных моноклональных антител против Fcγ описаны Fanger et al. в опубликованной заявке РСТ WO 88/00052 и в патенте США № 4954617, раскрытие которых полностью вводится в данное описание в качестве ссылки. Эти антитела связываются с эпитопом FcγRI, FcγRII или FcγRIII по сайту, который отличен от сайта связывания Fcγ, и, следовательно, их связывание практически не блокируется физиологическими уровнями IgG. Антителами, специфическими к FcγRI, применимыми по данному изобретению, являются mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 и mAb 197. Гибридома, продуцирующая mAb 32, имеется в Американской типовой коллекции клеточных культур, ATCC Accession No. HB9469. В других вариантах изобретения антитело к Fcγ рецептору представляет собой гуманизированную форму моноклонального антитела 22 (H22). Получение и определение характеристик моноклонального антитела H22 описано в Graziano, R.F. et al. (1995), J. Immunol. 155(10):4996-5002 и в опубликованной заявке РСТ WO 94/10332. Линия клеток, продуцирую-

щая антитело H22, депонирована в Американской типовой коллекции клеточных культур под названием HA022CL1 и имеет регистрационный номер CRL 11177.

В других вариантах изобретения специфичность связывания с Fc-рецептором обеспечивается антителом, которое связывается с рецептором для человеческого IgA, например с Fc-альфа рецептором (Fc α RI (CD89)), связывание которого предпочтительно не блокируется человеческим иммуноглобулином A (IgA). Предполагается, что термин "IgA рецептор (рецептор для IgA)" включает генный продукт одного α -гена (Fc α RI), локализованного на хромосоме 19. Известно, что этот ген кодирует некоторые полученные при альтернативном сплайсинге трансмембранные изоформы протяжённостью от 55 до 110 кДа. Fc α RI (CD89) конститутивно экспрессируется на моноцитах/макрофагах, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитах, но не на популяциях эффекторных клеток. Fc α RI имеет среднюю аффинность ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) как к IgA1, так и к IgA2, которая повышается при экспозиции с цитокинами, такими как G-CSF или GM-CSF (Morton, H.C. et al. (1996), *Critical Reviews in Immunology*. 16: 423-440). Описаны четыре моноклональных антитела, специфических к Fc α RI, идентифицированные как A3, A59, A62 и A77, которые связывают Fc α RI вне лигандсвязывающего домена IgA (Monteiro, R.C. et al. (1992), *J. Immunol.* 148:1764).

Fc α RI и Fc γ RI являются предпочтительными запускающими рецепторами (рецепторами-переключателями) для применения в биспецифических молекулах по изобретению, так как они (1) экспрессируются главным образом на иммунных эффекторных клетках, например моноцитах, PMN, макрофагах и дендритных клетках; (2) экспрессируются с высокими уровнями (например, 5000-100000 на клетку); (3) являются медиаторами цитотоксических активностей (например, ADCC, фагоцитоз); (4) опосредуют повышенную антигенную презентацию антигенов, включая аутоантигены, нацеленные на них.

Хотя предпочтительными являются человеческие моноклональные антитела, в биспецифических молекулах по изобретению можно использовать другие антитела, мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела. Биспецифические молекулы по настоящему изобретению можно получать конъюгацией составляющих специфичностей связывания, например анти-FcR и анти-PTK7 специфичностей связывания, методами, известными в уровне техники. Например, каждую специфичность связывания биспецифической молекулы можно получать по отдельности, а затем конъюгировать их друг с другом. Если специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные конденсирующие или сшивающие агенты. Примеры сшивающих агентов включают белок A, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилацетат (SATA), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sulfo-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984), *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, M.A. et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8648). Другие методы включают методы, описанные в Paulus (1985), *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985), *Science.* 229: 81-83 и Glennie et al. (1987), *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Предпочтительными конъюгирующими агентами являются SATA и sulfo-SMCC, оба получают от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если специфичности связывания представляют собой антитела, их можно конъюгировать, связывая сульфгидрильной связью C-концевые шарнирные области двух тяжёлых цепей. В особенно предпочтительном варианте изобретения шарнирную область модифицируют таким образом, чтобы перед конъюгацией она содержала нечётное число сульфгидрильных связей, предпочтительно одну.

Или же обе специфичности связывания можно кодировать в одном векторе и экспрессировать и собирать в одной и той же клетке-хозяине. Этот метод особенно применим в тех случаях, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb \times mAb, mAb \times Fab, Fab \times F(ab) $_2$ или лиганд \times Fab. Биспецифическая молекула по изобретению может быть одноцепочечной молекулой, содержащей одно одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечной биспецифической молекулой, содержащей две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Методы получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498; 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтвердить, например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (RIA), FACS анализом, биоанализом (например, ингибированием роста) или Вестерн-блоттингом. Каждый из этих методов анализа позволяет обнаруживать присутствие комплексов белок-антитело, представляющих конкретный интерес, с помощью меченого реагента (например, антитела), специфического к представляющему интерес комплексу. Например, комплексы FcR-антитело можно детектировать, используя, например, связанное с ферментом антитело или фрагмент антитела, которое(ый) распознаёт и специфически связывается с комплексами антитело-FcR. Или же комплексы можно детектировать, используя любой из множества других иммуноанализов. Например, антитело можно метить радиоактивной меткой и использовать в радиоиммуноанализе (RIA) (см., например, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986*, это пособие

вводится в данное описание в качестве ссылки). Радиоактивный изотоп можно обнаруживать, например, с помощью γ счётчика, или сцинтилляционного счётчика, или автордиографии.

Фармацевтические композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение включает композицию, например фармацевтическую композицию, содержащую одно моноклональное антитело или комбинацию моноклональных антител или их антигенсвязывающий(ие) участок (участки) по настоящему изобретению, приготовленное(ые) в виде препарата с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно антитело или комбинацию (например, двух или более различных) антител или иммуноконъюгаты биспецифических молекул по изобретению. Например, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгаты, или биспецифические молекулы), которые связываются с различными эпитопами на целевом антигене или которые имеют комплементарные активности.

Фармацевтические композиции по изобретению можно также применять в виде комбинированного лекарственного средства, а именно объединять с другими агентами. Например, комбинированное лекарственное средство может включать антитело против РТК7 по настоящему изобретению по меньшей мере вместе с одним другим противовоспалительным агентом или иммунодепрессантом. Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе о применении антител по изобретению.

Выражение "фармацевтически приемлемый носитель" по данному описанию включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и снижающие всасывание агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального (межпозвоночного) или эпидермального введения (например, с помощью инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, могут быть покрыты материалом для защиты соединения от воздействия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения по изобретению могут включать одну или более фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет заданную биологическую активность исходного соединения и не вызывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S.M. et al. (1977), J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Соли присоединения кислот включают соли, полученные присоединением нетоксических неорганических кислот, таких как хлористо-водородная, азотная, фосфорная, серная, бромисто-водородная, йодисто-водородная, фосфористая и т.п., а также нетоксических органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенолзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, полученные с участием щелочно-земельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также нетоксических органических аминов, таких как N,N'-дипропиламид, N-метилпропиламин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция по изобретению также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают:

(1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и т.п.;

(2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.;

(3) металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например используя материалы для покрытия, такие как лецитин, сохраняя нужный размер частиц (дисперсность) в случае дисперсий и используя поверхностно-активные вещества.

Эти композиции могут содержать также адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергаторы. Предотвращение появления микроорганизмов может гарантировать как стерилизация, см. выше, так и включение антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Может быть желательным включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно осуществить продолжительное всасывание инъекционной фармацевтической формы, включив агенты, которые замедляют всасывание, такие как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального (срочного) приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и агентов с фармацевтически активными веществами известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда какие-либо обычные среды или агенты несовместимы с активным соединением, рассматривается их применение в фармацевтических композициях по изобретению. Также в композицию можно включать дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и устойчивыми в условиях производства и хранения. Композицию можно приготовить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой предписанной (упорядоченной) структуры, подходящей для создания высокой концентрации лекарства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их соответствующие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например используя материалы для покрытия, такие как лецитин, сохраняя нужный размер частиц (дисперсность) в случае дисперсий и используя поверхностно-активные вещества. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты (полиолы), такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъеклируемых композиций можно осуществить, включив в композицию агенты, которые замедляют всасывание, такие как соли моностеараты и желатин.

Стерильные растворы для инъекций можно получать, вводя активное соединение в нужном количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, по требованию, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Обычно дисперсии готовят, смешивая активное вещество со стерильным носителем, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. Предпочтительными способами получения стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций являются вакуумная сушка и лиофилизация (замораживание-высушивание), этими способами получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный нужный ингредиент из его раствора, предварительно отфильтрованного стерильной микрофильтрацией.

Количество активного ингредиента, которое можно смешивать с носителем для получения однократной дозы лекарственной формы, меняется в зависимости от пролечиваемого субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно смешивать с носителем для получения однократной дозы лекарственной формы, обычно представляет собой такое количество композиции, которое даёт терапевтический эффект. Обычно из общего числа 100% это количество составляет примерно от 0,01 до примерно 99% активного ингредиента, предпочтительно примерно 0,1-70%, наиболее предпочтительно примерно 1-30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы приёма корректируются таким образом, чтобы вызвать оптимальный нужный ответ (например, терапевтический эффект). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько раздельных доз во времени или дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить, как диктует терапевтическая ситуация. Особенно предпочтительно готовить композиции для парентерального введения в виде унифицированной (стандартной) дозы лекарственной формы (стандартной дозы) для простоты введения и однородности дозы. Стандартная (лекарственная) доза по данному описанию относится к физически дискретным единицам, применимым в качестве однократных доз, получаемых пролечиваемыми субъектами; каждая стандартная доза содержит прописанное количество активного соединения, рассчитанного так, чтобы оно вызывало нужный терапевтический эффект, в сочетании с нужным терапевтическим носителем. Технические требования к стандартным лекарственным формам по изобретению диктуются и непосредственно зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который требуется получить; и (б) ограничений, свойственных приготовлению лекарственных средств из такого активного соединения для лечения чувствительных индивидуумов.

Интервалы доз для введения антитела составляют примерно от 0,0001 до 100 мг/кг, обычно 0,01-5 мг/кг веса тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3, 1,0, 3,0, 5,0, или 10 мг/кг веса тела, или 1-20 мг/кг. Типичная схема лечения включает введение один раз в неделю, один раз в две недели (через неделю), один раз в три недели (через две недели), один раз в четыре недели (через три недели), один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы лечения с помощью антитела против РТК7 по изобретению включают внутривенное введение в количестве 1 или 3 мг/кг веса тела, причём антитело дают по одной из следующих схем: (i) шесть доз каждые четыре недели, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг веса тела однократно, затем 1 мг/кг веса тела каждые три недели.

В некоторых методах два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в указанных интервалах. Антитело обычно вводят многократно. Интервалы между однократными дозами могут составлять неделю, месяц, три месяца или год. Интервалы могут быть также нерегулярными по результа-

там измерения уровней антитела к антигену-мишени у пациента. В некоторых методах дозу корректируют так, чтобы достичь концентрации антитела в плазме около 1-1000 мкг/мл, а в некоторых методах около 25-300 мкг/мл.

Или же антитело можно вводить в виде препарата пролонгированного действия, в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота введения меняются в зависимости от периода полужизни антитела в организме пациента. Как правило, период полужизни человеческих антител является самым высоким, затем идут гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, отличные от человеческих. Доза и частота введения меняются в зависимости от того, является лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении относительно низкую дозу вводят со сравнительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца жизни. При терапевтическом лечении для уменьшения или прекращения развития заболевания и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не будет наблюдаться частичное или полное ослабление симптомов заболевания, иногда требуется вводить относительно высокие дозы через сравнительно короткие интервалы. После этого пациент может перейти на профилактическую схему лечения.

Действительные уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения нужного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являющееся токсическим для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретно применяемых композиций по настоящему изобретению, или сложного эфира, соли или амида активного ингредиента, способа введения, времени введения, скорости экскреции конкретного применяемого соединения, длительности лечения, других лекарств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, подлежащего лечению, и подобных факторов, общеизвестных в медицине.

"Терапевтически эффективная доза" антитела против РТК7 по изобретению предпочтительно вызывает ослабление тяжести симптомов заболевания, более частые и более продолжительные бессимптомные периоды заболевания или предупреждение ухудшения или нетрудоспособности, вызванных заболеванием. Например, в случае лечения опухолей "терапевтически эффективная доза" предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере примерно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 40%, ещё более предпочтительно по меньшей мере примерно на 60% и ещё более предпочтительно по меньшей мере примерно на 80% по сравнению с непролеченными субъектами. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценивать на животной модельной системе, предсказуемой для человеческих опухолей. Или же это свойство композиции можно оценивать, изучая способность соединения ингибировать, такое ингибирование в анализах *in vitro* известно практикующему специалисту. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли или иным способом ослабить симптомы у субъекта. Рядовой специалист в данной области техники способен определить такие количества с учётом таких факторов, как габариты субъекта, тяжесть симптомов у субъекта, и конкретной выбранной композиции или выбранного способа введения.

Композицию по настоящему изобретению можно вводить одним или более способов введения, используя один или более из множества методов, известных в уровне техники. Как ясно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения варьируется в зависимости от нужных результатов. Предпочтительные пути введения антител по изобретению включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, интраперитонеальный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например в виде инъекции или инфузии. Выражение "парентеральное введение (применение)" по данному описанию означает способы введения, отличные от энтерального и топического введения, обычно с помощью инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, подбололочную (интратекальную), внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную (интракардиальную), интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, подкапсульную, субарахноидальную, интракапсульную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию.

Или же антитело по изобретению можно вводить непарентеральным способом, таким как топический, эпидермальный способ введения или введение через слизистую оболочку, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, подъязычно (сублингвально) или топически.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые предупреждают быстрое высвобождение соединения, например препарат с контролируемым высвобождением, включающий имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразрушаемые, биосовместимые полимеры, такие как сополимер этилена с винилацетатом, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие методы приготовления таких препаратов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed. Marcel

Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в уровне техники. Например, в предпочтительном варианте изобретения терапевтическую композицию по изобретению можно вводить безыгольным устройством для гиподермических инъекций, таким как устройства, раскрываемые в патентах США № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры общеизвестных имплантатов и модулей, применимых в настоящем изобретении, включают примеры, приводимые в следующих патентах: патент США № 4487603, в котором раскрывается имплантируемый микроинфузионный насос для подачи лекарства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрывается терапевтическое устройство для введения лекарств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрывается насос для инфузии медицинского средства для его доставки с точной скоростью вливания; патент США № 4447224, в котором раскрывается имплантируемый инфузионный аппарат с варьируемой скоростью потока для непрерывной доставки лекарства; патент США № 4439196, в котором раскрывается система доставки лекарства с многокамерными ячейками под действием осмотического давления; и патент США № 4475196, в котором раскрывается система доставки лекарства под действием осмотического давления. Эти патенты вводятся в данное описание в качестве ссылок. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах человеческие моноклональные антитела по изобретению можно приготовить так, чтобы гарантировать соответствующее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для того чтобы гарантировать, что терапевтические соединения по изобретению пересекают BBB (если это желательно), их можно приготовить, например, в липосомах. О способах получения липосом см., например, патенты США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или более агентов, которые селективно переносятся в конкретные клетки или органы, тем самым улучшается целевая доставка лекарства (см., например, V.V. Ranade (1989), *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Типичные нацеливающие агенты включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995), *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais et al. (1995), *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); рецептор для белка А сурфактанта (Briscoe et al. (1995), *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p. 120 (Schreier et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269: 9090; см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994), *FEBS Lett.* 346: 123; J.J. Killion; L.J. Fidler (1994), *Immunomethods.* 4:273).

Применение способов по изобретению.

Антитела, композиции антител и способы по настоящему изобретению имеют различное *in vitro* и *in vivo* диагностическое и терапевтическое применение, включая диагностику и лечение расстройств, опосредованных РТК7. В предпочтительном варианте антитела по настоящему изобретению являются человеческими антителами. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или людям, например *in vivo*, для лечения, предупреждения или для диагностики различных расстройств. Предполагается, что термин "субъект" по данному описанию включает человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные включают всех позвоночных, например млекопитающих и не-млекопитающих, таких как нечеловеческие приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, земноводные и рептилии. Предпочтительные субъекты включают людей, страдающих расстройствами, опосредованными РТК7 активностью. Способы особенно пригодны для лечения людей с расстройствами, ассоциированными с нарушенной экспрессией РТК7. Если антитела к РТК7 вводят вместе с другим агентом, их можно вводить либо последовательно, либо одновременно.

Принимая во внимание специфическое связывание антител по изобретению с РТК7, антитела по изобретению можно использовать для специфической детекции экспрессии РТК7 на поверхности клеток и, кроме того, их можно использовать для очистки РТК7 методом иммуноаффинной хроматографии.

Далее изобретение включает способы обнаружения (детекции) присутствия антигена, человеческой РТК7, в образце, или измерения количества антигена человеческой РТК7, заключающиеся в контактировании образца и контрольного образца с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим участком, которое(ый) специфически связывается с человеческой РТК7, в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом или его участком и человеческой РТК7. Затем детектируют образование комплекса, причём различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом является показателем присутствия антигена человеческой РТК7 в образце.

РТК7 экспрессируется в клеточных линиях рака толстой кишки, но найдено, что она не экспрессируется во взрослых человеческих клетках (тканях) толстой кишки (Mossie et al. (1995), *Oncogene.* 11: 2179-84). Экспрессия РТК7 наблюдается также в некоторых клеточных линиях меланомы и при биопсии меланомы (Easty, et al. (1997), *Int. J. Cancer.* 71: 1061-5). Кроме того, сверхэкспрессия РТК7 наблюдается в образцах (препаратах) острого миелоидного лейкоза (Muller-Tidow et al. (2004), *Clin. Cancer Res.* 10: 1241-9). Антитело против РТК7 можно использовать индивидуально для ингибирования роста раковых опухолей. Или же антитело против РТК7 можно использовать в сочетании с другими иммуногенными

агентами, со стандартными средствами лечения рака или другими антителами, как описано ниже.

Предпочтительные типы раковых опухолей, рост которых можно ингибировать, используя антитела по изобретению, включают типы рака, обычно восприимчивые к иммунотерапии. Неограничивающие примеры предпочтительных типов рака для лечения включают колоректальный рак (включая рак тонкого кишечника), рак лёгкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), острый миелоидный лейкоз, рак почки, рак мочевого пузыря, рак яичника и рак простаты. Примеры других типов рака, которые можно лечить, используя методы по данному изобретению, включают рак почки (например, почечно-клеточную карциному), опухоли мозга, хронический или острый лейкоз, включая острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ, ALL), Т-клеточный лейкоз взрослых (Т-ALL), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфомы (например, ходжкинскую и неходжкинскую лимфому, лимфоцитарную лимфому, первичную лимфому ЦНС, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, анапластические крупноклеточные лимфомы (ALCL), кожные Т-клеточные лимфомы, узловые мелкоклеточные лимфомы с расщеплёнными ядрами, периферические Т-клеточные лимфомы, лимфомы Леннерта, иммунобластные лимфомы, Т-клеточные лейкоз/лимфомы (ATLL), энтробластомы/центроцитомы (cb/cc)-неходжкинские фолликулярные лимфомы низкой степени злокачественности, диффузные крупноклеточные лимфомы В линии, ангиоиммунобластную лимфаденопатию (AILD)-подобную Т-клеточную лимфому и ассоциированные с ВИЧ лимфомы брюшной полости), эмбриональные карциномы, недифференцированные карциномы носоглотки (например, опухоль Шминке), болезнь Кастлемана, саркому Капоши, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и другие В-клеточные лимфомы, назофарингеальные карциномы, рак костей, рак кожи, рак головы и шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли детства, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, опухоль центральной нервной системы (ЦНС), ангиогенез при опухоли, рак позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, рак, вызванный нарушением экологии, включая рак, вызываемый асбестозом, например мезотелиому, и комбинации указанных раковых заболеваний.

Кроме того, с учётом экспрессии РТК7 на различных опухолевых клетках человеческие антитела композиции антител и способы по настоящему изобретению можно использовать для лечения субъекта с опухолевым расстройством, например расстройством (нарушением), характеризующимся присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, включая, например, рак толстой кишки (колоректальный рак) (включая рак тонкого кишечника), меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), острый миелоидный лейкоз, рак лёгкого, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника и рак простаты. Примеры других субъектов с опухолевым нарушением (расстройством) включают субъектов, имеющих почечный рак (например, почечно-клеточную карциному), глиобластому, опухоли мозга, хронический или острый лейкоз, включая острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ, ALL), Т-клеточный лейкоз взрослых (Т-ALL), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфомы (например, ходжкинскую и неходжкинскую лимфому, лимфоцитарную лимфому, первичную лимфому ЦНС, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, анапластические крупноклеточные лимфомы (ALCL), кожные Т-клеточные лимфомы, узловые мелкоклеточные лимфомы с расщеплёнными ядрами, периферические Т-клеточные лимфомы, лимфомы Леннерта, иммунобластные лимфомы, Т-клеточные лейкоз/лимфомы (ATLL), энтробластомы/центроцитомы (cb/cc)-неходжкинские фолликулярные лимфомы низкой степени злокачественности, диффузные крупноклеточные лимфомы В линии, ангиоиммунобластную лимфаденопатию, (AILD)-подобную Т-клеточную лимфому и ассоциированные с ВИЧ лимфомы брюшной полости), эмбриональные карциномы, недифференцированные карциномы носоглотки (например, опухоль Шминке), болезнь Кастлемана, саркому Капоши, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и другие В-клеточные лимфомы, назофарингеальные карциномы, рак костей, рак кожи, рак головы и шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли детства, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, опухоль центральной нервной системы (ЦНС), ангиогенез при опухоли, рак позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, рак, вызванный нарушением экологии, включая рак, вызываемый асбестозом, например мезотелиому, и комбинации указанных раковых заболеваний.

Таким образом, в одном варианте изобретения включает способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, заключающийся во введении субъекту терапевтически эффективного количества ан-

титела против РТК7 или его антигенсвязывающего участка. Предпочтительно антитело представляет собой человеческое антитело против РТК7 (такое как любое из человеческих антител против РТК7 по данному описанию). Кроме того или вместо этого, антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело против РТК7.

В одном варианте изобретения антитела (например, человеческие моноклональные антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и композиции) по изобретению можно использовать для обнаружения уровней РТК7 или уровней клеток, которые содержат РТК7 на поверхности мембран клеток, затем эти уровни можно связать с определёнными симптомами заболевания. Или же можно использовать антитела для ингибирования или блокирования РТК7 функции, что, в свою очередь, может быть связано с предупреждением или ослаблением некоторых симптомов заболевания, тем самым подразумевается, что РТК является медиатором заболевания. Этого можно достичь при контактировании опытного образца и контрольного образца с антителом к РТК7 в условиях, которые способствуют образованию комплекса антитела с РТК7. Любые комплексы, которые образуют антитело и РТК7, детектируются и сравниваются в экспериментальном и контрольном образцах.

В другом варианте изобретения антитела (например, человеческие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и композиции) по изобретению можно сначала проверять на активность связывания, ассоциированную с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, композиции по изобретению можно тестировать методами проточной цитометрии, описанными ниже, в примерах.

Антитела (например, человеческие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и композиции) по изобретению имеют дополнительную применимость в терапии и диагностике РТК7-связанных заболеваний. Например, человеческие моноклональные антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты можно использовать для выявления *in vivo* или *in vitro* одной или более следующих биологических активностей: ингибировать рост и/или убивать клетки, экспрессирующие РТК7; опосредовать фагоцитоз или ADCC клеток, экспрессирующих РТК7 в присутствии человеческих эффекторных клеток; или блокировать связывание лиганда РТК7 с РТК7.

В конкретном варианте изобретения антитела (например, человеческие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и композиции) используются *in vivo* для лечения, предупреждения или диагностики различных РТК7-связанных заболеваний. Примеры РТК7-связанных заболеваний включают, в числе прочих, рак толстой кишки (колоректальный рак) (включая рак тонкого кишечника), меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), острый миелоидный лейкоз, рак лёгкого, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника и рак простаты.

Подходящие способы введения композиций антитела (например, человеческих моноклональных антител, полиспецифических или биспецифических молекул и иммуноконъюгатов) по изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в уровне техники и могут быть выбраны рядовым специалистом в данной области техники. Например, композиции антител можно вводить с помощью инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы молекул (применяемых соединений) зависят от возраста и веса субъекта и концентрации и/или рецептуры композиции антитела.

Как описано ранее, человеческие антитела против РТК7 по изобретению можно вводить совместно с одним или более других терапевтических агентов, например с цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммунодепрессантом. Антитело может быть связано с агентом (в виде иммунокомплекса) или его можно вводить отдельно от агента. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно с известными другими известными видами терапии, например с противораковой терапией или облучением. Такие терапевтические агенты включают, наряду с прочими, противоопухолевые агенты, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил и циклофосфамид гидроксимочевину, которые, сами по себе, эффективны только при уровнях, токсичных или субтоксичных для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/доза один раз каждые четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл один раз через 21 день. Совместное введение человеческих антител против РТК7 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с химиотерапевтическими агентами предусматривает два противораковых агента, которые действуют по различным механизмам, что оказывает цитотоксический эффект на человеческие опухолевые клетки. Такое совместное введение может решить проблемы, вызванные появлением резистентности к лекарствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что делает их неактивными в отношении антитела.

В одном варианте иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать для нацеливания соединений (например, терапевтических агентов, меток, цитотоксинов, радиотоксинов, иммунодепрессантов и т.д.) на клетки, которые содержат рецепторы РТК7 клеточной поверхности, связывая такие соединения с антителом. Например, антитело против РТК7 можно конъюгировать с любыми токсинами, описанными в патентах США № 6281354 и 6548530, опубликованных патентных заявках США № 20030050331, 20030064984, 20030073852 и 20040087497 или в международной патентной заявке WO 03/022806, которые вводятся в данное описание во всей полноте в качестве ссылки. Так, изобретение также включает

способы локализации *ex vivo* или *in vivo* клеток, экспрессирующих РТК7 (например, с детектируемой меткой, такой как радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или ферментный кофактор). Или же иммуноконъюгаты можно использовать для киллинга клеток, которые содержат рецепторы РТК7 клеточной поверхности, нацеливая цитотоксины или радиотоксины на РТК7.

Мишень-специфические эффекторные клетки, например эффекторные клетки, связанные с композициями (например, человеческих тел, полиспецифических и биспецифических молекул) по изобретению, можно также использовать в качестве терапевтических агентов. Эффекторные клетки для нацеливания могут представлять собой человеческие лейкоциты, такие как макрофаги, нейтрофилы или моноциты. Другие клетки включают эозинофилы, натуральные киллерные клетки и другие клетки, несущие рецептор к IgG или IgA. При желании, эффекторные клетки можно получать от субъекта, подлежащего лечению. Мишень-специфические эффекторные клетки можно вводить в виде суспензии клеток в физиологически приемлемом растворе. Число вводимых клеток может быть порядка 10^8 - 10^9 , но меняется в зависимости от терапевтической задачи. В целом количество должно быть достаточным для локализации на клетке-мишени, например опухолевой клетке, экспрессирующей РТК7, и для того, чтобы повлиять на киллинг клеток, например, за счёт фагоцитоза. Способы введения также могут меняться.

Терапию мишень-специфическими эффекторными клетками можно осуществлять в сочетании с другими методами для удаления нацеленных клеток. Например, противоопухолевую терапию с применением композиций (например, антител, полиспецифических и биспецифических молекул) по изобретению и/или эффекторные клетки, подкреплённые этими композициями, можно использовать в сочетании с химиотерапией. Кроме того, комбинированную терапию можно применять для того, чтобы направлять две различные популяции эффекторных клеток на отторжение опухолевых клеток. Например, антитела против РТК7, связанные с анти-Fc-гамма RI или анти-CD3, можно использовать в сочетании с IgG- или IgA-рецепторспецифическими связывающими агентами.

Биспецифические и полиспецифические молекулы по изобретению можно также использовать для модуляции уровней Fc α R или Fc γ R на эффекторных клетках, например, копированием или элиминированием рецепторов на клеточной поверхности. Для этой цели можно также использовать смеси анти-Fc-рецепторов.

Композиции (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по изобретению, которые имеют сайты связывания комплемента, такие как участки IgG1, -2 или -3, или IgM, которые связывают комплемент, также можно использовать в присутствии комплемента. В одном варианте изобретения *ex vivo* обработка популяции клеток, содержащих клетки-мишени, связывающим агентом по изобретению и подходящими эффекторными клетками может быть дополнена добавлением комплемента или сывороткой, содержащей комплемент. Фагоцитоз клеток-мишеней, покрытых связывающим агентом по изобретению, можно улучшить за счёт связывания белков комплемента. В другом варианте изобретения клетки-мишени, покрытые композициями (например, человеческими антителами, полиспецифическими и биспецифическими молекулами) по изобретению, можно также лизировать комплементом. Ещё в одном варианте изобретения композиции по изобретению не активируют комплемент.

Композиции (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по изобретению можно также вводить вместе с комплементом. Соответственно, в объём изобретения входят композиции, содержащие человеческие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и сыворотку или комплемент. Преимущество этих композиций заключается в том, что комплемент локализован в непосредственной близости к человеческим антителам, полиспецифическим или биспецифическим молекулам. Или же человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы по изобретению и комплемент или сыворотку можно вводит отдельно.

Соответственно, пациентам, которых лечат с помощью композиций антитела по изобретению, можно дополнительно вводить (до, во время или после введения человеческого антитела по изобретению) другой терапевтический агент, такой как цитотоксический или радиотоксический агент, который повышает или усиливает эффект человеческих антител.

В других вариантах изобретения субъекта можно дополнительно лечить с помощью агента, который модулирует, например повышает или ингибирует, экспрессию или активность Fc α или Fc γ рецепторов, например, давая субъекту цитокины. Предпочтительные цитокины для введения в процессе лечения полиспецифическими молекулами включают гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон- γ (IFN- γ) и фактор некроза опухолевых клеток (TNF).

Композиции (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы) по изобретению можно также использовать для нацеливания клеток, экспрессирующих Fc γ R или РТК7, например, на то, чтобы метить эти клетки. Для этой цели связывающий агент можно связывать с молекулой, которую следует обнаружить. Таким образом, изобретение включает способы определения местонахождения *ex vivo* и *in vitro* клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, такие как Fc γ R и РТК7. Детектируемая метка может представлять собой, например, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или

ферментный кофактор.

Также в объём настоящего изобретения входят наборы, содержащие композиции антитела по изобретению (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) и инструкции по применению. Набор может, кроме того, содержать один или более дополнительных реагентов, таких как иммунодепрессант, цитотоксический агент или радиотоксический агент или одно или более дополнительных человеческих антител по изобретению (например, человеческое антитело, обладающее комплементарной активностью, которое связывается с эпитопом в РТК7 антигене, отличное от первого человеческого антитела). Обычно наборы включают этикетку (ярлык) с указанием предполагаемого применения содержимого набора. Термин "этикетка, ярлык" включает любой печатный или письменный (зарегистрированный) материал, поставляемый с набором или на наборе или иным образом сопровождающий набор.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется нижеприведёнными примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех фигур и всех ссылочных материалов, патентов опубликованных патентных заявок, приведённых в заявке, ссылкой полностью вводится в данное описание.

Примеры

Пример 1. Получение человеческих моноклональных антител против РТК7.

Антиген.

В протоколах иммунизации используют в качестве антигена как (i) рекомбинантный слитый белок, содержащий внеклеточный участок РТК7 как с тус, так и с his меткой, так и (ii) мембраносвязанный полноразмерный РТК7. Оба антигена получают методами рекомбинантной трансфекции в СНО клеточной линии.

Трансгенные NuMAb и KM мыши™.

Полностью человеческие моноклональные антитела к РТК7 получают, используя HCo7 и HCo12 линии NuMAb трансгенных мышей и KM линии трансгенных трансхромосомных мышей, каждая из которых экспрессирует гены человеческих антител. В каждой из этих линий мышей эндогенный мышинный ген каппа лёгкой цепи гомозиготно разрывают (дизрупция), как описано в Chen et al. (1993), EMBO. J. 12: 811-820, а эндогенный мышинный ген тяжёлой цепи гомозиготно разрывают (дизрупция), как описано в примере 1 опубликованной заявки РСТ WO 01/09187. Каждая из этих линий мышей несёт человеческий трансген каппа лёгкой цепи, KCo5, описанный в Fishwild et al. (1996), Nature Biotechnology. 14: 845-851. Мыши линии HCo7 несут HCo7 трансген человеческой тяжёлой цепи, описанный в патентах США № 5770429; 5545806; 5625825 и 5545807. Мыши линии HCo12 несут HCo12 трансген человеческой тяжёлой цепи, описанный в примере 2 международной заявки WO 01/09187 или в примере 2 международной заявки WO 01/14424. Мыши линии KM содержат SC20 трансхромосому, описанную в опубликованной заявке РСТ WO 02/43478.

Иммунизация мышей NuMAb и KM.

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к РТК7 мышей NuMAb и KM мышей™ иммунизируют очищенным рекомбинантным РТК7 слитым белком и РТК7-трансфицированными СНО клетками в качестве антигена. Общие схемы иммунизации NuMAb мышей описаны в Lonberg, N. et al. (1994), Nature. 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996), Nature Biotechnology. 14: 845-851 и в опубликованной заявке РСТ WO 98/24884. Перед первой инфузией антигена берут мышей в возрасте 6-16 недель. Очищенный рекомбинантный препарат (5-50 мкг) слитого белка РТК7 в качестве антигена и $5-10 \times 10^6$ клеток используют для иммунизации NuMAb мышей и KM мышей™ интраперитонеально, подкожно (Sc) или инъекцией в подушечки лап.

Трансгенных мышей иммунизируют дважды антигеном в полном адьюванте Фрейнда или адьюванте РИБИ (Ribi) (и.п., IP), а затем в течение 3-21 дней IP (всего до 11 иммунизаций) антигеном в неполном адьюванте Фрейнда или адьюванте РИБИ. Иммунный ответ контролируют с помощью ретроорбитального кровоизлияния. Плазму изучают методом ELISA (как описано ниже) и мышей с достаточными титрами анти-РТК7 человеческих иммуноглобулинов используют для инфузии. Мышам вводят бустерную инъекцию антигена внутривенно за 3 дня до умерщвления и удаления селезёнки. Как правило, проводят 10-35 слияний для каждого антигена. Несколько дюжин мышей иммунизируют каждым антигеном.

Отбор мышей NuMAb или KM™, вырабатывающих антитела против РТК7.

Для отбора мышей NuMAb или KM™, вырабатывающих антитела, которые связывают РТК7, сыворотку иммунизированных мышей проверяют методом ELISA, как описано Fishwild, D. et al. (1996). Коротко говоря, микротитрационные планшеты покрывают очищенным рекомбинантным слитым белком РТК7 из трансфицированных СНО клеток с концентрацией 1-2 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунка, инкубируют при 4°C в течение ночи, затем блокируют, добавляя 200 мкл/лунка 5% фетальной бычьей сыворотки в PBS/Tween (Твин) (0,05%). В каждую лунку добавляют разведения сывороток РТК7-иммунизированных мышей и инкубируют 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывают с помощью PBS/Tween, а затем инкубируют с поликлональным антителом козы к человеческому IgG, конъюгированном с перок-

сидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмыwania планшеты обрабатывают АВТС субстратом (Sigma, А-1888, 0,22 мг/мл) и анализируют на спектрофотометре при OD 415-495. Мышей с наивысшими титрами антител против РТК7 используют для слияний. Слияния проводят, как описано ниже, и супернатанты гибридом проверяют на анти-РТК7 активность методом ELISA.

Получение гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела к РТК7.

Мышиные спленоциты, выделенные из NuMab мышей, сливают с ПЭГ с линией клеток мышшиной миеломы по стандартным протоколам. Затем проводят скрининг полученных гибридом на продуцирование антигенспецифических антител. Одноклеточные суспензии спленоцитов иммунизированных мышей сливают с одной четвёртой частью несекретирующих клеток мышшиной миеломы линии SP2/0 (ATCC, CRL 1581) с 50% PEG (Sigma). Клетки засевают при плотности около 1×10^5 /лунка в плоскодонный микротитрационный планшет с последующей инкубацией в течение двух недель в селективной среде, содержащей 10% бычьей сыворотки, 10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) кондиционированной среды, 3-5% origen (IGEN) в DMEM (Mediatech, CRL 10013, с высоким содержанием глюкозы, L-глутамином и пируватом натрия) плюс 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мг/мл гентамицина и $1 \times \text{HAT}$ (Sigma, CRL P-7185). Через 1-2 недели клетки культивируют в среде, в которой HAT заменяют на HT. Отдельные лунки подвергают скринингу с помощью ELISA (метод описан выше) на человеческие моноклональные IgG антитела против РТК7. Через 10-14 дней после начала интенсивного роста гибридом среду постоянно контролируют. Гибридомы, секретирующие антитело, заменяют, снова подвергают скринингу и моноклональные антитела против РТК7, если они всё ещё позитивны в отношении человеческого IgG, их субклонировать по меньшей мере дважды при ограниченном разведении. Стабильные субклоны затем культивируют *in vitro* для получения малых количеств антитела в тканевой культуральной среде для получения более подробных характеристик.

Для дальнейшего анализа выбирают клоны гибридом 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8.

Пример 2. Структурные характеристики человеческих моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8.

Последовательности ДНК, кодирующих переменные области тяжёлой и лёгкой цепей моноклональных антител 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8, получают с использованием 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8 гибридом соответственно методами традиционной ПЦР и секвенируют стандартными методами секвенирования ДНК.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области тяжёлой цепи 3G8 показаны на фиг. 1А и в SEQ ID NO: 41 и 1 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области лёгкой цепи 3G8 показаны на фиг. 1В и в SEQ ID NO: 45 и 5 соответственно.

Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 3G8 с известными последовательностями зародышевой линии тяжёлой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что тяжёлая цепь 3G8 использует V_H сегмент человеческой зародышевой линии V_H 3-30.3, неопределённый D сегмент и JH сегмент человеческой зародышевой линии JH 4b. Выравнивание 3G8 V_H последовательности с последовательностью зародышевой линии V_H 3-30.3 показано на фиг. 5. Дальнейший анализ 3G8 V_H последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей тяжёлой цепи, показанное на фиг. 1А и 5 и в SEQ ID NO: 11, 15 и 19 соответственно.

Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 3G8 с известными последовательностями зародышевой линии лёгкой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что лёгкая цепь 3G8 использует V_L сегмент человеческой зародышевой линии V_L L15 и JK сегмент человеческой зародышевой линии JK 1. Выравнивание 3G8 V_L последовательности с последовательностью зародышевой линии V_L L15 показано на фиг. 9. Дальнейший анализ 3G8 V_L последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей лёгкой цепи, показанное на фиг. 1В и 9 и в SEQ ID NO: 23, 29 и 35 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области тяжёлой цепи 3G8a показаны на фиг. 1А и в SEQ ID NO: 41 и 1 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области лёгкой цепи 3G8a показаны на фиг. 1С и в SEQ ID NO: 46 и 6 соответственно.

Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 3G8a с известными последовательностями зародышевой линии тяжёлой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что тяжёлая цепь 3G8a использует V_H сегмент человеческой зародышевой линии V_H 3-30.3, неопределённый D сегмент и JH сегмент человеческой зародышевой линии JH 4b. Выравнивание 3G8a V_H последовательности с последовательностью зародышевой линии V_H 3-30.3 показано на фиг. 5. Дальнейший анализ 3G8a V_H последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей тяжёлой цепи, показанное на фиг. 1А и 5 и в SEQ ID NO: 11, 15 и 19 соответственно.

Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 3G8a с известными последовательностями зародышевой линии лёгкой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что лёгкая цепь 3G8a использует V_L сегмент человеческой зародышевой линии V_K L15 и JK сегмент человеческой зародышевой линии JK 3. Выравнивание 3G8a V_L последовательности с последовательностью зародышевой линии V_K L15 показано на фиг. 9. Дальнейший анализ 3G8a V_L последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей лёгкой цепи, показанное на фиг. 1C и 9 и в SEQ ID NO: 24, 30 и 36 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области тяжёлой цепи 4D5 показаны на фиг. 2A и в SEQ ID NO: 42 и 2 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области лёгкой цепи 4D5 показаны на фиг. 2B и в SEQ ID NO: 47 и 7 соответственно.

Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 4D5 с известными последовательностями зародышевой линии тяжёлой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что тяжёлая цепь 4D5 использует V_H сегмент человеческой зародышевой линии V_H 3-30.3, неопределённый D сегмент и JH сегмент человеческой зародышевой линии JH 4b. Выравнивание 4D5 V_H последовательности с последовательностью зародышевой линии V_H 3-30.3 показано на фиг. 6. Дальнейший анализ 4D5 V_H последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей тяжёлой цепи, показанное на фиг. 2A и 6 и в SEQ ID NO: 12, 16 и 20 соответственно.

Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 4D5 с известными последовательностями зародышевой линии лёгкой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что лёгкая цепь 4D5 использует V_L сегмент человеческой зародышевой линии V_K A10 и JK сегмент человеческой зародышевой линии JK 5. Выравнивание 4D5 V_L последовательности с последовательностью зародышевой линии V_K A10 показано на фиг. 10. Дальнейший анализ 4D5 V_L последовательности с применением системы Kabat определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей лёгкой цепи, показанное на фиг. 2B и 10 и в SEQ ID NO: 25, 31 и 37 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области тяжёлой цепи 12C6 показаны на фиг. 3A и в SEQ ID NO: 43 и 3 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области лёгкой цепи 12C6 показаны на фиг. 3B и в SEQ ID NO: 48 и 8 соответственно.

Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 12C6 с известными последовательностями зародышевой линии тяжёлой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что тяжёлая цепь 12C6 использует V_H сегмент человеческой зародышевой линии V_H DP44, неопределённый D сегмент и JH сегмент человеческой зародышевой линии JH 4b. Выравнивание 12C6 V_H последовательности с последовательностью зародышевой линии V_H DP44 показано на фиг. 7. Дальнейший анализ 12C6 V_H последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей тяжёлой цепи, показанное на фиг. 3A и 7 и в SEQ ID NO: 13, 17 и 21 соответственно.

Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 12C6 с известными последовательностями зародышевой линии лёгкой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что лёгкая цепь 12C6 использует V_L сегмент человеческой зародышевой линии V_K A27 и JK сегмент человеческой зародышевой линии JK 2. Выравнивание 12C6 V_L последовательности с последовательностью зародышевой линии V_K A27 показано на фиг. 11. Дальнейший анализ 12C6 V_L последовательности с применением системы Kabat определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей лёгкой цепи, показанное на фиг. 3B и 11 и в SEQ ID NO: 26, 32 и 38 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области тяжёлой цепи 12C6a показаны на фиг. 3A и в SEQ ID NO: 43 и 3 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области лёгкой цепи 12C6a показаны на фиг. 3C и в SEQ ID NO: 49 и 9 соответственно.

Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 12C6a с известными последовательностями зародышевой линии тяжёлой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что тяжёлая цепь 12C6a использует V_H сегмент человеческой зародышевой линии V_H DP44, неопределённый D сегмент и JH сегмент человеческой зародышевой линии JH 4b. Выравнивание 12C6a V_H последовательности с последовательностью зародышевой линии V_H DP44 показано на фиг. 7. Дальнейший анализ 12C6a V_H последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей тяжёлой цепи, показанное на фиг. 3A и 7 и в SEQ ID NO: 13, 17 и 21 соответственно.

Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 12C6a с известными последовательностями зародышевой линии лёгкой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что лёгкая цепь 12C6a использует V_L сегмент человеческой зародышевой линии V_K L15 и JK сегмент человеческой зародышевой линии JK 2. Выравнивание 12C6a V_L последовательности с последовательностью зародышевой линии V_K L15 показано на фиг. 12. Дальнейший анализ 12C6a V_L последовательности с применением

системы Kabat определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей лёгкой цепи, показанное на фиг. 3С и 12 и в SEQ ID NO: 27, 33 и 39 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжёлой цепи 7С8 показаны на фиг. 4А и в SEQ ID NO: 44 и 4 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области лёгкой цепи 7С8 показаны на фиг. 4В и в SEQ ID NO: 50 и 10 соответственно.

Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 7С8 с известными последовательностями зародышевой линии тяжёлой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что тяжёлая цепь 7С8 использует V_H сегмент человеческой зародышевой линии V_H 3-33, D сегмент человеческой зародышевой линии 3-10 и JH сегмент человеческой зародышевой линии JH 6b. Выравнивание 7С8 V_H последовательности с последовательностью зародышевой линии V_H 3-33 показано на фиг. 8. Дальнейший анализ 7С8 V_H последовательности с применением системы Kabat для определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей тяжёлой цепи, показанное на фиг. 4А и 8 и в SEQ ID NO: 14, 18 и 22 соответственно.

Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 7С8 с известными последовательностями зародышевой линии лёгкой цепи человеческого иммуноглобулина показывает, что лёгкая цепь 7С8 использует V_L сегмент человеческой зародышевой линии V_L L6 и JK сегмент человеческой зародышевой линии JK 3. Выравнивание 7С8 V_L последовательности с последовательностью зародышевой линии V_L L6 показано на фиг. 13. Дальнейший анализ 7С8 V_L последовательности с применением системы Kabat определения области CDR даёт изображение CDR1, CDR2 и CDR3 областей лёгкой цепи, показанное на фиг. 4В и 13 и в SEQ ID NO: 28, 34 и 40 соответственно.

Пример 3. Мутация mAb 12С6 и использование альтернативной зародышевой линии.

Как обсуждается выше, в примере 2, моноклональные антитела 12С6 и 12С6а используют вариабельную область тяжёлой цепи, образованную из человеческой последовательности зародышевой линии DP44, присутствующей в трансгене HCo7 мышей линии HuMab Mouse®. Так как DP44 не является последовательностью зародышевой линии, которая используется в спектре нативных человеческих иммуноглобулинов, может быть предпочтительной мутация V_H последовательности моноклональных антител 12С6 и 12С6а для снижения потенциальной иммуногенности. Предпочтительно осуществляют мутацию одного или более каркасных остатков V_H последовательности моноклональных антител 12С6 или 12С6а в остаток (остатки), имеющийся (имеющиеся) в каркасе родственной по структуре V_H последовательности зародышевой линии, которая используется в спектре нативных человеческих иммуноглобулинов. Например, на фиг. 7 показано выравнивание V_H последовательности моноклональных антител 12С6 и 12С6а с последовательностью DP44 зародышевой линии, а также с двумя структурно родственными человеческими последовательностями зародышевых линий, V_H 3-23 и V_H 3-7. Учитывая родство (сходство) этих последовательностей, можно предсказать, что можно выбрать человеческое антитело, которое специфически связывается с человеческим РТК7 и использует V_H область из последовательности V_H 3-23 или V_H 3-7 зародышевой линии. Кроме того, можно осуществить мутацию одного или более остатков в V_H последовательности моноклональных антител 12С6 или 12С6а, которые отличаются от остатка (остатков) в сопоставимом положении в последовательности V_H 3-23 или V_H 3-7, с остатком (остатками) в V_H 3-23 или V_H 3-7 или с их консервативными аминокислотными заменами.

Пример 4. Исследование специфичности связывания и кинетики связывания человеческих моноклональных антител против РТК7.

В данном примере аффинность связывания и кинетику связывания антител против РТК7 изучают методом поверхностного плазмонного резонанса с оптическим сенсором Biacore. Специфичность связывания и конкурентное перекрёстное связывание изучают проточной цитометрией.

Изучение специфичности связывания методом проточной цитометрии.

Выращивают линии клеток НЕК3, которые экспрессируют рекомбинантную человеческую РТК7 на поверхности клетки, и используют для определения специфичности РТК7 человеческих моноклональных антител методом проточной цитометрии. НЕК3 клетки трансфицируют при использовании плазмид экспрессии, содержащих полноразмерные кДНК, кодирующие трансмембранные формы РТК7. Связывание 7С8 - человеческого моноклонального антитела против РТК7 - оценивают, инкубируя трансфицированные клетки с моноклональным антителом против РТК7 с концентрацией 10 мкг/мл. Клетки отмывают и связывание обнаруживают с помощью меченого FITC Ab к человеческому IgG. Анализ проточной цитометрией осуществляют, используя проточную цитометрию FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Результаты показаны на фиг. 14. Человеческое моноклональное антитело против РТК7, 7С8, связывается с НЕК3 клетками, трансфицированными с помощью РТК7, но не с НЕК3 клетками, которые не были трансфицированы при использовании человеческой РТК7. Эти данные демонстрируют специфичность человеческих моноклональных антител против РТК7 к РТК7.

Изучение специфичности связывания методом ELISA.

Связывание антител против РТК7 оценивают также стандартным методом ELISA с целью изучения специфичности связывания с РТК7.

Рекомбинантный внеклеточный домен РТК7 оценивают также на связывание с человеческими моноклональными антителами против РТК7 3G8, 4D5, 12C6 и 12C6a при различных концентрациях. Проводят стандартные анализы ELISA. Человеческие моноклональные антитела против РТК7 добавляют в начальной концентрации 10 мкг/мл и готовят серийные разведения при разведении 1:2. Поликлональное антитело козы против человеческого IgG (специфическое к цепи каппа), конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP), используют в качестве вторичного антитела. Результаты показаны на фиг. 15. Каждое из человеческих моноклональных антител против РТК7 - 3G8, 4D5, 12C6 и 12C6a - связывается с РТК7. Эти данные демонстрируют специфичность человеческих моноклональных антител против РТК7 к РТК7.

Эпитопное картирование антител против РТК7.

Для определения классификации эпитопов HuMabs против РТК7 применяют проточную цитометрию. Клетки опухоли Вильмса G-401 (ATCC Acc No. CRL-1441) трансфицируют при использовании плазмид экспрессии, содержащих полноразмерные кДНК, кодирующие трансмембранные формы РТК7. Связывание эпитопом каждого человеческого моноклонального антитела против РТК7 определяют, инкубируя 1×10^5 трансфицированных клеток с 10 мкг/мл холодного раствора человеческого моноклонального антитела против РТК7, отмывают, а затем добавляют 10 мкг/мл конъюгата человеческого моноклонального антитела против РТК7 с флуоресцентной меткой. Связывание обнаруживают с помощью FITC-меченого Ab против человеческого IgG. Анализ проточной цитометрией осуществляют, используя проточную цитометрию FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). В результате анализа данных антитела против РТК7 распределяют по 3 группам эпитопов: группа А, которая включает 7D11, группа В, которая включает 3G8 и 3G8a, и группа С, которая включает 7C8, 12C6 и 12C6a.

Пример 5. Изучение характеристик связывания антитела против РТК7 с РТК7, экспрессируемой на поверхности человеческих раковых клеток.

Клетки линии опухоли Вильмса (нефробластомы) G-401 (ATCC Acc No. CRL-1441) проверяют на связывание HuMab человеческих моноклональных антител против РТК7 - 12C6 и 7C8 - при различных концентрациях. Связывание человеческих моноклональных антител против РТК7 определяют, инкубируя 1×10^5 клеток с антителом с начальной концентрацией 30 мкг/мл, и готовят серийные разведения 1:10. Клетки отмывают и связывание обнаруживают при использовании PE-меченых Ab против человеческого IgG. Анализ проточной цитометрией осуществляют, используя проточную цитометрию FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Результаты показаны на фиг. 16. Судя по средним значениям интенсивности флуоресценции (MFI), моноклональные антитела против РТК7 - 12C6 и 7C8 - связываются с клетками опухолевой линии нефробластомы Вильмса в зависимости от концентрации. Значения EC_{50} для моноклональных антител против РТК7 - 12C6 и 7C8 - равны 4,035 и 3,428 нМ соответственно.

Эти данные демонстрируют, что HuMabs против РТК7 связываются с клетками линии рака почки.

Пример 6. Связывание человеческого антитела против РТК7 с линиями раковых клеток.

Антитела против РТК7 проверяют на связывание с различными линиями раковых клеток с помощью проточной цитометрии.

Связывание человеческих моноклональных антител против РТК7 - 3G8, 12C6a, 4D5 и 12C6 - с панелью линий раковых клеток оценивают, инкубируя линии раковых клеток с человеческими моноклональными антителами против РТК7 в концентрации 10 мкг/мл. Проверяют следующие линии раковых клеток: A-431 (ATCC Acc No. CRL-1555), клетки опухоли Вильмса G-401 (ATCC Acc No. CRL-1441), Saos-2 (ATCC Acc No. HTB-85), SKOV-3 (ATCC Acc No. HTB-77), PC3 (ATCC Acc No. CRL-1435), DMS 114 (ATCC Acc No. CRL-2066), ACHN (ATCC Acc No. CRL-1611), LNCaP (ATCC Acc No. CRL-1740), DU 145 (ATCC Acc No. HTB-81), LoVo (ATCC Acc No. CCL-229) и MIA PaCa-2 (ATCC Acc No. CRL-1420). В качестве негативного контроля берут антитело для изотипного контроля. Клетки отмывают и связывание обнаруживают с помощью меченого FITC Ab против человеческого IgG. Анализ проточной цитометрией осуществляют, используя проточную цитометрию FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Результаты показаны на фиг. 17. Моноклональные антитела против РТК7 - 3G8, 12C6a, 4D5 и 12C6 - связываются с линиями раковых клеток A-431, клетками опухоли Вильмса G-401, Saos-2, SKOV-3, PC3, DMS 114, ACHN, LNCaP, DU 145, LoVo и MIA PaCa-2, как показывает измерение средних величин интенсивности флуоресценции (MFI). Эти данные демонстрируют, что HuMabs против РТК7 связываются с рядом раковых клеток, которые экспрессируют РТК7 на поверхности клетки.

Пример 7. Связывание антител против РТК7 с Т-, В- и дендритными клетками.

Проточной цитометрией проверяют связывание антител против РТК7 с CD4+, CD8+ Т-клетками, CD19+ В-клетками и человеческими миелоидными дендритными клетками крови, экспрессирующими РТК7 на поверхности клетки.

Перед связыванием с человеческим моноклональным антителом против РТК7 человеческие Т-клетки активируют с помощью антитела против CD3, чтобы индуцировать экспрессию РТК7 на

Т-клетках. Связывание человеческого моноклонального антитела против РТК7-7с8 -оценивают, инкубируя клетки с человеческими моноклональными антителами против РТК7 в концентрации 10 мкг/мл. В некоторых экспериментах известное антитело, которое связывается со специфическим маркером Т- и В-клеток, используют в качестве позитивного маркера. Клетки отмывают и связывание обнаруживают с помощью меченого FITC Ab против человеческого IgG. Анализ проточной цитометрией осуществляют, используя проточную цитометрию FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Результаты показаны на фиг. 18 (активированные Т- и В-клетки) и 19 (дендритные клетки). Моноклональное антитело 7С8 против РТК7 связывается с активированными человеческими CD4+, CD8+ Т-клетками и дендритными клетками, но не с В-клетками, как показывает измерение средних величин интенсивности флуоресценции (MFI). Эти данные демонстрируют, что HuMabs против РТК7 связываются с человеческими Т-клетками и дендритными клетками.

Пример 8. Интернализация моноклонального антитела против РТК7.

Способность HuMabs против РТК7 интернализироваться в РТК7-экспрессирующие линии клеток проверяют с помощью анализа интернализации с применением поликлонального антитела HumZap. Анализ с применением HumZap позволяет проверять интернализацию первичного антитела с помощью связывания вторичного антитела с аффинностью к человеческому IgG, конъюгированному с токсином сапорином.

Экспрессирующие РТК7 линии раковых клеток опухоли Вильмса G-401 (ATCC Acc No. CRL-1441), A-431 (ATCC Acc No. CRL-1555) и PC3 (ATCC Acc No. CRL-1435) засевают при плотности 1×10^4 клеток/лунка непосредственно в лунки на 100 мкл. Антитела HuMab против РТК7 - 3G8, 4D5, 12C6 или 7C8 - добавляют в лунки в начальной концентрации 30 нМ и титруют в серийных разведениях 1:3. Антитело изотипного контроля, неспецифическое к РТК7, используют в качестве негативного контроля. Поликлональное антитело HumZap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25) добавляют в концентрации 11 нМ и планшеты инкубируют в течение 72 ч. Затем планшеты в течение 24 ч выдерживают в пульсовом режиме с 1,0 мкКи ^3H -тимидина, собирают и считывают на сцинтилляционном счётчике Top Count Scintillation Counter (Packard Instruments, Meriden, CT). Результаты показаны на фиг. 20А-20D. Для антител против РТК7 - 3G8, 4D5, 12C6 и 7C8 - наблюдается зависимое от концентрации антитела снижение включения ^3H -тимидина в экспрессирующую РТК7 линию раковых клеток опухоли Вильмса. В случае антител 12C6 и 7C8 против РТК7 наблюдается зависимое от концентрации антитела включение ^3H -тимидина в экспрессирующие РТК7 линии раковых клеток А-431 и РС3. Величина EC_{50} для антител против РТК7 - 3G8, 4D5, 12C6 и 7C8 - в клетках опухоли Вильмса равна 0,6437, 0,2516, 0,2053 и 0,1788 нМ соответственно. Величина EC_{50} для антител против РТК7 - 12C6 и 7C8 - в клетках А-431 равна 0,1657 и 0,1826 нМ соответственно. Величина EC_{50} для антител против РТК7 - 12C6 и 7C8 - в опухолевых клетках РС3 равна 0,3175 и 0,2648 нМ соответственно. Эти данные демонстрируют, что антитела 3G8, 4D5, 12C6 и 7C8 против РТК7 интернализуются в раковые клетки.

Пример 9. Оценка киллинга клеток конъюгированным с токсином антителом против РТК7 на человеческих раковых клеточных линиях.

В данном примере в анализе клеточной пролиферации проверяют способность моноклональных антител против РТК7, конъюгированных с токсином, убивать РТК7+ человеческие раковые клеточные линии.

HuMab антитело против РТК7, 12С6а, конъюгируют с токсином через линкер, такой как пептидный линкер, гидразон или дисульфидный линкер. Примеры токсинов, которые могут конъюгировать с антителами по настоящему изобретению, описаны в зарегистрированной заявке с No. у патентного поверенного 04280/100M629US3, поданной 26 сентября 2005 г. Человеческие клетки рака почки (опухоли Вильмса) линии G-401 (ATCC Acc No. CRL-1441), экспрессирующие РТК7, засевают при плотности 10^4 клеток/лунка в лунки на 100 мкл на 3 ч. В лунки добавляют конъюгат антитело против РТК7-токсин в начальной концентрации 100 нМ, готовят серийные разведения 1:3 и титруют их. Планшеты оставляют инкубироваться в течение 48 ч. Затем планшеты выдерживают в пульсовом режиме с 1 мкКи ^3H -тимидина в течение 24 ч, прекращают культивирование, собирают и считают с помощью сцинтилляционного счётчика Top Count Scintillation Counter (Packard Instruments). На фиг. 21 показано действие конъюгата антитела 12С6а на клетки опухоли Вильмса. Для антитела против РТК7- 12С6а - наблюдается зависимое от концентрации конъюгата антитело-токсин уменьшение включения ^3H -тимидина в экспрессирующую РТК7 линию почечных раковых клеток опухоли Вильмса.

Эти данные демонстрируют, что антитела против РТК7, конъюгированные с токсином, проявляют специфическую токсичность к человеческим почечным раковым клеткам.

Пример 10. Оценка киллинга клеток конъюгированным с токсином антителом против РТК7 на человеческих раковых клеточных линиях.

В данном примере в анализе клеточной пролиферации проверяют способность моноклональных антител против РТК7, конъюгированных с токсином, убивать РТК7+ человеческие раковые клеточные линии, на поверхности которых наблюдаются низкие, промежуточные или высокие уровни экспрессии РТК7.

HuMab антитело против РТК7, 12С6а, конъюгируют с токсином через линкер, такой как пептидильный линкер, гидразон или дисульфидный линкер. Примеры токсинов, которые могут конъюгировать с антителами по настоящему изобретению, описаны в зарегистрированной заявке с No. у патентного поверенного 04280/100M629US3, поданной 26 сентября 2005 г. Линии раковых клетки человеческих опухолей, А-431, SKOV3 и LoVo, экспрессирующие РТК7, засевают при плотности 10^4 клеток/лунка в лунки на 100 мкл. Сначала линии клеток проверяют на экспрессию РТК7 на клеточной поверхности стандартным FACS анализом. Клеточная линия А-431 показывает наивысший уровень экспрессии РТК7 на клеточной поверхности, а клетки линии LoVo показывают самый низкий уровень экспрессии РТК7 на клеточной поверхности. Конъюгат антитело против РТК7-токсин добавляют в начальной концентрации 20 нМ, готовят серийные разведения 1:2 и определяют их титры. Антитело изотипного контроля используют в качестве негативного контроля. Планшеты оставляют инкубироваться в течение 3 ч и несвязанные (свободные) конъюгаты антитело-токсин отмывают. Планшеты продолжают инкубировать в течение 96 ч и киллерную активность (FU, единица флуоресценции) определяют по жизнеспособности клеток с помощью люминесцентного анализа CellTiter-Glo® в соответствии с протоколом (Promega, WI, USA, Technical bulletin No. 288) на ридере BIO-ТЕК (Bio-Tek Instruments, Inc, VT, USA). Результаты показаны на фиг. 22. Конъюгат антитело против РТК7-токсин проявляет зависящее от концентрации конъюгата антитело-токсин снижение активности в анализе пролиферации экспрессирующих РТК7 клеток линий А431^{high}, SKOV3^{inter} и LoVo^{low}.

Эти данные демонстрируют, что антитела против РТК7, конъюгированные с токсином, проявляют специфическую токсичность к различным человеческим раковым клеткам.

Пример 11. Иммуногистохимические исследования при использовании антител 3G8, 12С6а, 2E11.

Иммуногистохимическим анализом на клинических образцах биопсий тканей рака лёгкого, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака яичника, рака тонкого кишечника и рака простаты изучают способность HuMabs против РТК7, 3G8, 12С6а и 2E11, узнавать РТК7.

Для иммуногистохимического анализа используют замороженные гистологические срезы 5 мкм (Arctis Inc, USA). Срезы высушивают в течение 30 мин, фиксируют в ацетоне (при комнатной температуре в течение 10 мин) и высушивают на воздухе в течение 5 мин. Препараты отмывают в PBS, а затем преинкубируют с 10% нормальной козьей сыворотки в PBS в течение 20 мин, а затем инкубируют с 10 мкг/мл меченого FITC антитела в PBS с 10% нормальной козьей сывороткой в течение 30 при комнатной температуре. Далее препараты три раза отмывают PBS и инкубируют 30 мин с мышинным антителом, меченым FITC (10 мкг/мл ДАКО) при комнатной температуре. Препараты снова отмывают PBS и инкубируют с конъюгатом антитела козы против мышинного иммуноглобулина с HRP (ДАКО) в течение 30 мин при комнатной температуре. Препараты снова отмывают 3×PBS. При использовании в качестве субстрата диаминобензидина (Sigma) получают коричневое окрашивание. Отмывают дистиллированной водой, препараты окрашивают для подсчёта гематоксицином в течение 1 мин. Затем препараты отмывают в течение 10 с в проточной дистиллированной воде и заключают в глицергель (ДАКО). Иммуногистохимическое окрашивание биоптатов выявляет позитивное окрашивание в срезах рака лёгкого, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака яичника, рака тонкого кишечника и рака простаты. Нормальная ткань всегда негативна к окрашиванию РТК7, тогда как в тканях злокачественной опухоли наблюдается, что как активированные раковым заболеванием фибробласты, так и раковые эпителиальные клетки позитивны к РТК7 окрашиванию. Идентичность активированных раковым заболеванием фибробластов подтверждается в срезах рака мочевого пузыря и рака молочной железы окрашиванием антителом к антигену Fibroblast Activation Protein (FAP, Alexis Biochemicals, San Diego, USA). FAP является известным маркером активированных раком фибробластов (Hofheinz et al. (2003), *Oncologie*. 26: 44-48).

Пример 12. Анализ инвазии.

В данном примере антитела к РТК7 проверяют на способность влиять на инвазию клеток в СНО клеточной линии, трансфицированной с помощью РТК7. Анализ в системе HTS 96 - Multiwell Insert System (96-луночная система-вставка) (Cat. No. 351162, BD Biosciences, CA) в соответствии с протоколом. Перед тем как добавлять клетки во вкладыши, одну из клеточных линий, либо СНО родительскую клеточную линию, либо СНО клетки, трансфицированные полноразмерной РТК7, либо контрольную линию клеток, НЕК293, смешивают либо с пулом анти-РТК7 HuMabs, либо с антителом изотипного контроля. Смесь (клетки+Ab пул) добавляют в лунку вкладыша (вставки) планшета для изучения инвазии. Инкубируют при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 ч, клетки метят флуоресцентным красителем и клетки, ко-

торые попадают на нижнюю поверхность мембраны, определяют количественно с помощью планшет-ридера флуоресценции. Результаты показаны на фиг. 23. Эти данные демонстрируют, что антитела против РТК7 ингибируют подвижность инвазии клеток, экспрессирующих РТК7 на клеточной поверхности.

Пример 13. Лечение *in vivo* модели ксенотрансплантата панкреатических раковых клеток с применением свободных и конъюгированных с цитотоксином антител против РТК7.

В данном примере раскрывается *in vivo* лечение мышей, которым имплантированы опухолевые клетки рака поджелудочной железы, с помощью конъюгированных с токсином антител против РТК7 с целью изучения *in vivo* действия антител на рост опухоли.

Клетки НРАС (аденокарциномы поджелудочной железы человека, ATCC Accession Number CRL-2119) или другие подходящие раковые клетки поджелудочной железы размножают *in vitro* стандартными лабораторными методами. 6-8-недельным самцам Ncr бестимусных "голых" мышей (Taconic, Hudson, NY) подкожно имплантируют в левый бок по $2,5 \times 10^6$ НРАС клеток в 0,2 мл PBS/Матригель (1:1) на мышшь. Мышей взвешивают и с помощью электронного калипера определяют размеры опухоли по трём направлениям (трёхмерно) дважды в неделю после имплантации. Объем опухоли вычисляют по формуле $\text{высота} \times \text{ширина} \times \text{длина} / 2$. Мышей с НРАС опухолями со средним объёмом 90 мм^3 произвольно делят на экспериментальные группы. В день 0 мышам внутривенно вводят единичную дозу, содержащую носитель PBS, свободное ("голое") антитело против РТК7 или конъюгированное с токсином HuMAb против РТК7 в предписанных дозах (мкмоль/кг). Примеры токсинов, которые можно конъюгировать с антителами по настоящему изобретению, описаны в находящейся на рассмотрении патентной заявке США, регистрационный номер 11/134826 и в находящейся на рассмотрении патентной заявке США под названием MEDX-0034US4. Мониторинг роста опухоли у мышей ведут в течение 61 дня после введения дозы. Мышей умерщвляют, когда опухоли достигают конечной величины (2000 мм^3) или изъязвляются. Антитела против РТК7, конъюгированные с токсином, замедляют прогрессирование роста опухоли. Результаты показаны на фиг. 24. Противоопухолевое действие конъюгата антитело против РТК7-токсин зависит от дозы, причём наивысший эффект наблюдается при дозе 0,3 мкмоль/кг. Лечение с помощью конъюгата антитело против РТК7-токсин хорошо переносится, у субъектов никогда не наблюдалась средняя величина потери веса выше 5% (данные не показаны). Таким образом, обработка конъюгатом антитело против РТК7-токсин оказывает непосредственный *in vivo* ингибирующий эффект на рост раковой опухоли поджелудочной железы.

Пример 14. Лечение *in vivo* модели ксенотрансплантата раковых клеток молочной железы с применением свободных и конъюгированных с цитотоксином антител против РТК7.

В данном примере раскрывается *in vivo* лечение мышей, которым имплантированы резистентные к адриамицину опухолевые клетки рака молочной железы, с помощью конъюгированных с токсином антител против РТК7 с целью изучения *in vivo* действия антител на рост опухоли.

Клетки MCF7-adr (человеческая клеточная линия рака молочной железы, резистентная к адриамицину) размножают *in vitro* стандартными лабораторными методами. 6-8-недельным самкам CB17.SCID мышей (Taconic, Hudson, NY) в область шеи подкожно имплантируют 1,7 мг гранул с эстрогеном, высвобождающимся в течение 90 дней, размером 3,0 мм (Innovative Research of America, Sarasota, FL), за один день до подкожной имплантации в правый бок 10×10^6 клеток MCF7-Adr в 0,2 мл PBS/Матригель (1:1) на мышшь. Мышей взвешивают и с помощью электронного калипера определяют размеры опухоли по трём направлениям (трёхмерно) дважды в неделю после имплантации. Объем опухоли вычисляют по формуле $\text{высота} \times \text{ширина} \times \text{длина} / 2$.

Мышей с MCF7-adr опухолями со средним объёмом 160 мм^3 произвольно делят на экспериментальные группы. В день 0 мышам внутривенно вводят единичную дозу, 0,1 мкмоль/кг, содержащую носитель PBS, свободное ("голое") антитело против РТК7 или конъюгированное с токсином HuMAb против РТК7. Примеры токсинов, которые можно конъюгировать с антителами по настоящему изобретению, описаны в находящейся на рассмотрении патентной заявке США, регистрационный номер 11/134826 и в находящейся на рассмотрении патентной заявке США под названием MEDX-0034US4. Мониторинг роста опухоли у мышей ведут в течение 63 дней после введения дозы. Мышей умерщвляют, когда опухоли изъязвляются. Результаты показаны на фиг. 25. Антитела против РТК7, конъюгированные с токсином, замедляют прогрессирование роста опухоли. Таким образом, обработка конъюгатом антитело против РТК7-токсин оказывает непосредственный *in vivo* ингибирующий эффект на рост раковой опухоли молочной железы.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	VH a.a. 3G8, 3G8a	23	VK CDR1 a.a. 3G8
2	VH a.a. 4D5	24	VK CDR1 a.a. 3G8a
3	VH a.a. 12C6, 12C6a	25	VK CDR1 a.a. 4D5
4	VH a.a. 7C8	26	VK CDR1 a.a. 12C6
		27	VK CDR1 a.a. 12C6a
5	VK a.a. 3G8	28	VK CDR1 a.a. 7C8
6	VK a.a. 3G8a		
7	VK a.a.4D5	29	VK CDR2 a.a. 3G8
8	VK a.a. 12C6	30	VK CDR2 a.a. 3G8a
9	VK a.a. 12C6a	31	VK CDR2 a.a. 4D5
10	VK a.a. 7C8	32	VK CDR2 a.a. 12C6
		33	VK CDR2 a.a. 12C6a
11	VH CDR1 a.a. 3G8	34	VK CDR2 a.a. 7C8
12	VH CDR1 a.a. 4D5		
13	VH CDR1 a.a. 12C6	35	VK CDR3 a.a. 3G8
14	VH CDR1 a.a. 7C8	36	VK CDR3 a.a. 3G8a
		37	VK CDR3 a.a. 4D5
15	VH CDR2 a.a. 3G8	38	VK CDR3 a.a. 12C6
16	VH CDR2 a.a. 4D5	39	VK CDR3 a.a. 12C6a
17	VH CDR2 a.a. 12C6	40	VK CDR3 a.a. 7C8
18	VH CDR2 a.a. 7C8		
		41	VH n.t. 3G8, 3G8a
19	VH CDR3 a.a. 3G8	42	VH n.t. 4D5
20	VH CDR3 a.a. 4D5	43	VH n.t. 12C6, 12C6a
21	VH CDR3 a.a. 12C6	44	VH n.t. 7C8
22	VH CDR3 a.a. 7C8		
45	VK n.t. 3G8	51	VH 3-30.3 зародышев. а.а.
46	VK n.t. 3G8a	52	VH DP44 зародышев а.а.
47	VK n.t. 4D5	53	VH 3-33 зародышев а.а.
48	VK n.t. 12C6		
49	VK n.t. 12C6a	54	VK L15 зародышев а.а.
50	VK n.t. 7C8	55	VK A10 зародышев а.а.
		56	VK A27 зародышев а.а.
		57	VK L6 зародышев а. а.
		58	РТК7 а.а.
		59	ЛН4b зародышев а.а
		60	ЛН4b зародышев а.а.
		61	3-7 зародышев а.а.
		62	3-23 зародышев а.а.
		63	ЛН4b зародышев а.а
		64	ЛН6b зародышев а.а.
		65	ЛК1 зародышев а.а.
		66	ЛК5 зародышев а.а.
		67	ЛК2 зародышев а.а.
		68	ЛК2 зародышев а.а.
		69	ЛК3 зародышев а.а.

<110> МЕДАРЕКС, ИНК.

<120> ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К
ПРОТЕИНТИРОЗИНКИНАЗЕ 7 (РТК7) И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ
АНТИТЕЛ ПРОТИВ РТК7

<130> MXI-345PC

<140>

<150> 60/748,373
<151> 2005-12-08

<160> 69

<170> Patcntln Ver. 3.3

<210> 1
<211> 116
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 1
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys 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
Ala Arg Glu Val Trp Ser Ile Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 115
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

017812

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

<210> 3
 <211> 112
 <212> EBJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Thr Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 4
 <211> 126
 <212> EBJOK
 <213> Homo sapiens

017812

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val 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
 Ala Arg Asp Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Thr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 5
 <211> 107
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

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

017812

<210> 6
 <211> 107
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 107
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

017812

<210> 8
 <211> 109
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 107
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

017812

<210> 10
 <211> 108
 <212> ББЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 5
 <212> ББЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Asn Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 12
 <211> 5
 <212> ББЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Ser Tyr Ala Phe His
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> ББЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Thr Tyr Leu Met Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 17
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 10

Gly

<210> 17
 <211> 16
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Ala Ile Gly Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 17
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 19
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Glu Val Trp Ser Ile Asp Asn
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 21
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 21 Gly
 Leu Gly Tyr 1

<210> 22
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Asp Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Tyr Gly Thr Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 23
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

017812

<400> 24
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 25
 <211> 11
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
 1 5 10

<210> 26
 <211> 12
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 11
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

017812

<210> 30
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 30
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 31
Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 32
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 33 <211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 33
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 34
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 35
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 3S
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 36
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

 <210> 37
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 37
 His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile Thr
 1 5

 <210> 38
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 38
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
 1 5 10

 <210> 39
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 39
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

 <210> 40
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 40
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

 <210> 41
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(348)

<400> 41
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
tcc ctg cga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc atc ttc agt aac tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gca gtt ata tca tat gat gga aac aat aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga gag gtc tgg agt att gac aac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
Ala Arg Glu Val Trp Ser Ile Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
acc gtc tcc tca 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 345
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(345)

<400> 42
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

```

017812

gct ttc cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tca tat gat gga agc att aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg agg acg tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc 336
Ala Arg Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

gtc tcc tca 345
Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 336
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(336)

<400> 43
gag gtt cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cat cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca ggc tct gga ttc acc ttc agt acc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

ctt atg tac tgg gtt cgc cag gct cca gga aaa act ctg gag tgg gtc 144
Leu Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Thr Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gct att ggt tct ggt ggt gat aca tac tat gca gac tcc gtg aag 192
Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ttg tat ctt 240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80


```

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(321)

<400> 45
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

```

```

<210> 46
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(321)

<400> 46
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

```

017812

```

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50                               55                               60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                               70                               75                               80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cca ttc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
   85                               90                               95

act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
   100                               105

<210> 47
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(321)

<400> 47
gaa att gtg ctg act cag tct cca gac ttt cag tct gtg act cca aag 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1                               5                               10                               15

gag aaa gtc acc atc acc tgc cgg gcc agt cag agc att ggt agt agc 96
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20                               25                               30

tta cac tgg tac cag cag aaa cca gat cag tct cca aag ctc ctc atc 144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35                               40                               45

aag tat gct tcc cag tcc ttc tca ggg gtc ccc tcg agg ttc agt ggc 192
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50                               55                               60

agt gga tct ggg aca gat ttc acc ctc acc atc aat agc ctg gaa gct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65                               70                               75                               80

gaa gat gct gca gcg tat tac tgt cat cag agt agt agt tta ccg atc 288
Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile
   85                               90                               95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
   100                               105

```

017812

<210> 48
 <211> 327
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
 <222> (1) .. (327)

```

<400> 48
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1           5           10          15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
  20           25           30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
  35           40           45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
  50           55           60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
  65           70           75

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccc 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
  85           90           95

atg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 327
Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
  100          105
  
```

<210> 49
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
 <222> (1) .. (321).

```

<400> 49
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1           5           10          15
  
```

017812

```

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
                20                      25                      30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
                35                      40                      45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                      55                      60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
                65                      70                      75

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cag tac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
                85                      90                      95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100                      105

```

```

<210> 50
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<222> (1)..(324)

```

```

<400> 50
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                1                      5                      10                      15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc atc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr
                20                      25                      30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
                35                      40                      45

tat gat gca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
                50                      55                      60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
                65                      70                      75

```

017812

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct cca 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 324
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 51
 <211> 98
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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
 Ala Arg

<210> 52
 <211> 97
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

017812

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

Arg

<210> 53
 <211> 98
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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

Ala Arg

<210> 54
 <211> 95
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

017812

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

<210> 55
 <211> 95
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

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

<210> 56
 <211> 96
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

017812

<210> 57
 <211> 95
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 58
 <211> 1070
 <212> EEMOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Met Gly Ala Ala Arg Gly Ser Pro Ala Arg Pro Arg Arg Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Gly Thr Gln Thr Ala Ile
 20 25 30
 Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly Arg Arg
 35 40 45
 Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His Val Tyr
 50 55 60
 Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg Phe Ala
 65 70 75 80
 Gln Gly Ser Ser Leu Ser Phe Ala Ala Val Asp Arg Leu Gln Asp Ser
 85 90 95
 Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Ala
 100 105 110
 Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala Gly Pro
 115 120 125
 Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro Gln Thr
 130 135 140

017812

Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro Thr Tyr
 145 150 155 160

Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His
 165 170 175

Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala Gly Pro
 180 185 190

Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln
 195 200 205

Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe
 210 215 220

Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu
 225 230 235 240

Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255

Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro
 260 265 270

Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu
 275 280 285

Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln
 290 295 300

Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala
 305 310 315 320

Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly
 325 330 335

Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro
 340 345 350

Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg
 355 360 365

Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser
 370 375 380

Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg
 385 390 395 400

Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys
 405 410 415

Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp
 420 425 430

Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn
 435 440 445

017812

Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly
 450 455 460

Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg
 465 470 475 480

Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val
 485 490 495

Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln
 500 505 510

Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly
 515 520 525

Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu
 530 535 540

Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val
 545 550 555 560

Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro
 565 570 575

Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile
 580 585 590

Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr
 595 600 605

Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln
 610 615 620

Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg
 625 630 635 640

Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro
 645 650 655

Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile
 660 665 670

Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu
 675 680 685

Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr
 690 695 700

Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu
 705 710 715 720

Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln
 725 730 735

Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly
 740 745 750

017812

Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala
 755 760 765
 Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser
 770 775 780
 Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr
 785 790 795 800
 Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln
 805 810 815
 Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu
 820 825 830
 Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu
 835 840 845
 Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu
 850 855 860
 Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu
 865 870 875 880
 Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys
 885 890 895
 Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr
 900 905 910
 Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His
 915 920 925
 Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val
 930 935 940
 Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr
 945 950 955 960
 Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu
 965 970 975
 Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe
 980 985 990
 Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly
 995 1000 1005
 Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys Ala
 1010 1015 1020
 Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg Leu Met
 1025 1030 1035 1040
 Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser Phe Ser Glu
 1045 1050 1055

017812

Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser Thr Val Asp Ser Lys Pro
 1060 1065 1070

<210> 59
 <211> 13
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 60
 <211> 15
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 97
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ala
 35 40 45
 Asn Ala Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 62
 <211> 97
 <212> EEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 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 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 Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys

<210> 63
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 64
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 1 5 10 15
 Ser Ser

<210> 65
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 66
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 67
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 68
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 69
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент), которые связываются с протеинтирозинкиназой 7 (РТК7) человека, включающие:
CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 12;
CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16;
CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 20;
CDR1 переменной области легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 25;
CDR2 переменной области легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 31;
CDR3 переменной области легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 37.
2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент), которые связываются с протеинтирозинкиназой 7 (РТК7) человека, включающие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.
3. Антитело по п.1 или 2, которое представляет собой человеческое антитело, мышиное антитело, химерное антитело или гуманизованное антитело.
4. Антитело по п.1 или 2, которое является полноразмерным антителом IgG1 или IgG4 изотипа.
5. Антитело по п.1 или 2, которое представляет собой фрагмент антитела или одноцепочечное антитело.
6. Антитело по п.1 или 2, которое связывается с клетками опухоли Вильмса (ATCC Acc No. CRL-1441) с EC₅₀ 4,0 нМ или менее.
7. Антитело по п.1 или 2, которое связывается с клетками опухоли Вильмса с EC₅₀ 3,5 нМ или менее.
8. Антитело по п.1 или 2, которое связывается с линией раковых клеток, выбранной из группы, состоящей из клеточных линий A-431 (ATCC Acc No. CRL-1555), Saos-2 (ATCC Acc No. HTB-85), SKOV-3 (ATCC Acc No. HTB-77), PC3 (ATCC Acc No. CRL-1435), DMS 114 (ATCC Acc No. CRL-2066), ACHN (ATCC Acc No. CRL-1611), LNCaP (ATCC Acc No. CRL-1740), DU 145 (ATCC Acc No. HTB-81), LoVo (ATCC Acc No. CCL-229) и MIA PaCa-2 (ATCC Acc No. CRL-1420).
9. Композиция для лечения заболевания, характеризующегося ростом опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, содержащая антитело или его антигенсвязывающий участок по п.1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.
10. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий участок по п.1 или 2, связанные с терапевтическим агентом.
11. Иммуноконъюгат по п.10, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой цитотоксин.
12. Иммуноконъюгат по п.10, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой радиоактивный изотоп.
13. Композиция для лечения заболевания, характеризующегося ростом опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, содержащая иммуноконъюгат по п.10 и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Композиция для лечения заболевания, характеризующегося ростом опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, содержащая иммуноконъюгат по п.11 и фармацевтически приемлемый носитель.
15. Композиция для лечения заболевания, характеризующегося ростом опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, содержащая иммуноконъюгат по п.12 и фармацевтически приемлемый носитель.
16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий участок (фрагмент) по п.1 или 2.
17. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.16.
18. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.17.
19. Способ получения антитела против РТК7, который включает экспрессию антитела в клетке-хозяине по п.18 и выделение антитела из клетки-хозяина.
20. Способ лечения или предупреждения заболевания, характеризующегося ростом опухолевых клеток, экспрессирующих РТК7, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего участка (фрагмента) по п.1 или 2 в количестве, достаточном для эффективного лечения или предупреждения заболевания.
21. Способ по п.20, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.
22. Способ по п.21, отличающийся тем, что рак выбирают из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, острого миелоидного лейкоза, рака почки, рака мочевого пузыря, рака яичника и рака простаты.
23. Способ по п.22, отличающийся тем, что рак представляет собой рак поджелудочной железы.
24. Способ по п.22, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.

VH антитела 3G8 против РТК7

V сегмент : 3-30.3
 D сегмент: не определен
 J сегмент : JH4B

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C A A S G F I F S N Y A M H W
    CGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ATC TTC AGT AAC TAT GCT ATG CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

                                CDR2
163 G N N K Y Y A D S V K G R F T I S R
    GGA AAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
271 T A V Y Y C A R E V W S I D N W G Q
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GTC TGG AGT ATT GAC AAC TGG GGC CAG

325 G T L V T V S S
    GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Фиг. 1А

VH антитела 3G8 против РТК7

V сегмент : L15
 J сегмент : JK1

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
55  V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
    GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
    CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

                                CDR2
163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
    CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

                                CDR3
271 Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
    TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGC ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

Фиг. 1В

VH антитела 3G8a против РТК7

V сегмент : L15
J сегмент : JK3

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
55  V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
   GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
   CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

                                CDR2
163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
   CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

                                CDR3
271 Y N S Y P F T F G P G T K V D I K
   TAT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

```

Фиг. 1С

VH антитела 4D5 против РТК7

V сегмент : 3-30.3
D сегмент : не определен
J сегмент : JH4b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C A A S G F T F S S Y A F H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT TTC CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

                                CDR2
163 G S I K Y Y A D S V K G R F T I S R
   GGA AGC ATT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
271 F A V Y Y C A R T Y Y F D Y W G Q G
   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG ACG TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA

325 T L V T V S S
   ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Фиг. 2А

VH антитела 4D5 против РТК7

V сегмент : A10
J сегмент : JK5

```

1   E I V L T Q S P D F Q S V T P K E K
    GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA GAC TTT CAG TCT GTG ACT CCA AAG GAG AAA

                                CDR1
55  V T I T C R A S Q S I G S S L H W Y
    GTC ACC ATC ACC TGC CGG GCC AGT CAG AGC ATT GGT AGT AGC TTA CAC TGG TAC

                                CDR2
109 Q Q K P D Q S P K L L I K Y A S Q S
    CAG CAG AAA CCA GAT CAG TCT CCA AAG CTC CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC

    CDR2
163 F S G V P S R F S G S G S G T D F T
    TTC TCA GGG GTC CCC TCG AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC

                                CDR3
217 L T I N S L E A E D A A A Y Y C H Q
    CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GCT GAA GAT GCT GCA GCG TAT TAC TGT CAT CAG

    CDR3
271 S S S L P I T F G Q G T R L E I K
    AGT AGT AGT TTA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

Фиг. 2B

VH антитела 12C6 против РТК7

V сегмент : DP-44
D сегмент: не определен
J сегмент : JK4b

```

1   E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L
    GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C A G S G F T F S T Y L M Y W
    AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT CTT ATG TAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K T L E W V S A I G S G
    GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA ACT CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT GGT TCT GGT

    CDR2
163 G D T Y Y A D S V K G R F T I S R D
    GGT GAT ACA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

217 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M
    AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ATG

                                CDR3
271 A V Y Y C A R G L G Y W G Q G T L V
    GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GGA CTG GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC

325 T V S S
    ACC GTC TCC TCA

```

Фиг. 3A

VN антитела 12C6 против РТК7

V сегмент : A27
J сегмент : JK2

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                               CDR1
55  A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                               CDR2
109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

                               CDR2
163 R A T G I P D R F S G S G S G T D F
   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGG ACA GAC TTC

                               CDR3
217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                               CDR3
271 Q Y G S S P M Y T F G Q G T K L E I
   CAG TAT GGT AGC TCA CCC ATG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

325 K
   AAA

```

Фиг. 3B

VN антитела 12C6a против РТК7

V сегмент : L15
J сегмент : JK2

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                               CDR1
55  V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
   GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                               CDR2
109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
   CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

                               CDR2
163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
   CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                               CDR3
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

                               CDR3
271 Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
   TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

Фиг. 3C

VH антитела 7C8 против РТК7

V сегмент : 3-33
 D сегмент : 3-10
 J сегмент : JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
   CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                     CDR1
55  R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W D D
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

                                     CDR2
163 G S N K Y Y V D S V K G R F T I S R
   GGA AGT AAT AAA TAC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L O M N S L R A E D
   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                     CDR3
271 T A V Y Y C A R D D Y Y G S G S F N
   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TTT AAC

                                     CDR3
325 S Y Y G T D V W G Q G T T V T V S S
   TCC TAC TAC GGT ACG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Фиг. 4А

VH антитела 7C8 против РТК7

V сегмент : I6
 J сегмент : JK3

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                     CDR1
55  A T L S C R A S Q S V S I Y L A W Y
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC ATC TAC TTA GCC TGG TAC

                                     CDR2
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

                                     CDR2
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
   GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                     CDR3
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

                                     CDR3
271 R S N W P P F T F G P G T K V D I K
   CGT AGC AAC TGG CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

```

Фиг. 4В

VH область антител 3G8 и 3G8a против РТК7

			<u>CDR1</u>
3-30.3	зародышевая линия	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W	
3G8 VH		-----	I - N - - - - -
3G8a VH		-----	I - N - - - - -
			<u>CDR2</u>
3-30.3	зародышевая линия	V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R	
3G8 VH		-----	N - - - - -
3G8a VH		-----	N - - - - -
			<u>CDR3</u>
3-30.3	зародышевая линия	D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	
JH4b	зародышевая линия		D Y W G Q
3G8 VH		-----	E V W S I - N - - -
3G8a VH		-----	E V W S I - N - - -
JH4b	зародышевая линия	G T L V T V S S	
3G8 VH		-----	(JH4b)
3G8a VH		-----	(JH4b)

Фиг. 5

VH область антител 4D5 против РТК7

			<u>CDR1</u>
3-30.3	зародышевая линия	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R	
4D5 VH		-----	F - - - - -
			<u>CDR2</u>
3-30.3	зародышевая линия	Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K	
4D5 VH		-----	I - - - - -
			<u>CDR3</u>
3-30.3	зародышевая линия	N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	
JH4b	зародышевая линия		Y F D Y W G Q G T L V T V S
4D5 VH		-----	T Y - - - - -
JH4b	зародышевая линия	S	
4D5 VH		-	(JH4b)

Фиг. 6

VH область антител 12C6 и 12C6a против РТК7

			<u>CDR1</u>
DP-44	зародышевая линия	E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L R L S C A G S G F T F S S Y A M H W V R	
3-7	зародышевая линия	-----	E - - - - Q - - - - A - - - - W - S - - -
3-23	зародышевая линия	-----	L E - - - - Q - - - - A - - - - - S - - -
12C6 VH		-----	T - L - Y - - -
12C6a VH		-----	T - L - Y - - -
			<u>CDR2</u>
DP-44	зародышевая линия	Q A P G K G L E W V S A I G T G G G T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N	
3-7	зародышевая линия	-----	A N - K Q D - S E K - - V - - - - - - - - -
3-23	зародышевая линия	-----	S G S - S - - - - - - - - - - - - - - - S - -
12C6 VH		-----	T - - - - S - D - - - - - - - - - - - - - -
12C6a VH		-----	T - - - - S - D - - - - - - - - - - - - - -
			<u>CDR3</u>
DP-44	зародышевая линия	S L Y L Q M N S L R A E D M A V Y Y C A R	
3-7	зародышевая линия	-----	T - - - - -
3-23	зародышевая линия	-----	T - - - - - K
JH4b	зародышевая линия		Y W G Q G T L V T V S S
12C6 VH		-----	G L G - - - - - (JH4b)
12C6a VH		-----	G L G - - - - - (JH4b)

Фиг. 7

VN область антител 7C8 против РТК7

3-33 зародышевая линия Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
 7C8 VH -----
 CDR1
 3-33 зародышевая линия V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
 7C8 VH ----- D ----- V -----
 CDR2
 3-33 зародышевая линия D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
 7C8 VH ----- D D Y Y G S G S F N
 CDR3
 JH6b зародышевая линия Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
 7C8 VH S ----- T ----- (JH6b)

Фиг. 8

VK области антител 3G8 и 3G8a против РТК7

L15 зародышевая линия D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
 3G8 VK -----
 3G8a VK -----
 CDR1
 L15 зародышевая линия W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
 3G8 VK -----
 3G8a VK -----
 CDR2
 L15 зародышевая линия S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
 3G8 VK -----
 3G8a VK -----
 CDR3
 L15 зародышевая линия Y P
 JK1 зародышевая линия T F G Q G T K V E I K
 3G8 VK -- R ----- (JK1)
 3G8a VK -- F -- P -- D -- (JK3)

Фиг. 9

VK область антитела 4D5 против РТК7

A10 зародышевая линия E I V L T Q S P D F Q S V T P K E K V T I T C R A S Q S I G S
 4D5 VK -----
 CDR1
 A10 зародышевая линия S L H W Y Q Q K P D Q S P K L L I K Y A S Q S F S G V P S R F
 4D5 VK -----
 CDR2
 A10 зародышевая линия S G S G S G T D F T L T I N S L E A E D A A T Y Y C H Q S S S
 4D5 VK ----- A -----
 CDR3
 A10 зародышевая линия L P
 JK5 зародышевая линия I T F G Q G T R L E I K
 4D5 VK ----- (JK5)

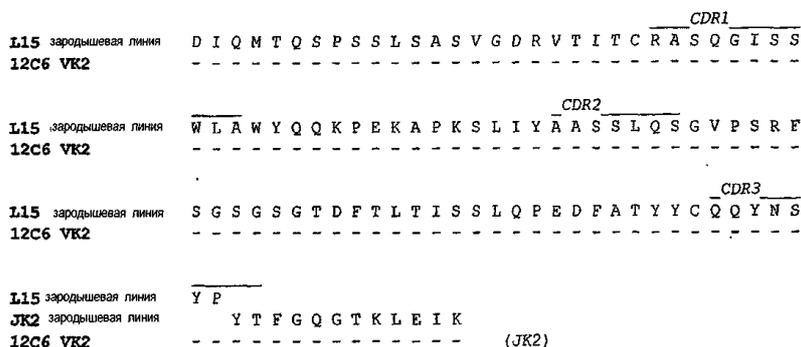
Фиг. 10

VK область антитела 12C6 против РТК7

A27 зародышевая линия E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
 12C6 VK1 -----
 CDR1
 A27 зародышевая линия Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
 12C6 VK1 -----
 CDR2
 A27 зародышевая линия T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P
 JK2 зародышевая линия Y T F G Q G T K L E I K
 12C6 VK1 ----- M ----- (JK2)

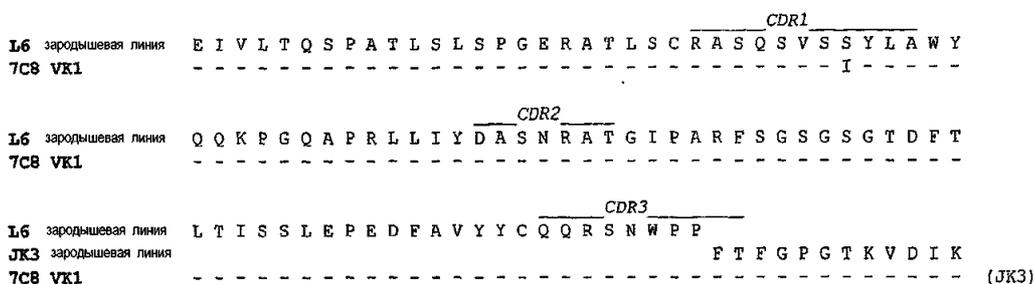
Фиг. 11

VK область антитела 12C6a против РТК7



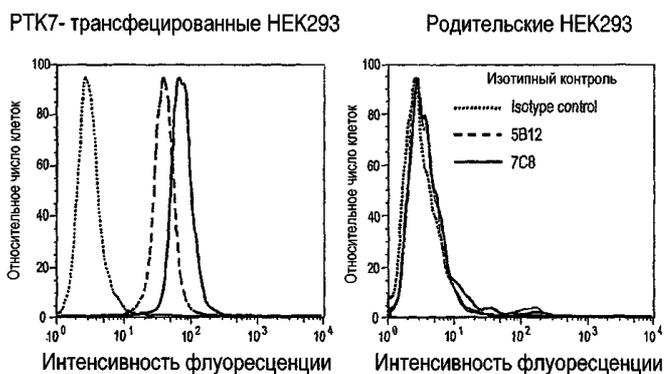
Фиг. 12

VK область антитела 7C8 против РТК7



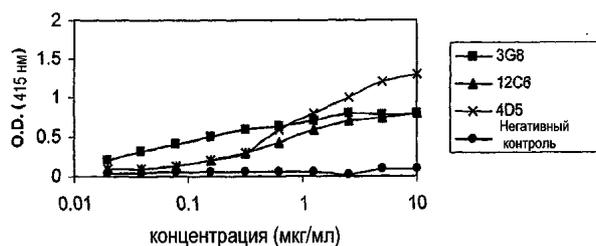
Фиг. 13

Связывание HuMab против РТК7 с клетками, трансфицированными РТК7



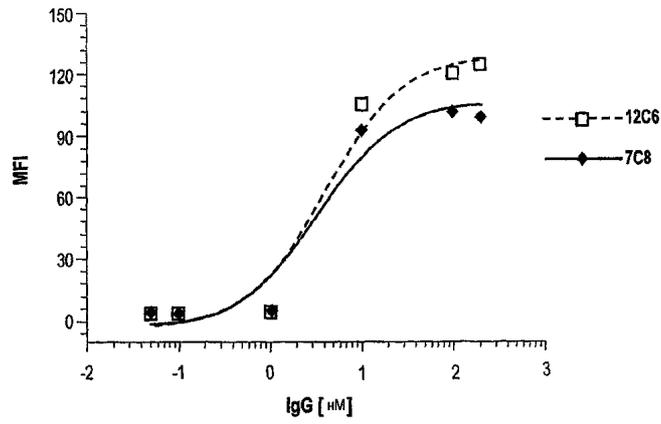
Фиг. 14

Связывание антител к РТК7 с белком РТК7 (ELISA)



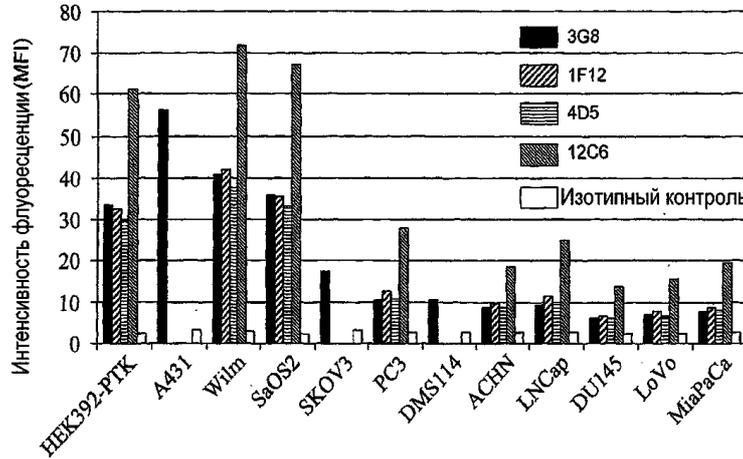
Фиг. 15

Титрование FACS на клетках опухоли Вильмса



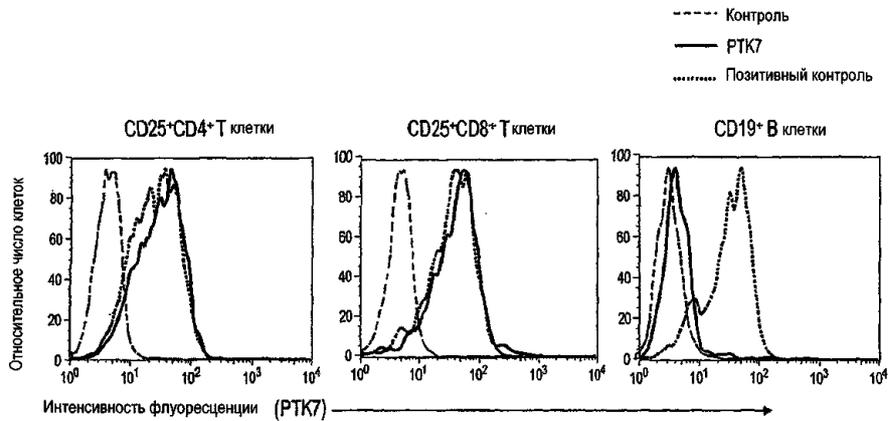
Фиг. 16

Экспрессия РТК7 в эндогенных опухолевых клеточных линиях, определённая с помощью FACS



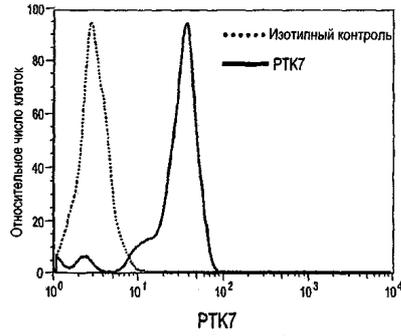
Фиг. 17

FACS анализ активированных человеческих лимфоцитов на РТК7



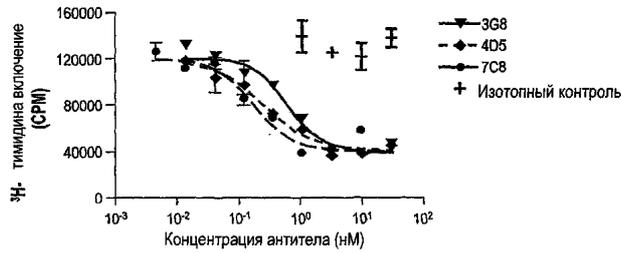
Фиг. 18

FACS анализ HuMab против РТК7 на дендритных клетках



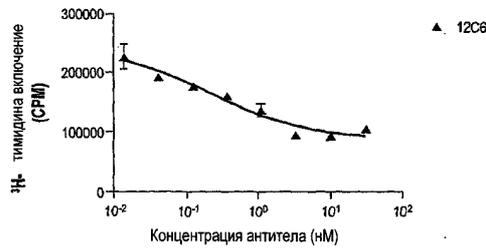
Фиг. 19

HumZap анализ клеток опухоли Вильмса



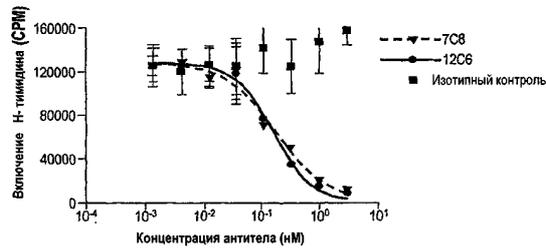
Фиг. 20А

HumZap анализ клеток опухоли Вильмса

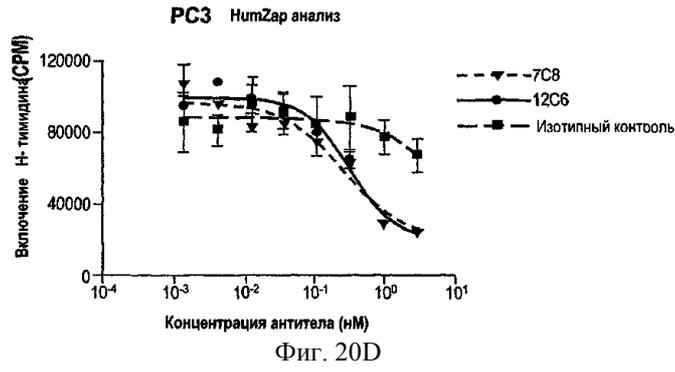


Фиг. 20В

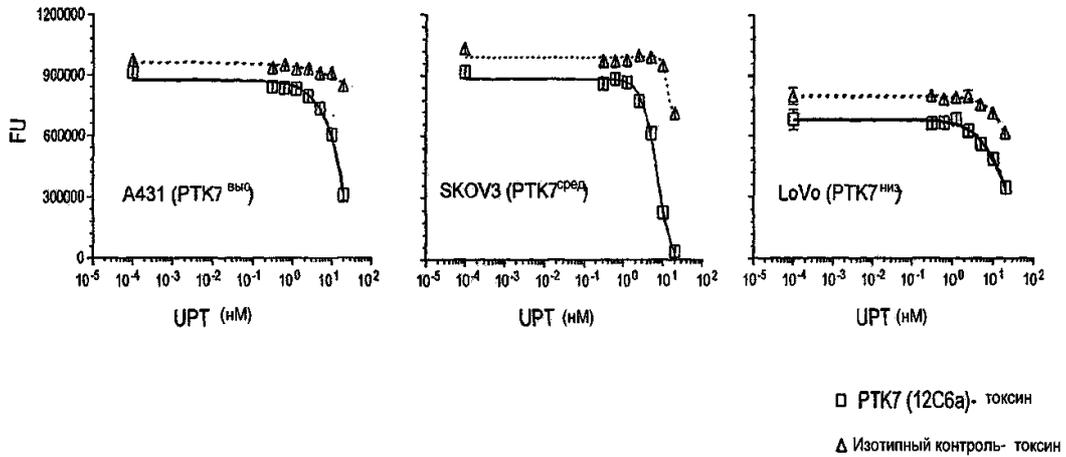
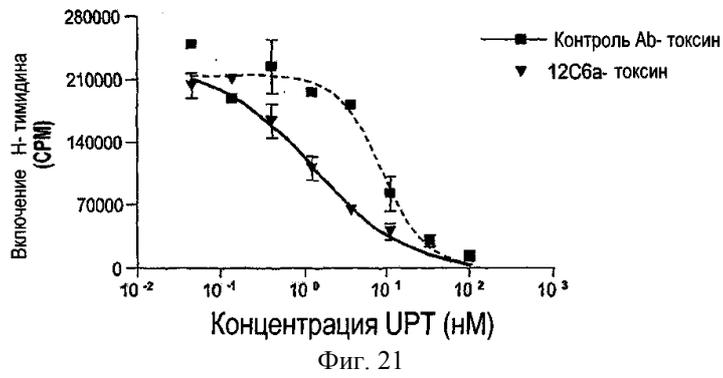
A-431 HumZap анализ



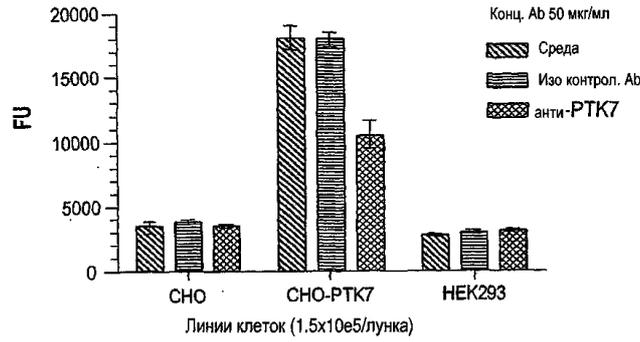
Фиг. 20С



Пролиферация клеток опухоли Вильмса 72 час-
без отмывания

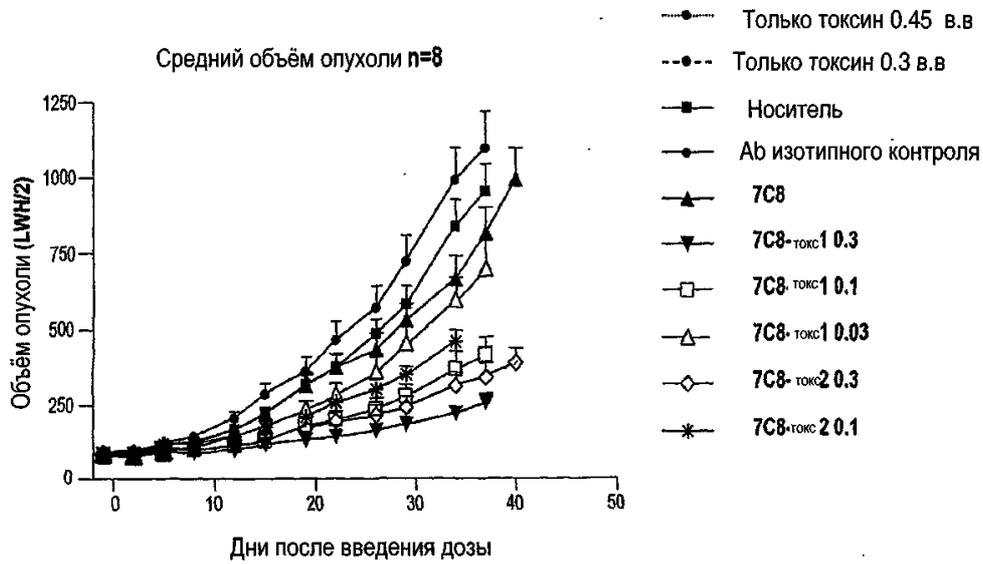


Инвазия (24 час)



Фиг. 23

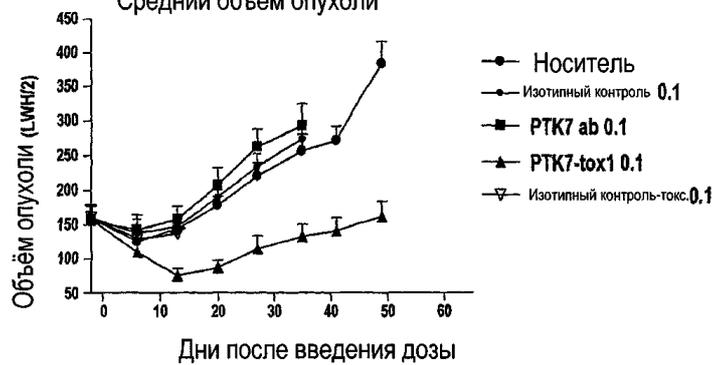
Средний объём опухоли n=8



Фиг. 24

1372-009 MCF7/Adr

Средний объём опухоли



Фиг. 25



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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