

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034414

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.05

(21) Номер заявки
201491352

(22) Дата подачи заявки
2013.01.09

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(31) 61/584,629
(32) 2012.01.09
(33) US
(43) 2015.01.30
(86) PCT/CA2013/000011
(87) WO 2013/104050 2013.07.18
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (СН)
(72) Изобретатель:
Тремблэ Жилье Бернар, Морайтис
Анна Н., Филион Марио (СА)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (РУ)

(56) WO-A1-2010060186
WO-A1-2011054112
US-A1-20110223107
WO-A1-2012129668
WO-A1-2007147265
PILLAI, S.K.K. ET AL. "Triple-negative
breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-
KIT expression in Malaysian women", BMC Clinical
Pathology 26 September 2012 (26-09-2012), 12(18),
pages 12-18
SETON-ROGERS, S. ET AL. "On the origins
of tumour subtypes", Nature Reviews Cancer October
2007 (10-2007), 7

B1

034414

034414
B1

Предпосылки изобретения

Ежегодно во всем мире диагноз "рак молочной железы" ставят более чем 1 млн женщин. Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой одно из самых гетерогенных заболеваний, состоящее из десятков различных типов рака, которые различают, используя гистологическую систему классификации. Обширный подтип и большинство случаев РМЖ гистологически определяются как люминальный А и люминальный В, которые в общем могут быть охарактеризованы наличием экспрессии рецептора эстрогена (ER) с низкой степенью или более высокой степенью гистологической злокачественности соответственно (Santana-Davila and Perez, 2010). Для измерения экспрессии рецептора прогестерона (PgR) используют иммуногистохимические способы, которые в сочетании с положительным статусом ER позволяют классифицировать опухоль как гормонозависимую. Кроме того, за избыточной экспрессией или усилением рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2) можно наблюдать либо с помощью иммуногистохимического анализа, либо методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Обычно экспрессию этих трех маркеров в опухолях молочной железы связывают с более благоприятным клиническим результатом, поскольку в данном случае для таких пациентов подходят несколько вариантов лечения, нацеленных на эти белки (de Ruijter et al., 2011), среди них тамоксифен, ArimidexTM (анастазол), AromasinTM (эксземестан), FemaraTM (летрозол), FaslodexTM (фулвострант), HerceptinTM (трастузумаб) или TykerbTM (лапатиниб).

Другой гистологический подтип РМЖ включает базальноподобные опухоли, которые характеризуются, среди прочего, более высокой степенью гистологической злокачественности, повышенным митотическим индексом и высокой экспрессией Ki67 (Santana-Davila and Perez, 2010). Подавляющее большинство базальноподобных опухолей состоит из тройного негативного РМЖ (ТНРМЖ), который составляет 15-20% от всех диагностируемых случаев РМЖ (Ismail-Khan and Bui, 2010). ТНРМЖ определяется по малому уровню экспрессии белка ER, PgR и отсутствию избыточной экспрессии белка HER2. Взаимосвязь между базальноподобными опухолями и ТНРМЖ просматривается не столь легко, поскольку не все ТНРМЖ являются базальноподобными, и не все базальноподобные опухоли представляют собой ТНРМЖ, но примерно 75% случаев в этих категориях разделяют признаки как тех, так и других. ТНРМЖ ассоциируется с плохим прогнозом в отношении 5-летней выживаемости и высокой вероятностью рецидива.

У пациентов с ТНРМЖ болезнь развивается в более раннем возрасте, чем в случае других подтипов РМЖ, и часто диагностируется в предклимактерическом периоде (Carey et al., 2006). Тройной отрицательный рак молочной железы демонстрирует повышенную склонность к рецидиву после лечения и, по-видимому, является более агрессивным, чем другие подтипы карциномы молочной железы (Nofech-Mozes et al., 2009), как и в случае подтипа базальноподобного рака молочной железы. Соответственно общая 5-летняя выживаемость пациентов с ТНРМЖ является значительно более низкой, чем у пациентов с установленными диагнозами других подтипов рака молочной железы. В настоящий момент не существует принятого специфического молекулярного маркера для ТНРМЖ. Несмотря на отсутствие такого, эти опухоли все же реагируют на химиотерапию (Krieger et al., 2009). Пациенты демонстрировали более хороший ответ на цитотоксические агенты при адьюватной терапии, как и при неоадьювантной терапии, при введении таких агентов, как 5-фторурацил, доксорубицин и циклофосфамид (Rouzier et al. 2005). Другие агенты, продемонстрировавшие определенную эффективность, включают соединения на основе платины, такие как соединения цисплатин и анти-тубулин, например таксаны (Santana-Davila and Perez, 2010).

Как упоминалось ранее, специфические мишени для ТНРМЖ не существуют, но это не препятствовало испытанию нацеленных агентов, например ингибиции поли[АДФ-рибоза]полимеразы 1 (PARP1). PARP1 представляет собой фермент, который участвует в ремонте однокомпонентных разрывов ДНК путем ассоциации с поврежденными нитями и является посредником в вовлечении ферментов, необходимых для ремонта однокомпонентных разрывов (de Ruijter et al., 2011). Таким образом, стратегия состояла в том, чтобы ингибировать активность PARP1 как средства, позволяющего раковым клеткам накапливать все больше однокомпонентных разрывов ДНК, которые в конечном итоге приводят к генетической нестабильности, остановке митотической активности и апоптозу. Перспективные клинические результаты были получены у пациентов, которые показали мутации в BRCA1 и/или BRCA2 - важных медиаторах поддержания стабильности генов и гомологичной рекомбинации, необходимых для правильного деления клеток. Действительно, пациенты с мутациями в BRCA1, которые скорее всего испытывают недостаточность в генетической стабильности метаболических путей, демонстрировали более сильную реакцию на ингибиторы PARP1 по сравнению с теми пациентами, для которых взаимосвязь с BRCA1 была дикого типа (Fong et al., 2009). Ясно, что нацеливание на PARP1 у пациентов с ТНРМЖ, которые являются носителями мутаций BRCA, представляет собой перспективную стратегию. Сочетание ER/PgR/HER2 статуса со статусом генетического профиля генов BRCA1/2 может предоставить наилучшую информацию для принятия решения в отношении соответствующих вариантов лечения пациентов с ТНРМЖ.

Другие стратегии также рассматривали применение ингибиторов EGFR либо в качестве моноклональных антител, либо как малых молекул или анти-ангиогенных соединений для нацеливания на VEGF.

Несколько клинических исследования произвели оценку действенности этих соединений, но ни одно из них не показало значительного ответа при введении исключительно только этих соединений. Однако небольшую действенность наблюдали у пациентов, получавших лечение этими ингибиторами в комбинации с другими цитотоксическими средствами (Santana-Davila and Perez, 2010).

Несмотря на последние достижения в понимании и лечении РМЖ, применение химиотерапии неизменно связано с тяжелыми нежелательными реакциями, которые ограничивают ее применение. В результате, необходимость в более специфических подходах, таких как сочетание антигенной тканевой специфичности с избирательностью моноклональных антител должно обеспечить значительное уменьшение побочных эффектов, связанных с нецелевым воздействием. Не существует антигенов, специфических для ТНРМЖ, которые на данный момент изучают в качестве терапевтических мишней для моноклональных антител. Так, для пациентов с ТНРМЖ существует немного вариантов, поскольку нет возможности нацеливания на специфический маркер белка, который экспрессируется в этих опухолях. Существует срочная потребность в идентификации новых белков, экспрессируемых при ТНРМЖ для применения в качестве новых диагностических маркеров и новых направленных (таргетных) терапий.

Ассоциированный с почками антиген 1 (KAAG1), белковая последовательность которого приведена здесь как SEQ ID NO: 2, изначально клонировали из библиотеки кДНК, полученной из линии клеток гипернефромы с антигеном B7 главного комплекса гистосовместимости, в качестве антигена пептида, презентируемого цитотоксическим Т-лимфоцитам (Van den Eynde et al., 1999; инвентарный номер в Genbank Q9UBP8, кДНК последовательность представлена нуклеотидами 738-992 последовательности SEQ ID NO: 1). Было обнаружено, что локус, содержащий KAAG1 кодирует два гена, транскрибируемые в обоих направлениях на противоположных цепях ДНК. Было обнаружено, что смысловая цепь кодирует транскрипт, который кодирует белок под названием DCDC2. При исследовании экспрессии авторами настоящего изобретения было обнаружено, что антисмысловой транскрипт KAAG1 был опухоль-специфичным и демонстрировал очень небольшую экспрессию в нормальных тканях, тогда как смысловой транскрипт DCDC2 экспрессируется повсеместно (Van den Eynde et al., 1999). Экспрессия транскрипта KAAG1 при раке, в частности при карциноме яичников, раке почек, раке легких, раке толстой кишки, раке молочной железы и меланоме раскрыта в международной заявке № РСТ/СА2007/001134, опубликованной 27 декабря 2007 г. под номером WO 2007/147265. Van den Eynde et al. также наблюдали экспрессию РНК при гипернефромах, колоректальных карциномах, меланомах, саркомах, лейкозах, опухолях головного мозга, опухолях щитовидной железы, карциномах молочной железы, карциномах предстательной железы, карциномах пищевода, опухолях мочевого пузыря, карциномах легких и опухолях головы и шеи. Недавно, в результате исследований неравновесного сцепления было получено убедительное генетическое доказательство, демонстрирующее, что локус VMP/DCDC2/KAAG1 ассоциирован с дислексией (Schumacher et al., 2006; Cope et al., 2005). Одно из этих сообщений было посвящено маркеру DCDC2 в качестве причины, вызывающей дислексию у пациентов, поскольку функция этого белка в миграции кортикальных нейронов согласовывалась с симптомами у этих пациентов, у которых часто проявлялись атипичная миграция и созревание нейронов (Schumacher et al., 2006).

Заявитель получил ряд антител и антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с белком KAAG1. Было показано, что эти антитела или антиген-связывающие фрагменты нацелены на три участка белка: аминокислоты 1-35, аминокислоты 36-60 и аминокислоты 61-84. Заявитель обнаружил, что антитела, нацеленные на участок между аминокислотами 30-84, были наиболее полезными для терапевтических целей, поскольку они распознавали KAAG1, расположенный на поверхности клеток опухоли. Заявитель показал, что некоторые из этих антител и антиген-связывающих фрагментов могут служить посредниками при антитело-зависимой клеточной цитотоксичности и/или интернализуются в клетки опухоли, что делает их хорошими кандидатами для доставки полезного груза в клетки опухоли. Заявитель также получил химерные и гуманизированные антитела, основанные на отобранных антителах-кандидатах, и показал, что эти антитела могут ингибиовать образование клеток опухоли и их инвазивность (см. РСТ/СА2009/001586, опубликованную 3 июня 2010 г. под номером WO2010/060186, и РСТ/СА2010/001785, опубликованную 12 мая 2011 г. под номером WO2011/054112). Наконец, заявитель обнаружил, что эти антитела могут быть применены для лечения и диагностики рака яичников, рака кожи, рака почек, колоректального рака, саркомы, лейкоза, опухоли головного мозга, опухоли щитовидной железы, рака молочной железы, рака простаты, опухоли пищевода, опухоли мочевого пузыря, опухоли легких и опухоли головы и шеи.

Заявитель сделал неожиданное открытие от том, что антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с KAAG1, могут быть эффективно нацелены на клетки рака молочной железы, у которых отсутствует экспрессия белка ER, экспрессия белка PgR и/или которые демонстрируют отсутствие избыточной экспрессии белка HER2 (т.е. клетки тройного негативного рака молочной железы, базальноподобные). Анти-KAAG1 антитела, таким образом, могут быть применены для обнаружения и терапевтического лечения клеток рака молочной железы, являющихся негативными для по меньшей мере одного из этих маркеров.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1а показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельных доменов

3A4 мышиных и гуманизированных легких цепей. Легкая цепь имеет два гуманизированных варианта (Lh1 и Lh2). CDR показаны жирным и обозначены CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Обратные мутации в каркасных участках человека, которые являются мышиными аминокислотами, подчеркнуты в гуманизированных последовательностях.

На фиг. 1b показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельных доменов 3A4 мышиных и гуманизированных тяжелых цепей. Тяжелая цепь имеет четыре гуманизированных варианта (Hh1 - Hh4). CDR показаны жирным и обозначены CDRH1, CDRH2 и CDRH3. Обратные мутации в каркасных участках человека, которые являются мышиными аминокислотами, подчеркнуты в гуманизированных последовательностях.

На фиг. 2a показано выравнивание вариабельного участка легкой цепи 3A4 мыши (SEQ ID NO: 4) с вариантом вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 33) при помощи программы ClustalW2 (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW и ClustalX версия 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948), в которой "*" (звездочка) указывает на положения, которые имеют отдельный, полностью сохраненный остаток, где ":" (двоеточие) указывает на консервативность между группами с сильно схожими свойствами - подсчет $>0,5$ по матрице Gonnet PAM 250 и где "." (точка) обозначает консервативность между группами с мало схожими свойствами - подсчет = $<0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 2b показано выравнивание вариабельного участка тяжелой цепи 3A4 мыши (SEQ ID NO: 2) с вариантом вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 38) при помощи программы ClustalW2 (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW и ClustalX версия 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948), в которой "*" (звездочка) указывает на положения, которые имеют отдельный, полностью сохраненный остаток, где ":" (двоеточие) указывает на консервативность между группами с сильно схожими свойствами - подсчет $>0,5$ по матрице Gonnet PAM 250 и где "." (точка) обозначает консервативность между группами с мало схожими свойствами - подсчет = $<0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 3a представлена карта плазмида pKCR5-3A4-HC-Variant 1. Тяжелые цепи гуманизированных вариантов 3A4 клонировали таким же образом в сайт Hind III pK-CR5. Следовательно, полученные в результате плазмида идентичны pKCR5-3A4-HC-Variant 1, за исключением последовательности вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 3b представлена карта плазмида pKCR5-3A4-HC-Variant 1. Легкие цепи гуманизированных вариантов 1 и 2 антитела 3A4 клонировали таким же способом в сайт BamHI pMPG-CR5. Следовательно, полученная в результате плазмида идентична pMPG-CR5-3A4-LC-Variant 1 за исключением последовательности вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 4 представлен анализ получения антитела после временной трансфекции в клетках СНО. Надосадочная жидкость (13 дней после трансфекции) клеток СНОсТА, трансфицированных различными комбинациями легких или тяжелых цепей гуманизированного антитела 3A4, проанализировали при помощи вестерн-блоттинга. Количественный анализ антитела, полученного в супернатантах, определяли после сканирования пучков вестерн-блоттинга по сравнению с разбавлением известного стандарта (очищенного антитела IgG человека). Mr - маркер молекулярного веса (кДа).

На фиг. 5 представлен график результатов гель-фильтрации в Superdex G75 образца рекомбинантного KAAG1. KAAG1 впрыскивали над гель-фильтрацией и разделяли со скоростью 0,4 мл/мин. Наибольший пик находится между фракциями 15-19.

На фиг. 6 представлена таблица, в которой перечислены константы скорости и аффинности для мышиных и гуманизированных вариантов антитела 3A4.

На фиг. 7a изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости ассоциаций (K_a) гуманизированных антител.

На фиг. 7b изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости диссоциаций (K_d) гуманизированных антител.

На фиг. 7c изображена гистограмма, иллюстрирующая константы афинности (K_D) гуманизированных антител.

На фиг. 8a проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с KAAG1 в ИФА тесте (ELISA). Этот чертеж демонстрирует сравнительное связывание вариантов гуманизированного антитела 3A4 и мышного 3A4. Графики связывания в зависимости от концентрации гуманизированных тяжелых цепей (Hh1, Hh2, Hh3 и Hh4), объединенных с вариантом легкой цепи Lh1.

На фиг. 8b проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с KAAG1 в ИФА тесте. Этот чертеж демонстрирует сравнительное связывание вариантов гуманизированного антитела 3A4 и мышного 3A4. Графики связывания в зависимости от концентрации гуманизированных тяжелых цепей (Hh1, Hh2, Hh3 и Hh4), объединенных с вариантом легкой цепи Lh2.

На фиг. 9 проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с KAAG1 на поверхности раковых клеток. На данной иллюстрации продемонстрирована сравнительная связывающая активность гуманизированных и мышных антител 3A4 на непермеабилизованных клетках карциномы яичника SKOV-3.

На фиг. 10 показан результат сканирования микрочипа тканей, содержащий 139 образцов биопсии, полученных от пациентов с РМЖ. Образцы блоттировали, используя антитело 3A4 к KAAG1, было пока-

зано, что огромное большинство опухолей молочной железы экспрессировали антиген KAAG1 очень в большом количестве. Образцы с подтвержденным ТНРМЖ помечены звездочкой.

На фиг. 11 показаны результаты проточной цитометрии, проведенной с использованием клеточных линий MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20, BT-549, T47D, MCF-7 и 293-6E, инкубированных с антителом 3A4 к KAAG1 (синие столбцы на гистограмме) в сравнении с контрольным образцом IgG (красные столбцы). Это представительные результаты эксперимента, который проводили сериями из трех. Клеточные линии ТНРМЖ помечены звездочкой.

На фиг. 12 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток MDA-MB-231 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело интерниализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 13 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток MDA-MB-436 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело интерниализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 14 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток MDA-MB-436 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело интерниализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 15 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток T47D при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело интерниализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 16 представлены иммунофлуоресцентные данные, полученные на живых клетках MDA-MB-231 с антителом 3A4 к KAAG1 и антителом к LAMP1. Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к KAAG1, показан на чертеже слева, иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к LAMP1, показан на чертеже в центре, и совмещенное изображение их обоих показано на чертеже справа. Эти данные иллюстрируют совместную локализацию KAAG1 и LAMP1 рядом с окологидерной областью.

На фиг. 17 представлены иммунофлуоресцентные данные, полученные на живых клетках MDA-MB-231 с антителом 3A4 к KAAG1 и антителом к LAMP1. Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к KAAG1, показан на чертеже слева, иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к LAMP1, показан на чертеже в центре, и совмещенное изображение их обоих показано на чертеже справа. Эти данные иллюстрируют локализацию KAAG1 с LAMP1 - маркером поздних эндосом/лизосом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предлагает способ лечения или обнаружения рака или раковых клеток (*in vitro* или *in vivo*) у субъектов, нуждающихся в этом.

В соответствии с настоящим изобретением способы лечения или обнаружения можно осуществлять с помощью антитела, способного связываться с KAAG1, или связывающего фрагмента его антигена.

Нуждающееся лицо может представлять собой, например, лицо, у которого обнаружен рак или есть подозрение на рак. Рак или раковые клетки у такого лица могут происходить из карциномы молочной железы.

Рак или раковые клетки более конкретно могут происходить из карциномы молочной железы, охарактеризованной как тройная негативная или базальноподобная опухоль.

По этой причине лица, которые могут получить пользу от способов лечения или обнаружения данного документа, могут включать тех, у кого выявлена карцинома молочной железы.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потеря экспрессии рецептора эстрогена.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потеря экспрессии рецептора прогестерона.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потеря экспрессии Her2.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потеря избыточной экспрессии Her2.

Более конкретно карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, демонстрирующие либо 1) уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена и рецептора прогестерона, 2) уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена и уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2, 3) уменьшение или потерю экспрессии рецептора прогестерона и уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2 или 4) уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена, уменьшение или потерю экспрессии рецептора прогестерона и уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2.

Еще более конкретно карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, де-

монстрирующие либо 1) потерю экспрессии рецептора эстрогена и рецептора прогестерона, 2) потерю экспрессии рецептора эстрогена и потерю экспрессии Her2, 3) потерю экспрессии рецептора прогестерона и потерю экспрессии Her2 или 4) потерю экспрессии рецептора эстрогена, потерю экспрессии рецептора прогестерона и потерю экспрессии Her2.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может иметь клетки РМЖ, которые охарактеризованы как тройные негативные, или может иметь опухоль, которая охарактеризована как тройной негативный РМЖ.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может иметь клетки РМЖ, которые охарактеризованы как базальноподобные, или может иметь опухоль, которая охарактеризована как базальноподобный РМЖ.

Другими лицами, которые получат пользу от лечения анти-КААГ1, являются те, у которых выявлена карцинома, содержащая клетки опухоли с переходным эпителиально-мезенхимальным (EMT) фенотипом.

Широко используемыми молекулярными маркерами EMT являются, например, сниженная экспрессия Е-кадгерина, цитокератина и β -катенина (в мембране) и/или повышенная экспрессия Snail, Slug, Twist, ZEB1, ZEB2, N-кадгенира, виментина, α -актина гладких мышц, матричных металлопротеиназ и т.д. (см., например, Kalluri and Weinberg, *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), p. 1420-1428; 2009; Fassina et al., *Modern Pathology*, 25, p. 86-99; 2012; Lee et al., *JCB*; 172; p. 973-981; 2006). EMT фенотип можно также различить по его повышенной способности к миграции, инвазивности или по устойчивости к аноикозу/апоптозу. Клетки, находящиеся в процессе эпитально-мезенхимального перехода, можно, таким образом, обнаружить благодаря уменьшению эпитальных маркеров и появлению мезенхимальных маркеров или EMT фенотипа.

В соответствии с настоящим изобретением способ может включать, например, введение нуждающегося в этом лицу антитела или антиген-связывающего фрагмента, который способен специфично связываться с KAAG1. Нуждающееся лицо предпочтительно отбирают на основании отсутствия у их опухоли экспрессии ER, экспрессии PgR и/или отсутствию избыточной экспрессии белка HER2. Клинические исследования этих маркеров обычно проводят, используя гистопатологические способы (иммуногистохимические, FISH и т.п.), и/или путем изучения экспрессии генов (см., например, Dent et al, 2007, Bernstein and Lacey, 2011). Нуждающимся лицом, таким образом, может быть лицо, у которого был установлен диагноз тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ. Нуждающееся лицо может быть лицом, у которого не наблюдается ответ на гормональную терапию и/или на лечение транстузумабом (или другими антителами к Her2). Альтернативно, нуждающееся лицо может быть лицом, имеющим клетки опухоли, которые способны к эпитально-мезенхимальному переходу или которые приобрели мезенхимальный фенотип.

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает способ лечения тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ путем введения ингибитора активности или экспрессии KAAG1 нуждающемуся лицу.

В соответствии с настоящим изобретением ингибитор KAAG1 может, таким образом, включать антитело, описанное в данном документе, или его антиген-связывающий фрагмент.

Также в соответствии с настоящим изобретением ингибитор KAAG1 может включать нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Более конкретно ингибитор KAAG1 может включать нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Например, ингибитор может включать по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов (по меньшей мере 15, по меньшей мере 20), комплементарных последовательности SEQ ID NO: 1 или нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1. Более конкретно тип ингибитора KAAG1 включает миРНК, которая демонстрирует экспрессию последовательности SEQ ID NO: 1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны связываться с KAAG1 на поверхности клеток опухоли. Такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в KAAG1 в пределах аминокислот с 30 по 84 включительно.

Альтернативно, такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут связываться с эпитопом, расположенным в KAAG1 в пределах аминокислот 36-60 (включительно) или в пределах аминокислот 61-84 (включительно).

Эпитоп может быть, в частности, расположен или заключен в пределах аминокислот 50-70, 50-65, 51-65, 52-65, 53-65, 54-65, 54-64, 54-63, 54-62, 54-61, 54-60, 50-62; 50-61 или 50-60 (включительно или исключительно).

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в KAAG1 в пределах аминокислот 50-70.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-

связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в KAAG1 в пределах аминокислот 50-62.

В еще одном дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в KAAG1 в пределах аминокислот 54-65.

Подходящие антитела для терапевтического лечения включают, например, те, которые выступают посредниками в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности.

Другие даже более подходящие антитела для терапевтического лечения включают антитела с присоединенным к ним терапевтическим фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут быть, например, моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, антителом человека или их антиген-связывающим фрагментом.

Подробное описание изобретения

Способ лечения.

Как указано в данном документе, настоящее изобретение включает введение антитела или антиген-связывающего фрагмента лицу, страдающему от РМЖ, который охарактеризован как "тройной негативный РМЖ" или "базальноподобный РМЖ".

Классификация подтипов РМЖ как "тройного негативного РМЖ" или "базальноподобного РМЖ" известна в уровне техники (см., например, Foulkes et al., N. Engl. J. Med., 2010; 363:1938-1948) и включает, например, следующие определения.

"Базальноподобный РМЖ" может включать, например, подтип РМЖ, заключающий в себе гетерогенную группу опухолей, характеризующихся отсутствием или низким уровнем экспрессии рецепторов эстрогена, очень низкой распространностью избыточной экспрессии Her2 и экспрессией генов, которые обычно наблюдают в базальных или миоэпителиальных клетках молочной железы человека. Такую экспрессию можно определить с помощью микрочипового анализа.

"Тройной негативный РМЖ" может включать, например, опухоль, характеризующуюся отсутствием рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) и экспрессии Her2. Некоторые исследователи относят опухоли к негативным с точки зрения экспрессии ER или PR лишь при наличии менее чем 1% позитивных с точки зрения экспрессии ER или PR клеток; другие считают опухоли негативными с точки зрения экспрессии ER или PR, если вплоть до 10% клеток являются позитивными с точки зрения экспрессии. Другие определения были использованы для HER2-негативности. Два из наиболее часто применяемых включают опухоли с иммуногистохимической оценкой, равной 0/1 + или 2+, у которых отсутствует амплификация гена HER2 после гибридизации *in situ*. Такую экспрессию можно особенно определить с помощью иммуногистохимического окрашивания.

В соответствии с настоящим изобретением способ лечения включает введение ингибитора KAAG1 нуждающемуся в этом лицу. Такой ингибитор KAAG1 включает, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с KAAG1.

Скорее всего, наиболее сильнодействующими антителами или антиген-связывающими фрагментами будут те, которые обладают высокой аффинностью к KAAG1. Также скорее всего, что наиболее сильнодействующими антителами или антиген-связывающими фрагментами будут те, которые интернализуются в такие отделы клетки, как, например, лизосома или эндосома.

Как таковое, настоящее изобретение особенно охватывает антитела или антиген-связывающие фрагментами, которые обладают высокой аффинностью к KAAG1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны связываться с KAAG1 на поверхности клеток опухоли с высокой аффинностью. Такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в KAAG1 в пределах аминокислот с 30 по 84 включительно.

Альтернативно, такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут связываться с эпитопом, расположенным в KAAG1 в пределах аминокислот 36-60 (включительно) или в пределах аминокислот 61-84 (включительно).

Антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут связываться, например, с эпитопом, который может быть, в частности, расположен или заключен в пределах аминокислот 50-70, 50-65, 51-65, 52-65, 53-65, 54-65, 54-64, 54-63, 54-62, 54-61, 54-60, 50-62; 50-61 или 50-60 (включительно или исключительно).

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент с высокой аффинностью может связываться с эпитопом, содержащимся в KAAG1 в пределах аминокислот 50-70.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент с высокой аффинностью может связываться с эпитопом, содержащимся в KAAG1 в пределах аминокислот 50-62.

В еще одном дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент с высокой аффинностью может связываться с эпитопом, содержащимся в

KAAG1 в пределах аминокислот 54-65.

Предпочтительными антителами, включая антитела с высокой афинностью, являются те антитела, которые могут интерниализоваться в клетку или отдельы клетки (например, лизосомы или эндосомы). Способность антител к интерниализации можно определить с помощью такого известного в уровне техники способа, как, например, и без ограничения, исследования с помощью иммунофлюоресценции, аналогичные тем, которые выполняются в данном документе.

Антитела с CDRs, идентичными таковым антител 3A4, особым образом охвачены настоящим изобретением. Как таковые, антитела, имеющие консенсусные последовательности с вариабельным участком легкой цепи и/или вариабельным участком тяжелой цепи, приведенные в любой из SEQ ID NOs: 186-188 и 191-193, и специфические последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 46, 48, 189, 190 или 194-198, охвачены настоящим изобретением.

Среди них антитела, имеющие консенсусные последовательности с вариабельным участком легкой цепи и/или вариабельным участком тяжелой цепи, приведенные в любой из SEQ ID NO: 188 и 196, или специфические последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 46, 48, 189, 190 или 194-198, представляют особый интерес.

К антителам или их антиген-связывающим фрагментам предпочтительно можно присоединять терапевтические фрагменты.

Антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут иметь константный участок человека. Предпочтительно антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут иметь константный участок IgG1 человека. Альтернативно, антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут иметь константный участок IgG2 человека.

Способ настоящего изобретения может также включать введение ингибитора KAAG1, такого как антитело (например, с присоединенным терапевтическим фрагментом) или антиген-связывающий фрагмент в комбинации с противораковым средством, таким как, например, лекарство на основе малой молекулы, антитела или антиген-связывающего фрагмента, связывающегося с целью, отличной от KAAG1, химиотерапевтического или цитотоксического агента. Пример противоракового средства, которое можно вводить с ингибитором KAAG1, может включать, например, доксорубицин, таксаны, антиангиогенные средства, соли платины, ингибиторы PARP.

Другие способы лечения, охваченные настоящим изобретением, включают введение других типов ингибиторов KAAG1, таких как терапевтические средства на антисмысловой основе (миРНК, антисмыловые средства, рибозимы и т.п.).

Антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с KAAG1.

Термин "антитело или антиген-связывающий фрагмент" или сходные с ним термины, такие как "антитела или антиген-связывающие фрагменты", охватывают, например, "вариантное антитело или антиген-связывающий фрагмент", такой как, например, "гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент".

Термин "антитело" относится к интактному антителу, моноклональным или поликлональным антителам. Термин "антитело" также охватывает мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела. Антитела человека обычно состоят из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, каждая из которых содержит вариабельные участки и константные участки. Вариабельный участок легкой цепи содержит 3 CDR, обозначенные в данном документе как CDRL1, CDRL2 и CDRL3, фланкированные каркасными участками. Вариабельный участок тяжелой цепи содержит 3 CDR, обозначенные в данном документе как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, фланкированные каркасными участками.

Термин "антиген-связывающий фрагмент", применяемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с антигеном (например, KAAG1, секретируемой формой KAAG1 или его вариантами). Было показано, что антиген-связывающая функция антитела может осуществляться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела, включают (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_H ; (ii) F(ab')2 фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_H ; (iv) Fv фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), например V_H CDR3. Кроме того, несмотря на то что два домена Fv фрагмента, V_L и V_H , кодированы раздельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов, при помощи синтетического линкера, который позволяет им быть сконструированными в качестве отдельной полипептидной цепи, в которой пара участков V_L и V_H соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как отдельная цепь 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 "антиген-связывающий фрагмент" антитела. Кроме того, антиген-связывающие фрагменты включают химерные белки иммуноглобулинов со связывающим доменом, содержащие (i) полипептид со связывающим доменом (как, например, вариабельный участок тяжелой цепи, вариабель-

ный участок легкой цепи или вариабельный участок тяжелой цепи, слитый с вариабельным участком легкой цепи посредством линкерного пептида), который слит с полипептидом с шарнирным участком иммуноглобулина, (ii) константный участок CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитый с шарнирным участком, и (iii) константный участок CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитый с константным участком CH2. Шарнирный участок может быть модифицирован при помощи замены одного или нескольких цистеиновых остатков на сериновые остатки для предупреждения димеризации. Такие гибридные белки иммуноглобулинов со связывающим доменом дополнительно раскрыты в публикациях US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают, используя традиционные методики, известные специалистам в данной области техники, и подвергают скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

Обычный сайт связывания антигена находится в составе вариабельных участков, сформированных путем спаривания иммуноглобулина легкой цепи и иммуноглобулина тяжелой цепи. Структура вариабельных участков антитела является очень устойчивой и демонстрирует очень сходные структуры. Такие вариабельные участки обычно содержат сравнительно гомологичные каркасные участки (FR), прерываемые тремя гипервариабельными участками, которые называются участками, определяющими комплементарность (CDR). Общая связывающая активность антиген-связывающего фрагмента часто обуславливается последовательностью CDR. FR часто играют некоторую роль в точном моделировании и выравнивании CDR по трем измерениям для оптимального связывания антигена.

Как используется в данном документе, термин "высокая аффинность" относится к аффинности, равной 10 нМ или менее.

Термин "высокая аффинность" в особенности включает антитела, обладающие аффинностью, равной 5 нМ или менее. Термин "высокая аффинность" еще более конкретно включает антитела, обладающие аффинностью, равной 1 нМ или менее или равной 0,1 нМ или менее.

Антитела и/или антиген-связывающие фрагменты настоящего изобретения могут происходить, например, от мыши, крысы или другого млекопитающего или от других источников, как, например, получаемые посредством методик рекомбинантной ДНК.

Антитела изначально были выделены из Fab-библиотек по их специфичности к представляющему интерес антигену. В данном документе приведены иллюстративные способы превращения Fab в полные иммуноглобулины.

Можно проводить слияние вариабельных участков антител, описанных в данном документе, с константными участками требуемых видов, таким образом делая возможным распознавание антитела эффекторными клетками требуемых видов. Константный участок может происходить, например, от подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Клонирование или синтез константного участка в рамке с вариабельным участком хорошо известны специалисту в данной области и могут быть осуществлены, например, при помощи методики рекомбинантной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающиеся смKAAG1 антитела могут относиться к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Более определенные варианты осуществления изобретения относятся к антителу подтипа IgG1 или особенно человеческого антитела подтипа IgG1. Другие определенные варианты осуществления изобретения относятся к антителу подтипа IgG2 или особенно человеческого антитела подтипа IgG2.

Антитело может быть гуманизированным антителом подтипа IgG1 или особенно человеческим антителом подтипа IgG1. Кроме того, антитело может быть гуманизированным антителом подтипа IgG2 или особенно человеческим антителом подтипа IgG2.

Антитело может быть, например, биологически активным, выступая посредником в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (опухолевых клеток, экспрессирующих), комплемент-опосредованной цитотоксичности (СМС) или ассоциированным с иммунными комплексами. Типичная АЗКЦ включает активизацию естественных клеток-киллеров (NK-клеток) и основывается на распознавании клеток, покрытых антителами, Fc рецепторами на поверхности NK-клеток. Fc рецепторы распознают Fc домен антител, например, такой как находится на IgG1, которые связываются с поверхностью клетки-мишени, в частности раковой клетки, которая экспрессирует антиген, такой как KAAG1. После связывания с Fc рецептором на IgG1 NK-клетка выделяет цитокины и цитотоксические гранулы, которые внедряются в клетку-мишень и, вызывая апоптоз, ускоряют гибель клетки.

Настоящее изобретение описывает набор антител, которые связываются с KAAG1 или вариантом KAAG1. В некоторых вариантах осуществления антитела можно выбирать из группы, состоящей из поликлональных антител, моноклональных антител, таких как химерные или гуманизированные антитела, фрагментов антител, таких как антиген-связывающие фрагменты, одноцепочечных антител, доменных антител и полипептидов с антиген-связывающим участком.

В одном аспекте данного изобретения изолированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут быть способны вызывать гибель (устранение, уничтожение, лизис) опухолевых клеток, экспрессирующих KAAG1, или опухолевых клеток, экспрессирующих вариантный KAAG1 (например, путем механизма, основанного АЗКЦ).

В дополнительном аспекте изобретения, выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент

настоящего изобретения могут быть специально охарактеризованы их способностью к уменьшению распространения опухолевых клеток, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

В дополнительном аспекте изобретения, выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут быть специально охарактеризованы их способностью к уменьшению или затруднению образования опухолей, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать аминокислоты константного участка, который может происходить, например, из антитела человека.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать каркасные аминокислоты антитела человека.

Безотносительно к иллюстративным вариантам осуществления, представленным в данном документе, заявитель выработал специфические антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые могут быть полезны для описанных в данном документе целей.

Нижеследующее представляет собой перечень полученных антител, которые демонстрировали специфическое связывание с KAAG1; 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 и 3H3. Последовательности легкой цепи или тяжелой цепи антитела, вариабельные участки или участки, определяющие комплементарность (CDRs) можно найти в международной заявке № PCT/CA2009/001586, опубликованной 3 июня 2010 г. под номером WO2010/060186A8, в международной заявке № PCT/CA2010/001795, опубликованной 12 мая 2011 г. под номером WO2011/054112A1, или в международной заявке № PCT/CA2012/000296, опубликованной 4 октября 2012 г. под номером WO2012/129668A1.

В большинстве случаев последовательности CDRs приведены отдельно или показаны жирным шрифтом в данном документе.

Из этих антител 3D3, 3A4, 3G10 и 3C4 были выбраны для биологических испытаний *in vitro* и/или *in vivo*. Антитело 3A4 обладало наилучшими свойствами. На основании наших экспериментов антитело 3A4 более эффективно убивает раковые клетки, если к нему присоединить терапевтический фрагмент (например, цитотоксический агент), по сравнению с антителом без такого присоединения.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать любой отдельный CDR или комбинацию из CDR1, CDR2 и/или CDR3 вариабельного участка легкой цепи. CDR3 может быть выбран более конкретно. Комбинация может включать, например, CDRL1 и CDRL3; CDRL1 и CDRL2; CDRL2 и CDRL3 и CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать любой отдельный CDR или комбинацию из CDR1, CDR2 и/или CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи. CDR3 может быть выбран более конкретно. Комбинация может включать, например, CDRH1 и CDRH3; CDRH1 и CDRH2; CDRH2 и CDRH3 и CDRH1, CDRH2 и CDRH3.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать по меньшей мере два CDR из CDRL1, CDRL2 или CDRL3.

Также в соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Дополнительно, в соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать:

- а) по меньшей мере два CDR из CDRL1, CDRL2 или CDRL3 и
- б) по меньшей мере два CDR из CDRH1, одного CDRH2 или одного CDRH3.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент могут более предпочтительно содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент могут более предпочтительно содержать один CDRH1, один CDRH2 и один CDRH3.

В тех случаях, когда доступен только один из вариабельных участков легкой цепи или вариабельных участков тяжелой цепи, антитело или антиген-связывающий фрагмент можно восстановить при помощи скрининга библиотеки комплементарных вариабельных участков с помощью способов, известных в данной области техники (Portolano et al. The Journal of Immunology (1993) 150:880-887, Clarkson et al., Nature (1991) 352:624-628).

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения охватывают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими CDRs легкой цепи и/или тяжелой цепи антител 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 или 3H3. Более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими CDR легкой цепи и/или тяжелой цепи антител 3D3, 3A4, 3C4 или 3G10. Еще более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими CDRs легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела 3A4. Изобретение, таким образом, охватывает любые моноклональные, химерные, человеческие или гуманизированные антитела, содержащие один или несколько CDRs антитела 3A4.

Антитела или антиген-связывающие фрагменты, которые можно применять в способах настоящего изобретения, включают те, которые имеют CDRs антитела 3A4, и могут содержать, например, CDRH1, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 49, CDRH2, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 50 или в SEQ ID NO: 212, CDRH3, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 51, CDRL1, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 52, CDRL2, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 53, CDRL3, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 54.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает антитела и антиген-связывающий фрагмент, который способен специфично связываться с KAAG1, и который может содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

бельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

bb) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

cc) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 196,

dd) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 197,

ee) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

ff) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

gg) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 196, или

hh) 3CDRs вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 197.

Другие иллюстративные варианты осуществления данного изобретения охватывают антитела или антигены, связывающиеся с фрагментами, имеющими легкую цепь и/или тяжелые цепи антител 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 или 3H3. Более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими легкую цепь и/или тяжелые цепи антител 3D3, 3A4, 3C4 или 3G10. Еще более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими легкую цепь и/или тяжелые цепи антитела 3A4 (гуманизированного или не гуманизированного).

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает антитела и антиген-связывающий фрагмент, который способен специфично связываться с KAAG1, и который может содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

а) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 16 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 15), и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 18 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 17),

б) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 20 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 19), и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 22 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 21),

с) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 24 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 23), и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 26 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 25),

д) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 48, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 46,

е) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 103, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 126,

ф) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 104, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 127,

г) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 105, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 128,

х) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 106, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 145,

и) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 107, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 129,

ж) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 108, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 130,

к) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 109, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 141,

л) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 110, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 131,

м) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 111, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 134,

н) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 112, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 135,

о) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 113, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 140,

р) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 114, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 133,

q) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 115, и/или вариабельного участка

тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 140,

г) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 116, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 137,

с) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 117, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 144,

т) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 118, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 139,

и) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 119, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 132,

в) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 120, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 142,

в) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 121, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 138,

х) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 122, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 146,

у) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 123, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 147,

з) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 124, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 144,

аа) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

бб) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

сс) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

дд) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

еe) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 196, или

ff) вариабельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или вариабельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 197.

Каркасный участок тяжелой и/или легкой цепей, описанных в данном документе, может быть получены от одного или нескольких каркасных участков, проиллюстрированных в антителах, описанных в данном документе. Антитело или антиген-связывающие фрагменты могут, таким образом, содержать один или несколько CDRs, описанных в данном документе (например, выбранных из специфичных CDRs или консенсусных CDRs последовательностей SEQ ID NO: 72-88 или CDR вариантов последовательностей SEQ ID NO: 89-102), и каркасных участков, взятых из описанных в данном документе. В последовательностях SEQ ID NO: 103-154 ожидаемые CDRs выделены жирным шрифтом, в то время как каркасные участки не выделены.

Табл. 1 относится к полным последовательностям легкой и тяжелой цепи некоторых из антител к KAAG1, которые были отобраны для биологического испытания.

Таблица 1

Обозначение антитела	Тип цепи	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO. :)	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. :)
3D3	Легкая (L)	3	4
3D3	Тяжелая (H)	5	6
3G10	Легкая	7	8
3G10	Тяжелая	9	10
3C4	Легкая	11	12
3C4	Тяжелая	13	14
Гуманизированное 3D3	Легкая		166
Гуманизированное 3D3	Тяжелая		167
Гуманизированное 3C4	Легкая		170
Гуманизированное 3C4	Тяжелая		171
Гуманизированный 3A4	Легкая (Lh1)		199
Гуманизированное 3A4	Легкая (Lh2)		200
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh1)		202
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh2)		203
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh3)		204
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh4)		205

Исследования по картированию эпитопов выявили, что антитело 3D3 взаимодействует с эпигопом KAAG1 на протяжении аминокислот 36-60, включительно. Антитела 3G10 и 3A4 взаимодействуют с эпигопом KAAG1 на протяжении аминокислот 61-84, включительно, и антитело 3C4 взаимодействует с эпигопом KAAG1 на протяжении аминокислот 1-35. Несмотря на то что 3G10 и 3A4 связывают похожие участки, антитело 3G10 не связывается с KAAG1 столь же эффективно, как антитело 3A4.

Здесь следует понять, что вариабельный участок легкой цепи с определенной комбинацией, приведенной выше, может быть заменен на любой другой вариабельный участок легкой цепи. Сходным образом здесь следует понять, что вариабельный участок тяжелой цепи с определенной комбинацией, приведенной выше, может быть заменен на любой другой вариабельный участок тяжелой цепи.

Последовательности вариабельных участков легкой и тяжелой цепей выбранных антител, связывающихся с KAAG1, раскрыты в табл. 2.

Таблица 2

Обозначение антитела	Тип вариабельного участка	Нуклеотид (SEQ ID NO.:)	Аминокислотн. посл-ть (SEQ ID NO.:)
3D3	Легкий (VL)	15	16
3D3	Тяжелый (VH)	17	18
3G10	Легкий	19	20
3G10	Тяжелый	21	22
3C4	Легкий	23	24
3C4	Тяжелый	25	26
3A2	Легкий		103
3A2	Тяжелый		126
3E10	Легкий		106
3E10	Тяжелый		145
3G12	Легкий		121
3G12	Тяжелый		138
3A4	Легкий	47	48
3A4	Тяжелый	45	46
Гуманизированное 3D3	Легкий		168
Гуманизированное 3D3	Тяжелый		169
Гуманизированное 3C4	Легкий		172
Гуманизированное 3C4	Тяжелый		173
Гуманизированный 3A4	Легкий (Lvh1)		189
Гуманизированный 3A4	Легкий (Lvh2)		190
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvh1)		194
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvh2)		195
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvh3)		197
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvh4)		198

Последовательности SEQ ID NO: 103-154 соответствуют вариабельным участкам легкой цепи и тяжелой цепи других антител, для которых было показано, что они связываются с KAAG1.

CDR последовательности вариабельных участков легкой и тяжелой цепей выбранных антител, связывающихся с KAAG1, раскрыты в табл. 3.

Таблица 3

Обозначение антитела	Тип цепи	CDR	SEQ ID NO.:	a.a. последовательность
3D3	Легкая (L)	CDR L1	27	KSSQSLNSNFQKNFLA
3D3	Легкая	CDR L2	28	FASTRES
3D3	Легкая	CDR L3	29	QQHYSTPLT
3D3	Тяжелая (H)	CDR H1	30	GYIFTDYEIH
3D3	Тяжелая	CDR H2	31	VIDPETGNTA
3D3	Тяжелая	CDR H3	32	MGYSDY

3G10	Легкая	CDR L1	33	RSSQSLLHSNGNTYLE
3G10	Легкая	CDR L2	34	KVSNRFS
3G10	Легкая	CDR L3	35	FQGSHVPLT
3G10	Тяжелая	CDR H1	36	GYTFTDNYMN
3G10	Тяжелая	CDR H2	37	DINPYYGT
3G10	Тяжелая	CDR H3	38	ARDDWFDY
3C4	Легкая	CDR L1	39	KASQDIHNFLN
3C4	Легкая	CDR L2	40	RANRLVD
3C4	Легкая	CDR L3	41	LQYDEIPLT
3C4	Тяжелая	CDR H1	42	GFSITSGYGH
3C4	Тяжелая	CDR H2	43	YINYDGHND
3C4	Тяжелая	CDR H3	44	ASSYDGLFAY
3A2	Легкая	CDR L1	148	KSSQSLLHSDGKTYLN
3A2	Легкая	CDR L2	149	LVSKLDS
3A2	Легкая	CDR L3	150	WQGTHFPRT
3A2	Тяжелая	CDR H1	151	GYTFTD YNMH
3A2	Тяжелая	CDR H2	152	YINPYNDVTE
3A2	Тяжелая	CDR H3	153	AWFGL RQ
3E10	Легкая	CDR L1	154	RSSKSLLHSNGN TYLY
3E10	Легкая	CDR L2	155	RMSNLAS
3E10	Легкая	CDR L3	156	MQHLEYPYT
3E10	Тяжелая	CDR H1	157	GDTFTD YYMN
3E10	Тяжелая	CDR H2	158	DINPNYGGIT
3E10	Тяжелая	CDR H3	159	QAYYRNS DY
3G12	Легкая	CDR L1	160	KASQDVGTAVA
3G12	Легкая	CDR L2	161	WTSTRHT
3G12	Легкая	CDR L3	162	QQHYSIPLT
3G12	Тяжелая	CDR H1	163	GYIFTDYEIH
3G12	Тяжелая	CDR H2	164	VIDPETGNTA
3G12	Тяжелая	CDR H3	165	MGYSDY
3A4	Легкая	CDR L1	52	RSSQSLLHSNGNTYLE
3A4	Легкая	CDR L2	53	TVSNRFS
3A4	Легкая	CDR L3	54	FQGSHVPLT
3A4	Тяжелая	CDR H1	49	GYTFTDDYMS
3A4	Тяжелая	CDR H2	50 или 212	DINPYNGDTYNQKFKG или DINPYNGDTN
3A4	Тяжелая	CDR H3	51	DPGAMDY

Вариантное антитело и антиген-связывающие фрагменты.

Настоящее изобретение также охватывает варианты антител или антиген-связывающих фрагментов, описанных в данном документе. Включенные вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты представляют собой те, которые имеют вариацию в аминокислотной последовательности. Например, включенные вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере один вариантный CDR (два, три, четыре, пять или шесть вариантных CDR и т.д. или даже двенадцать вариантных CDR), вариабельный участок вариантной легкой цепи, вариабельный участок вариантной тяжелой цепи, вариантную легкую цепь и/или вариантную тяжелую цепь. Вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты, включенные в настоящее изобретение, являются такими, которые имеют, например, подобную или повышенную связывающую способность по сравнению с исходным антителом или антиген-связывающим фрагментом.

Как используется в данном документе термин "вариантный" применяют к любой последовательности, описанной в данном документе, и он включает, например, вариантный CDR (или CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3), вариабельный участок вариантной легкой цепи, вариабельный участок вариантной тяжелой цепи, вариантную легкую цепь, вариантную тяжелую цепь, вариантное ан-

титело, вариантный антиген-связывающий фрагмент и вариант KAAG1.

Представляющие наибольший интерес сайты для замещающего мутагенеза включают гипервариабельные участки (CDR), но также предполагаются модификации в каркасном участке или даже в константном участке. Иллюстративные варианты осуществления вариантов CDR приведены в последовательностях SEQ ID NOs: 72-102.

Консервативные замены могут быть осуществлены при помощи обмена аминокислоты (из CDR, вариабельной цепи, антитела и т.д.) из одной из перечисленных ниже групп (группа 1-6) на другую аминокислоту этой же группы.

Другие иллюстративные варианты осуществления консервативных замен показаны в табл. 1A под заголовком "предпочтительные замены". Если результат такой замены придает нежелательное свойство, то могут быть произведены более существенные изменения, обозначенные как "иллюстративные замены" в табл. 1A, или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

В данной области техники известно, что варианты можно получать замещающим мутагенезом, сохранив биологическую активность полипептидов настоящего изобретения. Такие варианты в своей аминокислотной последовательности имеют по меньшей мере один удаленный аминокислотный остаток и другой остаток, вставленный на его место. Например, один представляющий интерес сайт для замещающего мутагенеза может включать сайт, в котором определенные остатки, полученные из различных видов, являются идентичными. Примеры замен, обозначенных как "консервативные замены", показаны в табл. 1A. Если результат такой замены дает нежелательное изменение, то вводят другой тип замен, обозначенных как "иллюстративные замены" в табл. 1A, или как дополнительно описано в данном документе в отношении классов аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

Существенные модификации в функции или иммунологической идентичности выполняют путем отбора замен, которые значительно отличаются по их эффекту на поддержание (a) структуры полипептидного скелета в области замены, например в виде конформации пластины или спирали; (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) основной части боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки разделены на группы на основании общих свойств боковых цепей:

- (группа 1) норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile),
- (группа 2) нейтральные гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr),
- (группа 3) кислотные: аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu),
- (группа 4) основные: аспартат (Asn), глутамин (Gln), гистидин (His), лизин (Lys), аргинин (Arg),
- (группа 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: глицин (Gly), пролин (Pro) и
- (группа 6) ароматические: триптофан (Trp), тирозин (Tyr), фенилаланин (Phe).

Неконсервативные замены повлекут обмен члена одного из таких классов на другой.

Таблица 1А

Аминокислотная замена

Исходный остаток	Иллюстративная замена	Консервативная замена
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Изменения в аминокислотной последовательности вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента могут включать аминокислотную вставку, делецию, замену и т.п., одну или несколько модификаций основной цепи или боковой цепи одной или нескольких аминокислот, или присоединение группы или другой молекулы к одной или нескольким аминокислотам (боковым цепям или основной цепи).

Вариантное антитело или антиген-связывающий фрагмент может иметь существенное сходство последовательности и/или идентичность последовательности своей аминокислотной последовательности с таковой аминокислотной последовательности исходного антитела или антиген-связывающего фрагмента. Степень сходства между двумя последовательностями основана на доле идентичностей (идентичных аминокислот) и консервативной замены.

Как правило, степень сходства и идентичности между вариабельными цепями определяли в данном документе при помощи программы для последовательностей Blast2 (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) при помощи настроек по умолчанию, т.е. программы blastp, матрицы BLOSUM62 (штраф за открытие разрыва 11 и штраф за удлинение разрыва 1; предельная длина разрыва 50, порог 10,0, размер слова 3) и активированных фильтров.

Процентная идентичность будет, таким образом, свидетельствовать об аминокислотах, которые идентичны аминокислотам исходного пептида и которые могут занимать такое же или сходное положение. Процентное сходство будет свидетельствовать об аминокислотах, которые идентичны, и аминокислотах, которые заменены консервативной аминокислотной заменой, по сравнению с исходным пептидом в таком же или сходном положении.

Варианты настоящего изобретения, таким образом, содержат такие, которые могут иметь по меньшей мере 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 81% идентичность последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство после-

довательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 82% идентичность последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 85% идентичность последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Другие дополнительные иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

В целях краткости заявитель приводит в данном документе табл. 1В, иллюстрирующую иллюстративные варианты осуществления отдельных вариантов, охватываемых настоящим изобретением и включающих указанный % идентичности последовательности и % сходства последовательности. Каждый "X" следует истолковывать как обозначающий заданный вариант.

Таблица 1В

		Процент (%) идентичности последовательности																				
		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Процент (%) сходства последовательности	80	x																				
	81	x	x																			
82	x	x	x																			
83	x	x	x	x																		
84	x	x	x	x	x																	
85	x	x	x	x	x	x																
86	x	x	x	x	x	x	x															
87	x	x	x	x	x	x	x	x														
88	x	x	x	x	x	x	x	x	x													
89	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
90	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
91	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
92	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
93	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
94	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
95	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
96	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
97	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
98	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
99	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
100	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		

Настоящее изобретение охватывает CDR, вариабельные участки легкой цепи, вариабельные участки тяжелой цепи, легкие цепи, тяжелые цепи, антитела и/или антиген-связывающие фрагменты, которые имеют по меньшей мере 70% идентичность или по меньшей мере 80% идентичность с последовательностью, описанной в данном документе.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает антитела и антиген-связывающий фрагмент, которые способны специфично связываться с KAAG1, и которые могут содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 48, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последова-

z) вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 124, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 143.

В соответствии с настоящим изобретением вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать CDRs, идентичные с таковыми соответствующего вариабельного участка легкой и/или тяжелой цепи. В другом случае вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать вариантные CDR(s).

Таким образом, иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения представляют собой такие, которые содержат вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность по меньшей мере на 70, 75, 80% идентичную SEQ ID NO: 16, 20, 24, 103, 106 или 121. CDRs такого варианта могут быть идентичны таковым соответствующего не вариантного (последовательность дикого типа) антитела или антиген-связывающего фрагмента, или могут отличаться 1-3 аминокислотами.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 16 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 16. Вариант SEQ ID NO: 16 приведен в SEQ ID NO: 168.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 20 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 20.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 24 и имеет, например, 1-21 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 24. Вариант SEQ ID NO: 24 приведен в SEQ ID NO: 172.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 103 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 103.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 106 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 106.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 121 и имеет, например, 1-21 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 121.

В отдельных случаях вариабельный участок легкой цепи вариантного антитела может содержать аминокислотные делеции или присоединения (в сочетании с аминокислотными заменами или без них). Зачастую, может быть допущено 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных делеций или присоединений.

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения представляют собой такие, которые содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность по меньшей мере на 70, 75, 80% идентичную SEQ ID NO: 18, 22, 26, 126, 138 или 145. CDRs такого варианта могут быть идентичны таковым соответствующего не вариантного (последовательность дикого типа) антитела или антиген-связывающего фрагмента, или могут отличаться 1-3 аминокислотами.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 18 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 18. Вариант SEQ ID NO: 18 приведен в SEQ ID NO: 169.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность

CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 22 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 22.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 26 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 26. Вариант SEQ ID NO: 26 приведен в SEQ ID NO: 173.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 126 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 126.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 145 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 145.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 138 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 138.

В отдельных случаях вариабельный участок тяжелой цепи вариантного антитела может содержать аминокислотные делеции или присоединения (в сочетании с аминокислотными заменами или без них). Зачастую, может быть допущено 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных делеций или присоединений.

Вариантные CDRS.

Также настоящим изобретением охвачены полипептиды или антитела, содержащие вариабельные цепи по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой по меньшей мере в одном из описанных в данном документе CDRs (по сравнению с исходным CDR).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие вариабельные цепи по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой по меньшей мере в двух из CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие вариабельные цепи по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой в трех CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие вариабельные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами по меньшей мере в одном из CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие вариабельные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами по меньшей мере в двух из CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие вариабельные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами в трех CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Сравнение аминокислотных последовательностей вариабельных участков легкой цепи или вариабельных участков тяжелой цепи антител, демонстрирующих отличные свойства, позволило нам получать конценсусные последовательности с CDRs в пределах вариабельных участков. Согласованность CDRs приведена в последовательностях SEQ ID Nos: 72-88.

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает в иллюстративном варианте осуществления выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок легкой цепи с:

- a) последовательностью CDRL1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73;
- b) последовательностью CDRL2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; или
- c) последовательностью CDRL3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79.

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает в иллюстративном варианте осуществления выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи с:

- a) последовательностью CDRH1, включающей SEQ ID NO: 80;
- b) последовательностью CDRH2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85; или
- c) последовательностью CDRH3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL1, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1a}SSX_{2a}SLLX_{3a}X_{4a}X_{5a}X_{6a}X_{7a}X_{8a}X_{9a}X_{10a}LX_{11a}$ (SEQ ID NO.: 72)

где X_{1a} может быть основной аминокислотой;

X_{2a} может быть основной аминокислотой;

X_{3a} может быть H, Y или N;

X_{4a} может быть S, T, N или R;

X_{5a} может отсутствовать, быть S или N;

X_{6a} может быть D, F или N;

X_{7a} может быть G или Q;

X_{8a} может быть K, L или N;

X_{9a} может быть T или N;

X_{10a} может быть ароматической аминокислотой и

X_{11a} может быть A, N, E или Y.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1a} может быть K или R.

В дополнительном варианте осуществления изобретения X_{2a} может быть Q или K.

В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретения X_{3a} может быть N или H.

В дополнительном варианте осуществления изобретения X_{10a} может быть Y или F.

Более конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL1 последовательности SEQ ID NO: 72, где X_{1a} представляет собой K; X_{2a} представляет собой Q; X_{3a} представляет собой N; X_{3a} представляет собой H; X_{4a} представляет собой S; X_{4a} представляет собой T; X_{5a} представляет собой S; X_{5a} отсутствует; X_{6a} представляет собой N; X_{7a} представляет собой Q; X_{7a} представляет собой G; X_{8a} представляет собой K; X_{9a} представляет собой N; X_{9a} представляет собой T; X_{10a} представляет собой Y или X_{11a} представляет собой A.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL1, содержащую или состоящую из формулы

$KASQDX_{1b}X_{2b}X_{3b}X_{4b}X_{5b}X_{6b}$ (SEQ ID NO.: 73)

где X_{1b} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{2b} может быть G или H;

X_{3b} может быть T, N или R;

X_{4b} может быть F, Y или A;

X_{5b} может быть гидрофобной аминокислотой, и;

X_{6b} может быть N или A.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1b} может быть V или I.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5b} может быть V или L.

Более конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL1 последовательности SEQ ID NO: 73, где X_{1b} представляет собой I; X_{2b} представляет собой H; X_{3b} представляет собой T; X_{3b} представляет собой N; X_{4b} представляет собой Y; X_{4b} представляет собой F; X_{5b} представляет собой L или X_{6b} представляет собой N.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRL1 приведены в SEQ ID NOs:89 и 90.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL2, содержащую или состоящую из формулы

$FX_{1c}STX_{2c}X_{3c}S$ (SEQ ID NO.: 74)

где X_{1c} представляет собой A или G;

X_{2c} представляет собой R или T и

X_{3c} представляет собой E, K или A.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1c} может быть A, и X_{2c} может быть T.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1c} может быть A, и X_{2c} может быть R.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO: 74, где X_{1c} представляет собой A; X_{2c} представляет собой R или X_{3c} представляет собой E.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL2, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1d}VSX_{2d}X_{3d}X_{4d}S$ (SEQ ID NO.: 75)

где X_{1d} может быть L или K;

X_{2d} может быть основной аминокислотой;

X_{3d} может быть L или R и

X_{4d} может быть D или F.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2d} может быть K или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO: 75, где X_{1d} представляет собой L; X_{2d} представляет собой K; X_{3d} представляет собой L или X_{4d} представляет собой D.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL2, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1e}ANRLVX_{2e}$ (SEQ ID NO.: 76)

где X_{1e} может быть основной аминокислотой;

X_{2e} может быть D или A.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1e} может быть R или H.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO: 76, где X_{1e} представляет собой R или X_{2e} представляет собой D.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRL2 приведены в SEQ ID NOs: 91-93.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL3, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1f}QX_{2f}X_{3f}X_{4f}X_{5f}PLT$ (SEQ ID NO.: 77)

где X_{1f} может быть Q или L;

X_{2f} может быть ароматической аминокислотой;

X_{3f} может быть D, F или Y;

X_{4f} может быть E, A, N или S и

X_{5f} может быть I, F или T.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2f} может быть Y или H.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3f} может быть Y или D.

Еще в одном иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5f} может быть I или T.

Более конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL3 последовательности SEQ ID NO: 77, где X_{1f} представляет собой Q; X_{2f} представляет собой H; X_{3f} представляет собой D; X_{3f} представляет собой Y; X_{4f} представляет собой S; X_{4f} представляет собой E; X_{4f} представляет собой A; X_{5f} представляет собой T или X_{5f} представляет собой I.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL3, содержащую или состоящую из формулы

$QQHX_{1g}X_{2g}X_{3g}PLT$ (SEQ ID NO.: 78)

где X_{1g} может быть ароматической аминокислотой;

X_{2g} может быть N или S и

X_{3g} может быть I или T.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1g} может быть F или Y.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL3 последовательности SEQ ID NO: 78, где X_{2g} представляет собой S или X_{3g} представляет собой T.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL3, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1h}QGX_{2h}HX_{3h}PX_{4h}T$ (SEQ ID NO.: 79)

где X_{1h} может быть ароматической аминокислотой;

где X_{2h} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

где X_{3h} может быть F или V и

где X_{4h} может быть R или L.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1h} может быть W или F.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2h} может быть S или T.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL3 последовательности SEQ ID NO: 79, где X_{1h} представляет собой W; X_{2h} представляет собой T; X_{3h} представляет собой F или X_{4h} представляет собой R.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRL3 приведены в SEQ ID NOs: 94 и 95

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH1, содержащую или состоящую из формулы

$GYX_{1i}FX_{2i}X_{3i}YX_{4i}X_{5i}H$ (SEQ ID NO.: 80)

где X_{1i} может быть T, I или K;

X_{2i} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{3i} может быть кислой аминокислотой;

X_{4i} может быть E, N или D и

X_{5i} может быть гидрофобной аминокислотой.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2i} может быть T или S.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3i} может быть D или E.

Еще в одном иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{4i} может быть N или E.

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5i} может быть M, I или V.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH1 последовательности SEQ ID NO: 80, где X_{2i} представляет собой T; X_{3i} представляет собой D; X_{4i} представляет собой I или X_{5i} представляет собой M.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRH1 приведены в SEQ ID NOs: 96 и 97.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1j}X_{2j}DPX_{3j}TGX_{4j}TX_{5j}$ (SEQ ID NO.: 81)

где X_{1j} может быть V или G;

X_{2j} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{3j} может быть A, G или E;

X_{4j} может быть R, G, D, A, S, N или V и

X_{5j} может быть гидрофобной аминокислотой.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2j} может быть I или L.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5j} может быть A или V.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 81, где X_{1j} представляет собой V; X_{2j} представляет собой I; X_{3j} представляет собой E, X_{4j} представляет собой D, или X_{5j} представляет собой A.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы

$VX_{1k}DPX_{2k}TGX_{3k}TA$ (SEQ ID NO.: 82)

где X_{1k} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{2k} может быть A, E или G;

X_{3k} может быть R, G, D, A, S, N, V или D.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1k} может быть L или I.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 82, где X_{1k} представляет собой I; X_{2k} представляет собой E или X_{3k} представляет собой D.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы

$YIX_{1l}X_{2l}X_{3l}GX_{4l}X_{5l}X_{6l}$ (SEQ ID NO.: 83)

где X_{1l} может быть S или N;

X_{2l} может быть ароматической аминокислотой

X_{3l} может быть D, E или N;

X_{4l} может быть D или H;

X_{5l} может быть Y, S или N;

X_{6l} может быть D, E или N.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3l} может быть D или N.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{6l} может быть D или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 83, где X_{2l} представляет собой F или Y; X_{3l} представляет собой N, X_{4l} представляет собой D, или X_{6l} представляет собой N.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы

$X_{1m}INPYNX_{2m}VTE$ (SEQ ID NO.: 84)

где X_{1m} может быть N или Y и

X_{2m} может быть E, D или N.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2m} может быть D или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 84, где X_{1m} представляет собой N или X_{2m} представляет собой D.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы

$DINPX_{1n}YGX_{2n}X_{3n}T$ (SEQ ID NO.: 85)

где X_{1n} может быть N или Y,

X_{2n} может быть G или T и

X_{3n} может быть I или T.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRH2 приведены в SEQ ID NOs: 98 и 99.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH3, содержащую или состоящую из формулы

$MX_{1o}X_{2o}X_{3o}DY$ (SEQ ID NO.: 86)

где X_{1o} может быть G или S;

X_{2o} может быть Y или H и

X_{30} может быть А или S.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO: 86, где X_{10} представляет собой G; X_{20} представляет собой Y или X_{30} представляет собой S.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH3, содержащую или состоящую из формулы

$IX_{1p}YAX_{2p}DY$ (SEQ ID NO.: 87)

где X_{1p} может быть G или S и

X_{2p} может отсутствовать или быть M.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO: 87, где X_{1p} представляет собой S или X_{2p} представляет собой M.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH3, содержащую или состоящую из формулы

$AX_{1q}X_{2q}GLRX_{3q}$ (SEQ ID NO.: 88)

где X_{1q} может быть R или W;

X_{2q} может быть ароматической аминокислотой и

X_{3q} может быть основной аминокислотой.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2q} может быть W или F.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3q} может быть Q или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO: 88, где X_{1q} представляет собой R; X_{2q} представляет собой W или X_{3q} представляет собой N.

Вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты, охватываемые настоящим изобретением, включают те, которые могут содержать вставку, делецию или аминокислотную замену (консервативную или не консервативную). Такие варианты могут иметь по меньшей мере один удаленный аминокислотный остаток в своей аминокислотной последовательности и другой остаток, вставленный на его место.

Гуманизированные антитела.

Иллюстративные варианты осуществления вариантов антител и антиген-связывающих фрагментов настоящего изобретения представляют собой группу антител и антиген-связывающих фрагментов, способных связываться с KAAG1 и охарактеризованных в данном документе как гуманизированные.

Гуманизированные антитела и антиген-связывающие фрагменты настоящего изобретения более конкретно включают гуманизированные антитела 3D3, 3A4 или 3C4 и антиген-связывающие фрагменты. Гуманизированные антитела 3D3, 3A4 или 3C4 в каркасном участке содержат по меньшей мере одну аминокислоту, которая отличает их от моноклональных антител 3D3, 3A4 или 3C4.

Гуманизированные антитела 3A4, содержащие CDRs, идентичные таковым моноклонального антитела 3A4 (VL SEQ ID NO: 48, VH: SEQ ID NO: 46), были получены и исследованы. Эти гуманизированные антитела содержат вплоть до 11 аминокислотных замен (от одной до одиннадцати) в вариабельном каркасном участке легкой цепи и вплоть до 23 аминокислотных замен (от одной до двадцати трех) в вариабельном каркасном участке тяжелой цепи, отличающих их от моноклонального антитела 3A4. Заявитель показал, что эти гуманизированные антитела 3A4 связываются с KAAG1 столь же эффективно, как и моноклональное антитело 3A4.

Иллюстративные варианты осуществления вариантов антитела или антиген-связывающих фрагментов включают такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 186

SEQ ID NO.: 186

DXVMTQTPLSLXVXXXGXXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSN

RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHPVPLTFGXLEXK,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48. Аминокислотной заменой может быть, например, аминокислота, находящаяся в соответствующем положении в естественном антителе человека или в консенсусной последовательности антитела человека. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариантов антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 187

SEQ ID NO.: 187

DX_{e1}VMTQTPLSLX_{e2}VX_{e3}X_{e4}GX_{e5}X_{e6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{e7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{e8}GVYYCFQGSHPVPLTFGX_{e9}GTX_{e10}LEX_{e11}K,

где X_{e1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{e2} может быть A или P;

X_{e3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{e4} может быть L или P;

X_{e5} может быть кислой аминокислотой;

X_{e6} может быть Q или P;

X_{e7} может быть основной аминокислотой;

X_{e8} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{e9} может быть A или Q;

X_{e10} может быть основной аминокислотой или

X_{e11} может быть гидрофобной аминокислотой,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

Дополнительный иллюстративный вариант осуществления вариантового антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 188

SEQ ID NO.:188

```
DXE1VMTQTPLSLXE2VXE3XE4GXE5XE6ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX
E7LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXE8GVYYCFQGSHVPLTFGXE9GTXE1
E10LEXE11K
```

где X_{E1} может быть V или I;

X_{E2} может быть A или P;

X_{E3} может быть S или T;

X_{E4} может быть L или P;

X_{E5} может быть D или E;

X_{E6} может быть Q или P;

X_{E7} может быть K или Q;

X_{E8} может быть L или V;

X_{E9} может быть A или Q;

X_{E10} может быть R или K или

X_{E11} может быть L или I,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

В соответствии с вариантом осуществления варианта вариабельного домена легкой цепи может иметь последовательность, которая приведена в SEQ ID NO: 189 или 190

SEQ ID NO.:189

```
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGKLEIK.
```

SEQ ID NO.:190

```
DVVMQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGKLEIK.
```

Иллюстративные варианты осуществления вариантового антитела или антиген-связывающих фрагментов включают такие, которые имеют вариабельный участок тяжелой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 191

SEQ ID NO.:191

```
QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDT
```

YNQKFKGXXXXDXSXSTAYMXXLXSLXSEDIXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXVTVSS,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46. Аминокислотной заменой может быть, например, аминокислота, находящаяся в соответствующем положении в естественном антителе человека или в консенсусной последовательности антитела человека. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариантового антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок тяжелой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 192

SEQ ID NO.:192

```
QXf1QLVQSGXf2EXf3Xf4KPGASVKXf5SCKASGYFTDDYMSWVXf6QXf7Xf8GXf9Xf10
f11LEWXf12GDINPYNGDTYNQKFKGXf13Xf14Xf15TXf16DXf17SXf18STAYMXf19LXf20SL
f21Xf22SEDXf23AVYYCARDPGAMDYWGQGTXf24TVTSS,
```

где X_{f1} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{bf2} может быть Р или А;
 X_{f3} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{f4} может быть В или К;
 X_{f5} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{f6} может быть основной аминокислотой;
 X_{f7} может быть S или А;
 X_{f8} может быть Н или Р;
 X_{f9} может быть основной аминокислотой;
 X_{f10} может быть S или G;
 X_{f11} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{f12} может быть основной аминокислотой;
 X_{f13} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{f14} может быть I или T;
 X_{f15} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{f16} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{f17} может быть К или Т;
 X_{f18} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;
 X_{f19} может быть Q или Е;
 X_{f20} может быть N или S;
 X_{f21} может быть Т или R;
 X_{f22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой или
 X_{f23} может быть S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X , является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

Дополнительный иллюстративный вариант осуществления вариантов антитела или антигена-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок тяжелой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 193

SEQ ID NO.:193
 $QX_{F1}QLVQSGX_{F2}EX_{F3}X_{F4}KPGASVKK_{F5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{F6}QX_{F7}X_{F8}GX_{F9}X_{F10}$
 $LEWX_{F11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{F12}X_{F13}X_{F14}X_{F15}TX_{F16}DX_{F17}SX_{F18}STAYMX_{F19}LX_{F20}SLX$
 $F21SEDX_{F22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{F23}VTVSS$

где X_{F1} может быть I или V;
 X_{F2} может быть Р или А;
 X_{F3} может быть М или V;
 X_{F4} может быть V или К;
 X_{F5} может быть М или V;
 X_{F6} может быть К или R;
 X_{F7} может быть S или А;
 X_{F8} может быть Н или Р;
 X_{F9} может быть К или Q;
 X_{F10} может быть S или G;
 X_{F11} может быть I или M;
 X_{F12} может быть К или R;
 X_{F13} может быть А или V;
 X_{F14} может быть I или T;
 X_{F15} может быть L или I;
 X_{F16} может быть V или A;
 X_{F17} может быть К или T;
 X_{F18} может быть S или T;
 X_{F19} может быть Q или E;
 X_{F20} может быть N или S;
 X_{F21} может быть Т или R;
 X_{F22} может быть S или T или
 X_{F23} является S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X , является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

В соответствии с вариантом осуществления вариант вариабельного домена тяжелой цепи может иметь последовательность, которая приведена в любой из SEQ ID NO: 194-197

SEQ ID NO.:194
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
 NYNQFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS.
 SEQ ID NO.:195
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
 NYNQFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS.
 SEQ ID NO.:196
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS.
 SEQ ID NO.:197
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS.

В соответствии с вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMTQSPX_{A1}SLAVSX_{A2}GX_{A3}X_{A4}X_{A5}TX_{A6}NCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{A7}
 TRESSXPDRFXGSGSGTDFTLTISX_{A10}QAEDX_{A11}AX_{A12}YX_{A13}CQQHYSTP
 LTFGX_{A14}GTKLEX_{A15}K (SEQ ID NO.:174);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 16. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMTQSPX_{A1}SLAVSX_{A2}GX_{A3}X_{A4}X_{A5}TX_{A6}NCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{A7}
 PKLLIYFASTRESSX_{A8}PDRFX_{A9}GSGSGTDFTLTISX_{A10}QAEDX_{A11}AX_{A12}YX_{A13}CQQHYSTP
 LTFGX_{A14}GTKLEX_{A15}K (SEQ ID NO.:175);

где X_{A1} может быть, например, D или S;
 X_{A2} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - L или I;
 X_{A3} может быть, например, E или Q;
 X_{A4} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - R или K;
 X_{A5} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - A или V;
 X_{A6} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или M;
 X_{A7} может быть, например, P или S;
 X_{A8} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или I;
 X_{A9} может быть, например, S или I;
 X_{A10} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - L или V;
 X_{A11} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;
 X_{A12} может быть, например, V или D;
 X_{A13} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - Y или F;
 X_{A14} может быть, например, Q или A и
 X_{A15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или L.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMTQSPX_{A1}SLAVSX_{A2}GX_{A3}X_{A4}X_{A5}TX_{A6}NCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{A7}
 PKLLIYFASTRESSX_{A8}PDRFX_{A9}GSGSGTDFTLTISX_{A10}QAEDX_{A11}AX_{A12}YX_{A13}CQQHYSTP
 LTFGX_{A14}GTKLEX_{A15}K (SEQ ID NO.:176);

где X_{A1} может быть, например, D или S;
 X_{A2} может быть, например, L или I;
 X_{A3} может быть, например, E или Q;
 X_{A4} может быть, например, R или K;
 X_{A5} может быть, например, A или V;
 X_{A6} может быть, например, I или M;
 X_{A7} может быть, например, P или S;
 X_{A8} может быть, например, V или I;
 X_{A9} может быть, например, S или I;
 X_{A10} может быть, например, L или V;
 X_{A11} может быть, например, V или L;
 X_{A12} может быть, например, V или D;
 X_{A13} может быть, например, Y или F;
 X_{A14} может быть, например, Q или A и

X_{a15} может быть, например, I или L.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLXQSXAEXXXPGASVXXSCKASGYIFTDYEIHWVXQXPXXGLEWXGVIDPETGNT

AFNQKFKGXXXTADXSXSTAYMELSSLTSEDXAVYYCMGYS DYWGQGTXTVSS (SEQ ID NO.:177);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 18. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLX_{b1}QSX_{b2}AEX_{b3}X_{b4}X_{b5}PGASVX_{b6}X_{b7}SCKASGYIFTDYEIHWVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10}X_{b1}
GLEWX_{b12}GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{b13}X_{b14}TX_{b15}TADXSX_{b16}SX_{b17}STAYMELSSLTSEDX_{b18}

AVYYCMGYS DYWGQGTX_{b19}X_{b20}TVSS (SEQ ID NO.:178),

где X_{b1} может быть, например, V или Q;

X_{b2} может быть, например, G или V;

X_{b3} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{b4} может быть, например, K или V;

X_{b5} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - K или R;

X_{b6} может быть, например, K или T;

X_{b7} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{b8} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - R или K;

X_{b9} может быть, например, A или T;

X_{b10} может быть, например, G или V;

X_{b11} может быть, например, Q или H;

X_{b12} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - M или I;

X_{b13} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - R или K;

X_{b14} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или A;

X_{b15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или L;

X_{b16} может быть, например, T или I;

X_{b17} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{b18} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{b19} может быть, например, L или T и

X_{b20} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLX_{b1}QSX_{b2}AEX_{b3}X_{b4}X_{b5}PGASVX_{b6}X_{b7}SCKASGYIFTDYEIHWVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10}X_{b1}
GLEWX_{b12}GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{b13}X_{b14}TX_{b15}TADXSX_{b16}SX_{b17}STAYMELSSLTSEDX_{b18}

AVYYCMGYS DYWGQGTX_{b19}X_{b20}TVSS (SEQ ID NO.:179);

где X_{b1} может быть, например, V или Q;

X_{b2} может быть, например, G или V;

X_{b3} может быть, например, V или L;

X_{b4} может быть, например, K или V;

X_{b5} может быть, например, K или R;

X_{b6} может быть, например, K или T;

X_{b7} может быть, например, V или L;

X_{b8} может быть, например, R или K;

X_{b9} может быть, например, A или T;

X_{b10} может быть, например, G или V;

X_{b11} может быть, например, Q или H;

X_{b12} может быть, например, M или I;

X_{b13} может быть, например, R или K;

X_{b14} может быть, например, V или A;

X_{b15} может быть, например, I или L;

X_{b16} может быть, например, T или I;

X_{b17} может быть, например, T или S;

X_{b18} может быть, например, T или S;

X_{b19} может быть, например, L или T;

X_{b20} может быть, например, V или L.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMXQSPSSXXASXGXRVТИТCKASQDIHNFLNWFQQKPGKXPKTLIFRANRLVDGV
PSRFSGSGSGDXYXLTISLXXEDXXXSCLQYDEIPLTFGXGTLEXX (SEQ ID
NO.:180);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 24. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLIFR
ANRLVDGVPSRFSGSGSGX_{c7}DYX_{c8}LTISSLX_{c9}X_{c10}EDX_{c11}X_{c12}X_{c13}YSCLQYDEIPLTFGX_{c1}
4GTKLEX_{c15}X_{c16} (SEQ ID NO.:181);

где X_{c1} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{c2} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - L или M;

X_{c3} может быть, например, S или Y;

X_{c4} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{c5} может быть, например, кислой аминокислотой или более конкретно - D или E;

X_{c6} может быть, например, A или S;

X_{c7} может быть, например, T или Q;

X_{c8} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{c9} может быть, например, Q или E;

X_{c10} может быть, например, P или F;

X_{c11} может быть, например, F или L;

X_{c12} может быть, например, A или G;

X_{c13} может быть, например, T или I;

X_{c14} может быть, например, Q или A;

X_{c15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или L и

X_{c16} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - K или R.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLIFR
ANRLVDGVPSRFSGSGSGX_{c7}DYX_{c8}LTISSLX_{c9}X_{c10}EDX_{c11}X_{c12}X_{c13}YSCLQYDEIPLTFGX_{c1}
4GTKLEX_{c15}X_{c16} (SEQ ID NO.:182);

где X_{c1} может быть, например, T или S;

X_{c2} может быть, например, L или M;

X_{c3} может быть, например, S или Y;

X_{c4} может быть, например, V или L;

X_{c5} может быть, например, D или E;

X_{c6} может быть, например, A или S;

X_{c7} может быть, например, T или Q;

X_{c8} может быть, например, T или S;

X_{c9} может быть, например, Q или E;

X_{c10} может быть, например, P или F;

X_{c11} может быть, например, F или L;

X_{c12} может быть, например, A или G;

X_{c13} может быть, например, T или I;

X_{c14} может быть, например, Q или A;

X_{c15} может быть, например, I или L и

X_{c16} может быть, например, K или R.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLQESGPXLVKPSQXLSLTCTVXGFSITSGYGHWIRQXPGXXLEWXGYINYDGHN
DYNPSLKSRRXXIXQDTSKNQFXLXLXSVTXXDTAXYYCASSYDGLFAYWGQGTIVTVSX
(SEQ ID NO.:183);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в

полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 26. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLQESGPX_{d1}LVKPSQX_{d2}LSLTCTVX_{d3}GFSITSGYGWIRQX_{d4}PGX_{d5}X_{d6}LEWX_{d7}
GYINYDGHNDYNPSLKSRX_{d8}X_{d9}IX_{d10}QDTSKNQFX_{d11}LX_{d12}LX_{d13}SVTX_{d14}X_{d15}DTAX_{d16}YY
CASSYDGLFAYWGQGTLVTVSX_{d17} (SEQ ID NO.:184);

где X_{D1} может быть, например, G или D;

X_{D2} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{D3} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - S или T;

X_{D4} может быть, например, H или F;

X_{D5} может быть, например, K или N;

X_{D6} может быть, например, G или K;

X_{D7} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или M;

X_{D8} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или I;

X_{D8} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{D10} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - S или T;

X_{D11} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - S или F;

X_{D12} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - K или Q;

X_{D13} может быть, например, S или N;

X_{D14} может быть, например, A или T;

X_{D15} может быть, например, A или E;

X_{D16} может быть, например, V или T и

X_{D17} может быть любой аминокислотой, A или отсутствовать.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLQESGPX_{d1}LVKPSQX_{d2}LSLTCTVX_{d3}GFSITSGYGWIRQX_{d4}PGX_{d5}X_{d6}LEWX_{d7}
GYINYDGHNDYNPSLKSRX_{d8}X_{d9}IX_{d10}QDTSKNQFX_{d11}LX_{d12}LX_{d13}SVTX_{d14}X_{d15}DTAX_{d16}YY
CASSYDGLFAYWGQGTLVTVSX_{d17} (SEQ ID NO.:185);

где X_{d1} может быть, например, G или D;

X_{d2} может быть, например, T или S;

X_{d3} может быть, например, S или T;

X_{d4} может быть, например, H или F;

X_{d5} может быть, например, K или N;

X_{d6} может быть, например, G или K;

X_{d7} может быть, например, I или M;

X_{d8} может быть, например, V или I;

X_{d9} может быть, например, T или S;

X_{d10} может быть, например, S или T;

X_{d11} может быть, например, S или F;

X_{d12} может быть, например, K или Q;

X_{d13} может быть, например, S или N;

X_{d14} может быть, например, A или T;

X_{d15} может быть, например, A или E;

X_{d16} может быть, например, V или T и

X_{d17} представляет собой A или отсутствует;

Соответственно настоящее изобретение предлагает в одном аспекте антитело или его антиген-связывающий фрагмент, способный специфично связываться с ассоциированным с почками антигеном 1 (KAAG1), который может содержать вариабельный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 16, и/или вариабельный участок тяжелой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 18. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18.

В другом аспекте настоящее изобретение также предлагает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который может содержать вариабельный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 24, и/или вариабельный участок тяжелой цепи, по меньшей мере

ре на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 26. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

В другом аспекте настоящее изобретение также предлагает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который может содержать вариабельный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 48, и/или вариабельный участок тяжелой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 46. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 46.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения аминокислотная замена может быть вне участка, определяющего комплементарность (CDR). Антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющее такую аминокислотную последовательность, охватывает, например, гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент.

Как используется в данном документе, выражение "от одного до двадцати пяти" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 25; от 1 до 25; от 1 до 24, от 1 до 23, от 1 до 22, от 1 до 21, от 1 до 20, от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и т.д.; от 2 до 25, от 2 до 24, от 2 до 23, от 2 до 22, от 2 до 21, от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и т.д.; от 3 до 25, от 3 до 24, от 3 до 23, от 3 до 22, от 3 до 21, от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и т.д.; от 4 до 25, от 4 до 24, от 4 до 23, от 4 до 22, от 4 до 21, от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и т.д.; от 5 до 25, от 5 до 24, от 5 до 23, от 5 до 22, от 5 до 21, от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и т.д. и т.п.

Как используется в данном документе, выражение "от одного до двадцати трех" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 23; от 1 до 23, от 1 до 22, от 1 до 21, от 1 до 20, от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и т.д.; от 2 до 23, от 2 до 22, от 2 до 21, от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и т.д.; от 3 до 23, от 3 до 22, от 3 до 21, от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и т.д.; от 4 до 23, от 4 до 22, от 4 до 21, от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и т.д.; от 5 до 25, от 5 до 24, от 5 до 23, от 5 до 22, от 5 до 21, от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и т.д. и т.п.

Как используется в данном документе, выражение "от одного до двадцати" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 20; от 1 до 20, от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и т.д.; от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и т.д.; от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и т.д.; от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и т.д.; от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и т.д. и т.п.

Таким же образом выражение "от одного до пятнадцати" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 15; от 1 до 15, от 1 до 14; от 1 до 13; от 1 до 12; от 1 до 11; от 1 до 10 и т.д.; от 2 до 15; от 2 до 14; от 2 до 13; от 2 до 12 и т.д.; от 3 до 15; от 3 до 14; от 3 до 13 и т.д.; от 4 до 15; от 4 до 14; от 4 до 13; от 4 до 12; от 4 до 11 и т.д.; от 5 до 15; от 5 до 14; от 5 до 13; от 5 до 12 и т.д. и т.п.

Таким же образом выражение "от одного до одиннадцати" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 11; от 1 до 11, от 1 до 10; от 1 до 9; от 1 до 8; от 1 до 7 и т.д.; от 2 до 11; от 2 до 10; от 2 до 9; от 2 до 8 и т.д.; от 3 до 11; от 3 до 10; от 3 до 9 и т.д.; от 4 до 11; от 4 до 10; от 4 до 9; от 4 до 8; от 4 до 7 и т.д.; от 5 до 11; от 5 до 10; от 5 до 9; от 5 до 8 и т.д. и т.п.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке легкой цепи, полученном из SEQ ID NO: 16, может составлять, например, от 1 до 15 аминокислотных замен.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке тяжелой цепи, полученном из SEQ ID NO: 18, может составлять, например, от 1 до 20 аминокислотных замен. В некоторых случаях при рассмотрении гуманизированной версии последовательности SEQ ID NO: 18, может быть полезно иметь по меньшей мере три аминокислотные замены.

В последующем более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке легкой цепи, полученном из SEQ ID NO: 24, может составлять, например, от 1 до 16 аминокислотных замен.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке тяжелой цепи, полученном из SEQ ID NO: 26, может составлять, например, от 1 до 17 аминокислотных замен.

В последующем более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке легкой цепи, полученном из SEQ ID NO: 48, может составлять, например, от 1 до 11 аминокислотных замен.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке тяжелой цепи, полученном из SEQ ID NO: 46, может составлять, например, от 1 до 23 аминокислотных замен.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения от одной до двадцати аминокис-

лотных замен может находиться, например, в вариабельном участке легкой цепи.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения от одной до двадцати аминокислотных замен может находиться, например, в вариабельном участке тяжелой цепи.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент может, таким образом, иметь вариабельный участок легкой цепи, содержащий вплоть до двадцати аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 24, и может иметь вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий вплоть до двадцати аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 26. Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент может, таким образом, иметь вариабельный участок легкой цепи, содержащий вплоть до двадцати пяти аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 48, и может иметь вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий вплоть до двадцати пяти аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 46.

Здесь следует понимать, что если гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент имеет два вариабельных участка в легкой цепи, то каждый из вариабельных участков легкой цепи может независимо содержать вплоть до двадцати пяти, двадцати четырех, двадцати трех, двадцати двух, двадцати одной, двадцати, девятнадцати, восемнадцати, семнадцати, шестнадцати, пятнадцати, четырнадцати, тринадцати, двенадцати, одиннадцати, десяти, девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех, трех, двух, одной аминокислотных замен, и каждый из вариабельных участков тяжелой цепи может независимо содержать вплоть до двадцати пяти, двадцати четырех, двадцати трех, двадцати двух, двадцати одной, двадцати, девятнадцати, восемнадцати, семнадцати, шестнадцати, пятнадцати, четырнадцати, тринадцати, двенадцати, одиннадцати, десяти, девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех, трех, двух, одной аминокислотных замен.

Как обсуждается в данном документе, аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными. В иллюстративном варианте осуществления аминокислотные замены могут быть консервативными.

Здесь следует понимать, что гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент данного изобретения может также иметь вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи, в котором есть делеция в отличие от последовательностей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 24 и/или SEQ ID NO: 26. Такие делеции можно найти, например, в амино- или карбоксиконце вариабельного участка легкой цепи и/или вариабельного участка тяжелой цепи.

Другой иллюстративный вариант осуществления гуманизированного антитела или антиген-связывающего фрагмента данного изобретения включает, например, антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющий вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 190.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 186" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 или по меньшей мере 112 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 186" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 186, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 186, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 108, с 5 по 109, с 13 по 103, с 14 по 111 последовательности SEQ ID NO: 186, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 187" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 или по меньшей мере 112 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 187" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 187, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 187, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 7 по 109, с 12 по 104, с 22 по 113, с 18 по 112 последовательности SEQ ID NO: 187, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 188", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 189" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 190" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 189 или 190.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содер-

жит (или дополнительно содержит), например, вариабельный участок тяжелой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 191, 192, 193, 194, 195, 196 или 197.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 191" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 191" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 191, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 191, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 1 по 106, с 2 по 112, с 11 по 113, с 7 по 102 последовательности SEQ ID NO: 191, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 192" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 192" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 192, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 192, например последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 109, с 8 по 113, с 1 по 102, с 2 по 105 последовательности SEQ ID NO: 192, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 193", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 194", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 195", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 196" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 197" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 194, 195, 196 или 197.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать, например:

а) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 186, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

б) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 187, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

с) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 188, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

д) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197; или

е) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 190, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 189 или 190, и вариабельный участок тяжелой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 194, 195, 196 или 197.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой

цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 194.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 195.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 196.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 197.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 194.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 195.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 196.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 197.

Другой иллюстративный вариант осуществления гуманизированного антитела или антиген-связывающего фрагмента данного изобретения включает, например, антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющий вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 168.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 174" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 174" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 174, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 174, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 108, с 5 по 109, с 13 по 103, с 14 по 111 последовательности SEQ ID NO: 174, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 175" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 175" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 175, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 175, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 7 по 109, с 12 по 104, с 22 по 113, с 18 по 112 последовательности SEQ ID NO: 175, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 176" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 168" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 168.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содержит (или дополнительно содержит), например, вариабельный участок тяжелой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 177, 178, 179 или 169.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 177" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 177" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 177, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 177, такие

как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 1 по 106, с 2 по 112, с 11 по 113, с 7 по 102 последовательности SEQ ID NO: 177, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 178" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 178" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 178, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 178, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 109, с 8 по 113, с 1 по 102, с 2 по 105 последовательности SEQ ID NO: 178, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 179" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 169" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 169.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать, например:

f) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 174, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169;

g) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 175, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169;

h) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 176, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169;

i) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 168, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 168, и вариабельный участок тяжелой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 169.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 168, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 169.

Другие иллюстративные варианты осуществления гуманизированных антител или антиген-связывающих фрагментов настоящего изобретения представляют собой те, которые могут содержать вариабельный участок легкой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 180, 181, 182 или 172.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 180" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 или по меньшей мере 107 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 180" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 180, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 180, например последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 102, с 11 по 106, с 1 по 106, с 3 по 95, с 5 по 95 последовательности SEQ ID NO: 180, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 181" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 или по меньшей мере 107 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 181" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 181, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 181, например последовательность, со-

держащая аминокислоты с 9 по 106, с 10 по 101, с 1 по 98, с 3 по 99, с 7 по 107 последовательности SEQ ID NO: 181, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 182" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 172" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 172.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содержит (или дополнительно содержит), например, вариабельный участок тяжелой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 183, 184, 185 или 173.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 183" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 183" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 183, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 183, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 3 по 111, с 1 по 106, с 2 по 104, с 5 по 106, с 10 по 107 последовательности SEQ ID NO: 183, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 185" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 185" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 185, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 185, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 3 по 107, с 1 по 115, с 1 по 110, с 22 по 116, с 20 по 115 последовательности SEQ ID NO: 185, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 184" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 173" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 173.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать, например:

а) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 180, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173;

б) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 181, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173;

с) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 182, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173; или

д) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 172, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может иметь по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 172, и вариабельный участок тяжелой цепи может иметь по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 173.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 172, и вариабельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 173.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может иметь вариабельный

участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи, как описывалось выше, и может дополнительно содержать аминокислоты константного участка, такие как, например, аминокислоты константного участка человеческого антитела.

В иллюстративном варианте осуществления антитела или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может содержать, например, константный участок IgG1 человека.

В соответствии с другим иллюстративным вариантом осуществления настоящего изобретения антиген-связывающим фрагментом может быть, например, scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

Продуцирование антител в клетках.

Антитела к KAAG1, которые раскрыты в данном документе, можно получить при помощи ряда способов, которые знакомы специалистам в данной области техники, как, например, методика с использованием гибридомы или способами рекомбинантной ДНК.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к KAAG1 можно получить с помощью традиционной методики с использованием гибридомы, в котором мышь иммунизируют антигеном, клетки селезенки выделяют и проводят слияние с миеломными клетками без экспрессии HGPRT, и проводят отбор гибридных клеток при помощи среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимин (HAT).

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к KAAG1 можно получать при помощи способов рекомбинантной ДНК.

Для экспрессии антител к KAAG1 нуклеотидные последовательности, которые могут кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, или любую другую, можно вставить в вектор экспрессии, т.е. вектор, который содержит элементы для управления транскрипцией и трансляцией вставленной кодирующей последовательности в конкретном хозяине. Эти элементы могут включать регуляторные последовательности, такие как энхансеры, конститутивные и индуцибельные промоторы и 5'- и 3'-нетранслируемые участки. Для построения таких векторов экспрессии можно применять способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти способы включают методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

Для экспрессии полипептида или РНК, полученной из нуклеотидных последовательностей, которые могут кодировать любую из описанных в данном документе легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, можно использовать ряд систем вектор экспрессии/хозяин, которые известны специалистам в данной области техники. Такие системы включают, без ограничения, микроорганизмы, как, например, бактерии, трансформированные векторами экспрессии ДНК на основе рекомбинантного бактериофага, плазмиды или космиды; дрожжи, трансформированные векторами экспрессии на основе дрожжей; системы клеток насекомых, инфицированные векторами на основе бакуловирусов, системы растительных клеток, трансформированные вирусными или бактериальными векторами экспрессии; или системы животных клеток. Для долгосрочного продуцирования рекомбинантных белков в системах млекопитающих можно выполнить стабильную экспрессию в клеточных линиях. Например, нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, описанные в данном документе, могут быть трансформированы в клеточную линию при помощи векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные сайты начала репликации и/или эндогенные элементы экспрессии и селективный или видимый маркерный ген на одном и том же или на отдельном векторе. Настоящее изобретение не следует ограничивать используемым вектором или клеткой-хозяином. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно лигировать в отдельный вектор экспрессии и экспрессировать каждую цепь отдельно. В другом варианте осуществления как легкие, так и тяжелые цепи, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно лигировать в один вектор экспрессии и экспрессировать одновременно.

Альтернативно, РНК и/или полипептид можно экспрессировать с вектора, содержащего нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, с помощью системы транскрипции *in vitro* или системы сопряженной транскрипции/трансляции *in vitro* соответственно.

В целом, клетки-хозяева, которые содержат нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, и/или которые экспрессируют полипептид, кодируемый нуклеотидными последовательностями, способными кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, или их части, могут быть определены при помощи ряда процедур, известных специалистам в данной области техники. Такие процедуры включают, без ограничения, гибридизацию ДНК/ДНК или ДНК/РНК, ПЦР-амплификацию и биологические способы анализа белка или метод иммуноанализа белка, которые включают основанные на мембране, растворе или чипе методики определения и/или количественного анализа последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот. Иммунологические способы определения и измерения экспрессии полипептидов при помощи либо специфических поликлональных, либо монокло-

нальных антител, известны в данной области техники. Примеры таких методик включают твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), радиоиммуноанализы (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Специалисты в данной области техники могут легко адаптировать такие методики для настоящего изобретения.

Клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно, таким образом, культивировать в условиях для транскрипции соответствующей РНК (мРНК, миРНК, кмРНК и т.д.) и/или экспрессии полипептида из клеточной культуры. Продуцируемый клеткой полипептид может выделяться или может оставаться внутри клетки в зависимости от применяемой последовательности и/или вектора. В иллюстративном варианте осуществления векторы экспрессии, содержащие нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, могут быть сконструированы с содержанием сигнальных последовательностей, которые направляют секрецию полипептида через мембрану прокариотической или эукариотической клетки.

В связи с природной вырожденностью генетического кода, другие ДНК-последовательности, которые кодируют такую же, практически такую же или функционально эквивалентную аминокислотную последовательность, можно получить и применять, например, для экспрессии полипептида, кодируемого нуклеотидными последовательностями, способными кодировать любую из тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе. Нуклеотидные последовательности настоящего изобретения могут быть сконструированы при помощи способов, которые, как правило, известны в данной области техники для изменения нуклеотидных последовательностей для ряда целей, включая, без ограничения, модификацию клонирования, процессинга и/или экспрессии генетического продукта. Для конструирования нуклеотидных последовательностей можно применять перестановку ДНК при помощи рандомизированной фрагментации и вторичную сборку фрагментов гена и синтетических олигонуклеотидов при помощи ПЦР. Например, олигосахарид-опосредованный сайт-направленный мутагенез можно применять для введения мутаций, которые создают новые рестрикционные сайты, изменяют профили гликозилирования, изменяют предпочтение в использовании кодонов, производят сплайс-варианты и тому подобное.

Кроме того, штамм клеток-хозяев можно выбрать по его способности модулировать экспрессию вставленных последовательностей или перерабатывать экспрессированный полипептид требуемым образом. Такие модификации полипептида включают, без ограничения, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование. В иллюстративном варианте осуществления могут быть желательны антитела к KAAG1, которые содержат специальные структуры или профили гликозилирования. Пост-трансляционный процессинг, который расщепляет "препро"-форму полипептида, также можно применять с тем, чтобы точно задать белковое нацеливание, фолдинг и/или активность. Различные клетки-хозяева, которые имеют специфическое клеточное устройство и характерные механизмы пост-трансляционных активностей (например, СНО, HeLa, MDCK, HEK293 и W138), можно приобрести или получить из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и могут быть выбраны для обеспечения надлежащей модификации и переработки экспрессированного полипептида.

Специалисты в данной области техники легко поймут, что природные, модифицированные или рекомбинантные последовательности нуклеиновых кислот могут быть лигированы с гетерологичной последовательностью, что приведет к трансляции химерного полипептида, содержащего гетерологичные полипептидные фрагменты в любых вышеупомянутых системах хозяев. Такие гетерологичные полипептидные фрагменты могут облегчать очистку химерных полипептидов при помощи коммерчески доступных аффинных матриц. Такие фрагменты включают, без ограничения, глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающий мальтозу, тиоредоксин, пептид, связывающий кальмодулин, 6-His (His), FLAG, с-тус, гемагглютинин (НА) и эпитопы антител, такие как эпитопы моноклональных антител.

В еще одном аспекте настояще изобретение относится к полинуклеотиду, который может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный белок. Химерный белок может содержать партнера слияния (например, НА, Fc и т.д.), слитого с полипептидом (например, полной легкой цепью, полной тяжелой цепью, вариабельными участками, CDR и т.д.), описанным в данном документе.

Специалисты в данной области легко поймут, что последовательности нуклеиновых кислот и полипептидов могут быть синтезированы полностью или частично при помощи хорошо известных в данной области техники химических или ферментативных способов. Например, синтез пептидов можно осуществить при помощи ряда твердофазных методик и оборудования, так, например, для автоматического синтеза можно применять синтезатор пептидов ABI 431A (PE Biosystems). В случае необходимости, для получения вариантового белка аминокислотную последовательность можно изменить в ходе синтеза и/или объединить с последовательностями из других белков.

Конгьюгаты антител.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может быть соединен с поддающимся обнаружению фрагментом (т.е. предназначенным для обнаружения или диагностики) или

с терапевтическим фрагментом (для терапевтических целей).

"Обнаруживаемый фрагмент" представляет собой фрагмент, обнаруживаемый при помощи спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических и/или других физических средств. Обнаруживаемый фрагмент может быть соединен либо напрямую и/либо опосредованно (например, посредством связи, как, например, без ограничений, DOTA- или NHS-связь) с антителами и их антиген-связывающими фрагментами настоящего изобретения при помощи способов, хорошо известных в данной области техники. Можно применять широкий спектр обнаруживаемых фрагментов, при этом выбор зависит от необходимой чувствительности, простоты конъюгации, требований к стабильности и доступного оборудования. Подходящий обнаруживаемый фрагмент включает, без ограничения, флуоресцентную метку, радиоактивную метку (например, без ограничения, ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} и включая позитронно-активные изотопы для ПЭТ-сканера и т.д.), активную метку для ядерного магнитного резонанса, люминесцентную метку, хемилюминесцентную метку, хромофорную метку, ферментную метку (например, и без ограничения, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.д.), квантовые точки и/или наночастицу. Обнаруживаемый фрагмент может вызывать и/или производить детектируемый сигнал, таким образом, позволяя регистрировать сигнал от обнаруживаемого фрагмента.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент может быть соединен (модифицирован) с терапевтическим фрагментом (например, лекарственным средством, цитотоксическим фрагментом, противораковым средством).

В иллюстративном варианте осуществления антитела к KAAG1 или антиген-связывающие фрагменты могут содержать ингибитор, химиотерапевтическое или цитотоксическое средство. Например, антитело или антиген-связывающие фрагменты можно конъюгировать с химиотерапевтическим или цитотоксическим средством. Такие химиотерапевтические или цитотоксические средства включают, без ограничения, иттрий-90, скандий-47, рений-186, йод-131, йод-125 и многие другие известные специалистам в данной области техники (например, лютеций (например, Lu^{177}), висмут (например, Bi^{213}), медь (например, Cu^{67})). В других случаях химиотерапевтическое или цитотоксическое средство могут содержать, без ограничения, 5-фторурацил, адриамицин, иринотекан, соединения на основе платины, такие как цисплатин и анти-тубулин или анти-миотические соединения, такие как таксаны, доксорубицин и циклофосфамид, эндотоксин представителей рода *Pseudomonas*, рицин и другие токсины. Пригодные лекарственные конъюгаты антител выбирают из тех, которые находятся в интервале IC_{50} , равном 0,001-150 нМ, 0,001-100 нМ, 0,001-50 нМ, 0,001-20 нМ или 0,001-10 нМ (включительно). Цитотоксическое лекарственное средство, используемое для присоединения, таким образом, выбирают на основе этих критерий.

Кроме того, для осуществления способов настоящего изобретения и, как известно в данной области техники, антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения (конъюгированное или нет) можно применять в сочетании со второй молекулой (например, вторичным антителом и т.д.), которое способно специфично связываться с антителом или антиген-связывающим фрагментом настоящего изобретения, и которые могут нести необходимый обнаруживаемый, диагностический или терапевтический фрагменты.

Фармацевтические композиции антител и их применение

Также настоящим изобретением охватываются фармацевтические композиции антител к KAAG1 или антиген-связывающих фрагментов (конъюгированных или нет). Фармацевтическая композиция может содержать антитело к KAAG1 или антиген-связывающий фрагмент и может также включать фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к композиции, которая может содержать антитело или антиген-связывающий фрагмент, описанный в данном документе, и носитель.

Настоящее изобретение относятся к фармацевтической композиции, которая может содержать антитело или антиген-связывающий фрагмент, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнение к активным ингредиентам, фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители, включая воду, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), солевые растворы, желатин, масла, спирты и другие наполнители и вспомогательные добавки, которые способствуют переработке активных соединений в препараты, которые можно применять в фармацевтических целях. В других случаях такие препараты могут быть простерилизованы.

Как используется в данном документе выражение "фармацевтическая композиция" означает терапевтически эффективные количества средства вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, растворителями, эмульгаторами, вспомогательным средством и/или носителями. Как используется в данном документе выражение "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект для данного состояния и схемы введения. Такие композиции представляют собой жидкости или лиофилизированные или иным образом высушенные составы и включают разбавители с различным содержанием буферных компонентов (например, Tris-HCl, ацетат, фосфат), pH и ионной силой, добавок, как, например, альбумин или желатин, для предупреждения абсорбции на поверхностях дегергентов (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68,

соли желчной кислоты). Солюбилизирующие средства (например, глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, магнабисульфит натрия), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), вещества-наполнители или модификаторы концентрации (например, лактоза, маннит), ковалентное присоединение полимеров, как, например, полиэтиленгликоля с белком, комплексообразование с ионами металлов или внесение материала в препараты или на них в виде частиц полимерных соединений, как, например, полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, гидрогелей и т.д., или на липосомы, микроЭмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, "тени" эритроцитов или сферопласти. Такие композиции будут оказывать действие на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*. Композиции с контролируемым или пролонгированным высвобождением включают состав в липофильном депо (например, жирные кислоты, виды воска, масла). Также настоящим изобретением охватываются композиции в виде частиц, покрытых полимерами (например, полоксамерами или полоксаминами). Другие варианты осуществления композиций настоящего изобретения включают защитные оболочки для форм в виде частиц, ингибиторы протеаз или усиители проникновения для различных путей введения, включая парентеральные, пульмональные, назальные, пероральные, вагинальные, ректальные пути. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально, в район опухоли, трансмукозально, трансдермально, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, подкожно, внутрибрюшинно, интравентрикулярно, интракраниально и в опухоль.

Дополнительно, как используется в данном документе выражения "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтический носитель" известны в данной области техники и включают, без ограничения, 0,01-0,1 или 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Дополнительно, такие фармацевтически приемлемые носители могут быть водными или неводными растворами, супензиями и эмульсиями. Примерами неводных растворов являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, как, например, оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, как, например, этилолеат. Водные носители включают воду, спирто/водные растворы, эмульсии или супензии, включая солевой раствор и буферную среду. Парентеральные среды для лекарства включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу с хлоридом натрия, раствор Рингера с нелетучими маслами и лактатом. Внутривенные среды включают жидкие и питательные наполнители, электролитные наполнители, как, например, те, которые основаны на растворе Рингера с декстрозой, и т.д. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, объединяющие средства, инертные газы и т.п.

Для любого соединения терапевтически эффективная доза может быть рассчитана изначально либо при анализах клеточных культур, либо в животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки или свиньи. Животную модель можно применять для определения диапазонов концентрации и пути введения. Такую информацию затем можно применять для определения пригодных доз и путей введения у людей. Такие методики хорошо известны специалисту в данной области техники, и терапевтически эффективная доза относится к количеству активного ингредиента, которое облегчит симптомы или состояние. Терапевтическую эффективность и токсичность можно определить при помощи стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или с экспериментальными животными, как, например, при помощи подсчета и установления различий статистических данных ED50 (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD50 (доза, летальная для 50% популяции). Любые описанные выше терапевтические композиции можно применять для любого нуждающегося в терапии подобного рода субъекта, включая, без ограничения, млекопитающих, таких как собаки, коты, коровы, лошади, кролики, обезьяны и люди.

Используемые в настоящем изобретении фармацевтические композиции можно вводить посредством любого числа путей, включая, без ограничения, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедулярный, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, подкожный, интраперитонеальный, интраназальный, энтеральный, местный, подъязычный или ректальный способы.

Способы применения

Термин "лечение" в целях настоящего раскрытия относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где преследуется цель предотвратить или замедлить (уменьшить) целевое патологическое состояние или расстройство. Нуждающиеся в лечении включают уже имеющих расстройство, а также тех, которые предрасположены к развитию расстройства, или тех, у кого расстройство необходимо предупредить.

Настоящее изобретение в одном своем аспекте предоставляет способ лечения лица, страдающего раком молочной железы, или с подозрением на него, с использованием антитела или антиген-связывающего фрагмента, который способен специфично связываться с KAAG1.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может страдать РМЖ с отрицательными экспрессией рецептора эстрогена, экспрессией рецептора прогестерона и/или экспрессией Her2 (или отсутствием избыточной экспрессии).

Также в соответствии с настоящим изобретением лицо может страдать РМЖ с низкой экспрессией

по меньшей мере одного из следующего: рецептора эстрагена, рецептора прогестерона и/или Her2.

Например, опухоль может быть негативной с точки зрения (или иметь низкую экспрессию) как экспрессии рецептора эстрагена, так и экспрессии рецептора прогестерона.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может страдать РМЖ, который характеризуется как тройной негативный или базальноподобный.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к применению выделенных антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе, в лечении или диагностике РМЖ, характеризуемого отсутствием экспрессии рецептора эстрагена, экспрессии рецептора прогестерона и/или избыточной экспрессии Her2, или низкой экспрессией по меньшей мере одного из этих трех маркеров.

В соответствии с настоящим изобретением способ может включать, например, введение нуждающегося в этом лицу антитела или антиген-связывающего фрагмента, который способен специфично связываться с KAAG1. Нуждающееся лицо предпочтительно отбирают на основании отсутствия экспрессии ER, экспрессии PgR и/или отсутствию избыточной экспрессии белка HER2. Клинические исследования этих маркеров обычно проводят, используя гистопатологические способы (иммуногистохимические, FISH и т.п.), и/или путем изучения экспрессии генов (см., например, Dent et al, 2007, Bernstein and Lacey, 2011). Нуждающимся лицом, таким образом, может быть лицо, у которого был установлен диагноз тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ.

Таким образом, настоящее изобретение в особенности относится к терапевтическому лечению лица, страдающего тройным негативным РМЖ или базальноподобным РМЖ с применением антитела к KAAG1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны специфично связываться с KAAG1 на поверхности клеток опухоли. Такие антитела могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в KAAG1 в пределах аминокислот с 30 по 84, включительно (например, в KAAG1 в пределах аминокислот с 36 по 60 (включительно) или в пределах аминокислот с 61 по 84 (включительно)).

Пригодными антителами могут быть те, которые выступают посредниками в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, и те, которые коныюгированы с терапевтическим фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут быть, например, моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом или их антиген-связывающим фрагментом.

Способ настоящего изобретения может включать введение антитела или антиген-связывающегося фрагмента в комбинации с ингибитором, химиотерапевтическим или цитотоксическим средством.

Другие способы лечения, охваченные настоящим изобретением, включают введение других типов ингибиторов KAAG1, таких как терапевтические средства на антисмысловой основе (миРНК, антисмыловые средства, рибозимы и т.п.).

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает способ лечения тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ путем введения ингибитора активности или экспрессии KAAG1 нуждающемуся лицу.

Ингибитор может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Более конкретно ингибитор может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Например, ингибитор может содержать по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов (по меньшей мере 15, по меньшей мере 20), комплементарных последовательности SEQ ID NO: 1 или нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых случаях антитела к KAAG1 или их фрагменты могут взаимодействовать с раковыми клетками, экспрессирующими KAAG1, и вызывать иммунную реакцию, выступая посредником в АЗКЦ. В других случаях антитела и фрагменты к KAAG1 могут блокировать взаимодействие KAAG1 с его белковыми партнерами.

В конкретных случаях, антитела к KAAG1 и их антиген-связывающие фрагменты можно вводить одновременно с другими лечебными средствами, предназначенными для такого же состояния (ингибитор, химиотерапевтические или цитотоксические средства). В связи с этим, антитела можно вводить с ингибитором PARP1, ингибитором EGFR, антимитотическими средствами (например, таксанами), средствами на основе платины (например, цисплатин), ДНК-разрушающими средствами (например, доксорубицин) и другими противораковыми терапевтическими средствами, которые известны специалистам в данной области техники. В других случаях, антитела к KAAG1 и их антиген-связывающие фрагменты можно вводить с другими терапевтическими антителами. Они включают, без ограничения, антитела, которые нацелены на EGFR, CD-20 и Her2.

Настоящее изобретение относится в своем дополнительном аспекте к способу ингибирования роста клеток, экспрессирующих KAAG1, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные), причем способ может включать приведение в контакт клетки с эффективным количеством антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также охватывает способ лечения рака или ингибирования роста клеток,

экспрессирующих KAAG1, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные), у млекопитающих, причем способ может включать введение антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом млекопитающему.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение предлагает способ лечения, диагностические способы и способ обнаружения при помощи антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения и применение таких антител или антиген-связывающего фрагмента в производстве фармацевтической композиции или лекарственного средства для таких целей.

Способ лечения, охваченный настоящим изобретением, включает введение антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанного в данном документе, нуждающемуся в этом млекопитающему, и особенно пациенту, имеющему рак, или с подозрением на рак, характеризующийся как эстроген-негативный (ER-негативный), прогестерон-негативный (PgR-негативный) и/или при котором отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативный).

Изобретение в других аспектах также предоставляет способы для уменьшения распространения опухоли, инвазивности опухоли или вызывает лизис опухоли, которые могут включать введение выделенного антитела или антиген-связывающего фрагмента нуждающемуся в этом млекопитающему.

Изобретение, таким образом, относится к применению выделенного антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанного в данном документе, для (производстве фармацевтической композиции для) лечения рака, уменьшения распространения опухоли, инвазивности опухоли, образования опухоли или вызова лизиса опухоли, состоящей из экспрессирующих KAAG1 опухолевых клеток, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или в которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные).

Антитело или антиген-связывающий фрагмент, конкретнее, можно применять при злокачественной опухоли, включая, например, злокачественную опухоль, обладающую способностью к метастазированию, и/или опухолевые клетки, которые характеризуются "безъякорным" ростом. Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения также можно применять для диагностики рака. Диагностику рака можно осуществлять *in vivo* при помощи введения антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения млекопитающему, которое страдает от рака, или у него подозревают наличие рака. Диагностику также можно осуществлять *ex vivo* путем приведения в контакт образца, полученного от млекопитающего, с антителом или антиген-связывающим фрагментом и выявления присутствия или отсутствия клеток (опухолевых клеток), экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

Настоящее изобретение также охватывает способ выявления рака или определения клеток, экспрессирующих KAAG1, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными), и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные), у млекопитающих, причем способ может включать введение антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом млекопитающему.

Настоящее изобретение в другом своем аспекте относится к способу обнаружения клеток, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1, при этом способ может включать приведение в контакт клетки с антителом или антиген-связывающим фрагментом, описанным в данном документе, и обнаружение комплекса, образованного антителом и клеткой, экспрессирующей KAAG1 или вариант KAAG1. Иллюстративные варианты осуществления антител или антиген-связывающих фрагментов, применяемых в способах обнаружения, являются такими, которые могут связываться с внеклеточным участком KAAG1.

Другими иллюстративными вариантами осуществления антител или антиген-связывающего фрагмента, применяемого в способах обнаружения, являются те, которые связываются с KAAG1 или вариантом KAAG1, экспрессированным на поверхности опухолевых клеток, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обнаружения KAAG1 (SEQ ID NO: 2), варианта KAAG1, имеющего по меньшей мере 80% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2, или секретированной формы или циркулирующей формы KAAG1 или варианта KAAG1, при этом способ может включать приведение в контакт клетки, экспрессирующей KAAG1 или вариант KAAG1, или образца (биопсии, сыворотки, плазмы, мочи и т.д.)/ содержащего или с подозрением на содержание KAAG1 или варианта KAAG1, с описанными в данном документе антителом или антиген-связывающими фрагментами, и количественного измерения связывания. Образец может быть взят у млекопитающего (например, человека), у которого может наблюдаться рак (например, раком молочной железы, который характеризуется как эстроген-негативный (ER-негативный), прогестерон-негативный (PgR-негативный) и/или у которого отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативный), такой как базально-подобный РМЖ или тройной негативный РМЖ) или у которого подозревают рак. Образец может представлять собой образец ткани, полученный от млекопитающего, или надосадочную жидкость клеточной культуры.

В соответствии с настоящим изобретением образец может быть образцом сыворотки, образцом плазмы, образцом крови или асцитической жидкостью, полученной от млекопитающего. Описанное в

данном документе антитело или антиген-связывающий фрагмент может преимущественно обнаруживать секретированную или циркулирующую форму (циркулирующую в крови) KAAG1.

Способ может включать количественное определение комплекса, образованного антителом или антиген-связывающим фрагментом, связанным с KAAG1 или с вариантом KAAG1.

Связывание антитела с антигеном будет приводить к повышению предполагаемой молекулярной массы антигена. Таким образом, при специфическом связывании антитела или антиген-связывающего фрагмента с антигеном происходит физическое изменение.

Такие изменения можно обнаружить при помощи, например, электрофореза с последующим вестерн-блоттингом и окрашиванием геля или блотта, масс-спектрометрии, ВЭЖХ в сочетании с компьютерной обработкой или др. Устройства, способные рассчитывать сдвиг молекулярной массы, известны в данной области техники и включают, например, PhosphorImager™.

Если антитело включает, например, обнаруживаемую метку, то комплекс антиген-антитело можно обнаружить по флюoresценции, излучаемой меткой, радиационному излучению метки, ферментативной активности метки со своим субстратом, или др.

Обнаружение и/или измерение связывания антитела или антиген-связывающего фрагмента с антигеном может быть осуществлено при помощи ряда способов, известных в данной области техники. Связывание антитела или антиген-связывающего фрагмента с антигеном можно отслеживать при помощи устройства, способного выявлять сигнал, излучаемый обнаруживаемой меткой (радиационное излучение, флюoresценция, изменение цвета и т.д.). Такое устройство предоставляет данные, которые указывают на произошедшее связывание, и может также предоставлять указание на количество антитела, связанного с антигеном. Устройство (обычно, соединенное с компьютером) может также быть способно рассчитывать разницу между фоновым сигналом (например, сигналом, получаемым при отсутствии связывания антиген-антитело) или фоновым шумом и сигналом, получаемым при специфическом связывании антитело-антigen. Такие устройства, таким образом, могут предоставлять пользователю показатели и выводы относительно того, был ли выявлен антиген или нет.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к наборам, которые могут включать один или несколько контейнеров, содержащих одно или несколько описанных в данном документе антител или антиген-связывающих фрагментов.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки.

Антитела обычно получают в клетках, допускающих экспрессию легкой цепи и тяжелой цепи, экспрессируемых с вектора(ов), содержащего(их) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает нуклеиновые кислоты, способные кодировать любые из описанных в данном документе CDRs, вариабельные участки легкой цепи, вариабельные участки тяжелой цепи, легкие цепи, тяжелые цепи.

Настоящее изобретение, таким образом, в дополнительном аспекте относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое способно специфически связываться с KAAG1.

Иллюстративные варианты осуществления нуклеиновых кислот, охваченные настоящим изобретением, включают нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности (т.е. по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% идентичность последовательности) с любой одной из последовательностей SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 45 и 47, фрагментов (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов) и комплементарных им последовательностей.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота может в особенности кодировать вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое может быть способно вызывать гибель (устранение, уничтожение, лизис) опухолевых клеток, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

В соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота может в особенности кодировать вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое может быть способно снижение распространения опухолевых клеток, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

В соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота может, в частности, кодировать вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое может быть способно уменьшать или затруднять образование опухолей, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

Иллюстративные варианты осуществления нуклеиновых кислот настоящего изобретения включают нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельный участок легкой цепи, содержащий:

а) последовательность CDRL1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73;

б) последовательность CDRL2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; или

с) последовательность CDRL3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере два CDRs из CDRL1, CDRL2 или CDRL3.

Также в соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок легкой цепи, который может содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий:

а) последовательность CDRH1, включающей SEQ ID NO: 80;

б) последовательность CDRH2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85; или

с) последовательность CDRH3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере два CDRs из CDRH1, CDRH2 или CDRH3.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать один CDRH1, один CDRH2 и один CDRH3.

Также настоящим изобретением охватываются нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты антитела по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену по меньшей мере в двух из CDRs.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену в 3 CDR.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере две консервативные аминокислотные замены по меньшей мере в одном из CDRs.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере две консервативные аминокислотные замены по меньшей мере в двух из CDRs.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере две консервативные аминокислотные замены в трех CDRs.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок легкой цепи, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125.

Другие аспекты настоящего изобретения помимо этого относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему описанные в данном документе нуклеиновые кислоты.

В соответствии с настоящим изобретением вектор может представлять собой вектор экспрессии.

Вектор, который содержит элементы для управления транскрипцией и трансляцией вставленной кодирующей последовательности у конкретного хозяина, известны в данной области техники. Эти элементы могут включать регуляторные последовательности, такие как энхансеры, конститутивные и индуцибельные промоторы и 5'- и 3'-нетранслируемые участки. Для построения таких векторов экспрессии можно применять способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти способы включают методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке, которая может содержать описанную в данном документе нуклеиновую кислоту.

Выделенная клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный участок легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи, либо на от-

дельных векторах, либо на одном векторе. Выделенная клетка также может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, и нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, либо на отдельных векторах, либо на одном векторе.

В соответствии с настоящим изобретением клетка может быть способна к экспрессии, сборке и/или секреции антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет клетку, которая может содержать и/или может экспрессировать описанное в данном документе антитело.

В соответствии с настоящим изобретением клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный участок легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи.

Клетка может быть способна к экспрессии, сборке и/или секреции антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

Приведенные ниже примеры представлены для дополнительного описания деталей настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

Данный пример раскрывает способы, используемые для превращения Fab в полные химерные моноклональные антитела IgG1.

За исключением возможности проведения исследования взаимодействия моноклональных антител с Fab фрагментами и белка KAAG1, применение Fab может быть ограничено в отношении проведения достоверных *in vitro* и *in vivo* исследований для подтверждения биологической функции антигена. Таким образом, было необходимо перенести вариабельные участки легкой и тяжелой цепей, содержащиеся в Fab, в полные каркасы антител для выработки химерных IgG1 мыши-человека. Векторы экспрессии как для легкой, так и для тяжелой цепи иммуноглобулина построили таким образом, чтобы i) последовательности исходного бактериального сигнального пептида перед Fab в векторах экспрессии были заменены сигнальными пептидами млекопитающих и ii) константные участки легкой и тяжелой цепей в антителах мыши были заменены константными участками человека. В способах осуществления такого переноса используют стандартные методики молекулярной биологии, которые известны специалистам в данной области техники.

Вектор экспрессии легкой цепи - существующую экспрессирующую плазмиду млекопитающих, называемую pTTVH8G (Durocher et al., 2002), предназначенную для применения в системе временной трансфекции 293E, модифицировали для размещения вариабельного участка легкой цепи мыши. Полученная химерная легкая цепь мыши-человека содержала вариабельный участок мыши, за которым следовал константный домен каппа человека. Последовательность кДНК, кодирующую константный домен каппа человека, амплифицировали с помощью ПЦР с применением праймеров OGS1773 и OGS1774 (SEQ ID NO: 55 и 56 соответственно). Нуклеотидная последовательность и соответствующая аминокислотная последовательность константного участка каппа человека показаны в SEQ ID NO: 57 и 58 соответственно. Полученный ПЦР-продукт длиной в 321 пару оснований лигировали в pTTVH8G сразу после последовательности сигнального пептида VEGF A человека (NM_003376). В ходе данного этапа клонирования также разместили уникальные сайты для рестрикционных эндонуклеаз, которые делают возможным точное размещение кДНК, кодирующих вариабельные участки легкой цепи мыши. Последовательность полученной в результате этого плазиды экспрессии, называемой pTTVK1, показана в SEQ ID NO: 59. Основываясь на последовательностях, раскрытых в табл. 2, были разработаны праймеры ПЦР, специфичные для вариабельного участка легкой цепи антител 3D3, 3G10, 3C4 и 3A4 (SEQ ID NOS: 15, 19, 23 и 47 соответственно), которые включали на своем 5'-конце последовательность, идентичную последним 20 парам оснований сигнального пептида VEGF A. Последовательности этих праймеров показаны в SEQ ID NOS: 60, 61, 62 и 213. Один и тот же обратный праймер использовали для амплификации всех трех вариабельных участков легких цепей 3D3, 3G10 и 3C4, поскольку с самого края 3'-концы были идентичными. Праймер (SEQ ID NO: 63) включал на своем 3'-конце последовательность, идентичную первым 20 парам оснований константного домена каппа человека. Праймер SEQ ID NO: 214 использовали для амплификации вариабельного участка легкой цепи 3A4. Как на ПЦР-фрагменты, так и на расщепленную pTTVK1 воздействовали 3'-5' экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы T4, что в результате дало комплементарные концы, которые соединили путем гибридизации. Полученные в результате реакции гибридизации продукты трансформировали в компетентные *E. coli*, и экспрессирующие плазиды проверили путем секвенирования для того, чтобы убедиться, что вариабельные участки легкой цепи мыши правильно вставлены в вектор экспрессии pTTVK1. Специалисты в данной области техники легко поймут, что способ, используемый для конструирования плазиды экспрессии легкой цепи, применим к антителам к KAAG1, содержащимся в исходной библиотеке Fab.

Вектор экспрессии тяжелой цепи - вектор экспрессии, который давал тяжелую цепь иммуноглобулина 3A4, конструировали аналогичным образом, как и описанную выше pTTVK1, для получения легких цепей иммуноглобулинов. Плазиду pYD11 (Durocher et al., 2002), которая содержит последовательность сигнального пептида IgGK человека, а также участки CH2 и CH3 Fc-домена человека IgG1, модифициро-

вали путем лигирования последовательности кДНК, кодирующей константный участок СН1 человека. Праймеры ПЦР OGS1769 и OGS1770 (SEQ ID NOS: 64 и 65), сконструированные так, чтобы содержать уникальные сайты эндонуклеаз рестрикции, использовали для амплификации участка IgG1 СН1 человека, содержащего нуклеотидную последовательность и соответствующую аминокислотную последовательность, которые показаны в SEQ ID NO: 66 и 67. После лигирования фрагмента из 309 пар оснований СН1 человека непосредственно после сигнальной последовательности пептида IgGK модифицированную плазмиду (SEQ ID NO: 68) назвали pYD15. Если выбранный вариабельный участок тяжелой цепи лигирован в вектор, то полученная плазмида кодирует полную тяжелую цепь иммуноглобулина IgG1 с константными участками человека. Основываясь на последовательностях, раскрытых в табл. 2, были разработаны праймеры ПЦР, специфичные для вариабельного участка тяжелой цепи антител 3D3, 3G10, 3C4 и 3A4 (SEQ ID NOS: 17, 21, 25 и 45 соответственно), которые включали на своем 5'-конце последовательность, идентичную последним 20 парам оснований сигнального пептида IgGK. Последовательности этих праймеров показаны в SEQ ID NOS: 69 (3D3 и 3G10 имеют одинаковую последовательность 5'-конца), SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 215 для 3A4. Один и тот же обратный праймер использовали для амплификации всей трех вариабельных участков тяжелых цепей 3D3, 3C4 и 3G10, поскольку с самого края 3'-концы были идентичными. Праймер (SEQ ID NO: 71) включал на своем 3'-конце последовательность, идентичную первым 20 парам оснований константного домена СН1 человека. Для вариабельного участка тяжелой цепи 3A4 использовали SEQ ID NO: 216. Как на ПЦР-фрагменты, так и на расщепленную pYD15, воздействовали 3'-5' эхонуклеазной активностью ДНК-полимеразы T4, что в результате дало комплементарные концы, которые соединяли путем гибридизации. Полученные в результате реакции гибридизации продукты трансформировали в компетентные *E. coli*, и экспрессирующие плазмиды проверили путем секвенирования для того, чтобы убедиться, что вариабельные участки тяжелой цепи мыши правильно вставлены в вектор экспрессии pYD15. Специалисты в данной области техники легко поймут, что способ, используемый для конструирования плазмиды экспрессии тяжелой цепи, применим к антителам к KAAG1, содержащимся в исходной библиотеке Fab.

Экспрессия химерного IgG1 человека в клетках 293E.

Полученные, как описано выше, векторы экспрессии, которые кодировали легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, экспрессировали в клетках 293E с помощью системы для временной трансфекции (Durocher et al., 2002). Можно использовать другие способы временной или стабильной экспрессии. Соотношение легкой к тяжелой цепи оптимизировали с тем, чтобы достигнуть наибольшего выхода антитела в среде для тканевой культуры и, как оказалось, оно составило 9:1 (L:H). Способность антител (моноклональных, химерных или гуманизированных) к KAAG1 связываться с рекомбинантной Fc-KAAG1 измеряли с помощью ELISA и сравнивали с исходными Fabs мыши.

Схема, использованная для превращения других Fabs в полный IgG (включая 3A4) и для экспрессии антител, описана более детально в международной публикации № PCT/CA2012/000296, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Пример 2. Гуманизация мышного моноклонального антитела 3A4.

Международные патенты №№ PCT/CA2009/001586, PCT/CA2010/001795 и PCT/CA2012/000296 описывают иллюстративную методологию, применяемую для создания гуманизированных вариабельных участков легкой цепи и тяжелой цепи.

Гуманизация вариабельного участка легкой цепи антитела 3A4 включала 11 мутаций в его предложенном гуманизированном каркасе для 100% гуманизации каркаса. Гуманизация вариабельного участка тяжелой цепи антитела 3A4 включала 23 мутаций в его предложенном гуманизированном каркасе для 100% гуманизации каркаса. Эти на 100% гуманизированные последовательности вариабельного участка обозначены Lvhl и Hvhl соответственно (SEQ ID NO: 189 и 194). Также были сконструированы дополнительные гуманизированные последовательности, в которых несколько остатков из мышных последовательностей 3A4 сохранили исходя из тщательного структурного и сравнительного анализов последовательностей, которые показали высокую вероятность изменения антиген-связывающей аффинности в случае введения мутаций в эти положения. Эти последовательности вариабельных участков обозначены Lvhl2, Hvhl2, Hvhl3 и Hvhl4 (SEQ ID NO: 190, 195, 196 и 197).

Два варианта гуманизированных легких цепей (включающие константный участок) в данном документе определены как Lh1 (SEQ ID NO: 199) и Lh2 (SEQ ID NO: 200). Четыре варианта гуманизированных тяжелых цепей (включающие константный участок) в данном документе определены как Hh1 (SEQ ID NO: 202), Hh2 (SEQ ID NO: 203), Hh3 (SEQ ID NO: 204) и Hh4 (SEQ ID NO: 205). Две гуманизированные легкие цепи и 4 гуманизированные тяжелые цепи можно собрать в 8 гуманизированных антител (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3 и Lh2Hh4).

В случае гуманизированной последовательности Lvhl2 (SEQ ID NO: 190) легкой цепи 3A4 сохранялись каркасные остатки Val-L2 и Lys-L45 из мышной последовательности, поскольку остаток L2 наполовину погружен, контактирует как с CDR-L1, так и с CDR-L3, и имеет предрасположенность к контакту с антигеном, в то время как остаток L45 взаимодействует с тяжелой цепью. Отмечали, что оба этих мышных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Hvhl2 (SEQ ID NO: 195) тяжелой цепи 3A4 сохранялись каркасные остатки Ile-H2 и Lys-L73 из

мышиной последовательности, поскольку остаток H2 наполовину погружен, контактирует как с CDR-H1, так и с CDR-H3 и имеет предрасположенность к контакту с антигеном, в то время как остаток H73 принадлежит к верньерной зоне, поддерживающей CDR-H2, и оба этих мышиных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Hvh3 (SEQ ID NO: 196) тяжелой цепи 3A4 сохранялись возвратные мутации Ile-H2 и Lys-L73, и помимо них сохранялись каркасные остатки Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 и Val-H71 из мышиной последовательности, поскольку все эти дополнительные мышиные остатки являются погруженными остатками и входят в верньерную зону, поддерживающую CDR-H2, и, кроме того, мышиный остаток H71 может встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Hvh4 (SEQ ID NO: 197) тяжелой цепи 3A4 включили все 6 возвратных мутаций гуманизированного варианта Hvh3 плюс два дополнительных мышиных каркасных остатка Lys-H38 и Lys-H66, поскольку они являются наполовину погруженными остатками, близкими к CDR-H2.

Получаемые в результате аминокислотные последовательности мышиных и гуманизированных цепей приведены в табл. 1. Выравнивание вариабельных участков мышиных и гуманизированных легких цепей показано на фиг. 1а, а выравнивание вариабельных участков мышиных и гуманизированных тяжелых цепей показано на фиг. 1б.

На фиг. 2а и 2б представлено выравнивание вариабельного участка мышиной легкой цепи с вариабельным участком на 100% гуманизированной легкой цепи и вариабельного участка мышиной тяжелой цепи с вариабельным участком на 100% гуманизированной тяжелой цепи соответственно. Этот чертеж иллюстрирует аминокислоты, которые являются консервативными, и аминокислоты, которые были выбраны для замены.

Пример 3. Сборка и экспрессия гуманизированных вариантов антител 3A4.

Цель данных исследований заключается в определении кинетических параметров антител к кластерину. В частности, для определения того, влияет ли гуманизация моноклонального антитела 3A4 к KAAG1 на кинетические параметры его связывания с KAAG1 человека. С этой целью разработали способ кинетического анализа с помощью прибора ProteOn XPR3 6 от BioRad. KAAG1 человека иммобилизировали на сенсорном чипе. Вводили полноразмерные антитела или Fab-фрагменты и позволяли им взаимодействовать с иммобилизованным KAAG1.

Построение плазмиды, кодирующую химерные (мышиные) тяжелую и легкую цепи 3A4.

Тяжелую и легкую цепи химерного антитела амплифицировали с помощью ПЦР с исходными цепями иммуноглобулина мыши с применением следующих олигонуклеотидных праймерных пар: тяжелая цепь, 5'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 206, и 3'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 207; легкая цепь, 5'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 208, и 3'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 209. Полученные ПЦР-продукты расщепляли с помощью Hind III и клонировали в рK-CR5 (SEQ ID NO: 210), предварительно расщепленную с помощью Hind III.

Построение плазмид, кодирующих варианты 1-4 гуманизированной тяжелой цепи 3A4.

Фрагменты, кодирующие гуманизированный участок тяжелой цепи антитела 3A4 (Hh1, Hh2, Hh3 и Hh4), заказали у GenScript (Пискатави, США). ДНК-фрагменты, включающие последовательности "козак" и стоп-кодонов, расщепили с помощью HindIII и клонировали в сайт HindIII плазмиды рK-CR5, предварительно дефосфорилированной при помощи фосфатазы из кишечника коровы (NEB) для предупреждения рециркуляризации. На фиг. 3а изображена карта плазмиды рK-CR5-3A4-HC-variant1. Все варианты тяжелой цепи гуманизированного 3A4 построили аналогичным образом.

Построение плазмид, кодирующих варианты 1 и 2 гуманизированной легкой цепи 3A4.

Фрагменты, кодирующие участки легкой цепи человека антитела 3A4 (Lh1 и Lh2), заказали у GenScript. ДНК-фрагменты, включающие последовательности "козак" и стоп-кодонов, расщепили с помощью BamHI и клонировали в сайт BamHI плазмиды рMPG-CR5 (SEQ ID NO: 211), предварительно дефосфорилированной при помощи фосфатазы из кишечника коровы (NEB) для предупреждения рециркуляризации. На фиг. 3б изображена карта плазмиды рMPG-CR5-3A4-LC-variant1. Все варианты тяжелой цепи гуманизированного 3A4 построили аналогичным образом.

Исследование временной трансфекции.

Плазмидную ДНК выделили из небольших культур *E. coli* с применением набора Mini-Prep (Qiagen Inc, Миссисога, Онтарио) согласно рекомендациям производителя. Вкратце, 2 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампциллина, засеяли одной колонией, отобранный после лигирования и трансформации. Культуры инкубировали при 37°C в течение ночи с интенсивным помешиванием (250 об/мин). Затем плазмиду выделили из 1,5 мл культуры, используя инструкции, буферы и колонки, поставляемые в наборе. ДНК элюировали с помощью 50 мкл стерильной воды. Плазмидную ДНК выделили из большой культуры *E. coli* с применением набора Plasmid Plus Maxi (Qiagen Inc, Миссисога, Онтарио) согласно рекомендациям производителя. 200 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампциллина, засеяли одной свежей колонией *E. coli* и инкубировали в течение ночи при 37°C с интенсивным помешиванием (250 об/мин). Бактерии (130 мл культуры для тяжелой цепи и 180 мл культуры для легкой цепи) осаждали центрифугированием при 6000×g в течение 15 мин при 4°C и выделяли плазмиду, используя инструкции, буферы и колонки, поставляемые в наборе. Чистые плазмиды повторно супенсировали в стерильном 50

мМ Tris, pH 8 и проводили количественную оценку по измерениям оптической плотности при 260 нм. Перед трансфекцией очищенную плазмиду простилизовали экстракцией с фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом. Плазмиды повторно суспендировали в стерильном 50 мМ Tris, pH 8, и проводили количественную оценку по оптической плотности при 260 нм.

Перед трансфекцией клетки (CHO-сTA) промывали, используя PBS, и повторно суспендировали при концентрации $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в среде для роста (CD-CHO, Invitrogen) без сульфата декстрана в течение 3 ч в супензионной культуре. Для каждой комбинации плазмид 45 мл клеток трансфицировали путем медленного добавления 5 мл среды CDCHO, дополненной 10 мкг/мл каждой плазмиды и 50 мкг/мл полизтиленимина (PEI Max; Polysciences). Конечная концентрация составила 1 мкг/мл каждой плазмиды и 5 мкг/мл PEI. Через 2 ч клетки переносили при 30°C. В последующие дни к клеткам добавляли 50 мкг/мл сульфата декстрана и 3,75 мл каждой добавки (Efficient Feed A и B, Invitrogen) и инкубировали их при 30°C в течение 13 дней. 2,5 мл Feed A и 2,5 мл Feed B добавили на 4, 6, 8 и 11 дни. На 13-й день надосадочную жидкость очищали путем центрифугирования и фильтровали через 0,22-мкм фильтр.

Клетки CHO (CHOcTA) трансфицировали плазмидами, кодирующими различные варианты гуманизированных тяжелых и легких цепей антитела 3A4, под управлением промотора CR5. Трансфекцию осуществляли различными комбинациями легкой и тяжелой цепей. В качестве контроля клетки также трансфицировали плазмидами, кодирующими химерное/мышиное антитело.

Очистка антитела.

15 мл надосадочной жидкости из образцов трансфицированных клеток CHO концентрировали центрифугированием с применением кассеты Amicon Ultra (UltaCell-50k) при 1500 об/мин. Сконцентрированное антитело (550 мкл) очищали, используя набор Nab spin kit Protein A Plus (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя. Очищенные антитела затем обессолили, используя PBS и кассеты для концентрирования Amicon Ultra (UltaCell-10K) при 2500 об/мин до конечного объема 250 мкл. Очищенное антитело количественно оценили путем считываия OD₂₈₀ с помощью спектрофотометра Nanodrop и хранили замороженным при -20°C. Аликвоту очищенного антитела повторно суспендировали в равном объеме Laemmli 2X, нагревали при 95°C в течение 5 мин и охлаждали на льду. Стандартную кричую строили с помощью известного количества очищенной каппа IgG1 человека из плазмы с миеломой человека (Athens Research). Образцы разделяли на полиакриламидном геле Novex с 10% Tris-глицин (Invitrogen Canada Inc., Берлингтон, Онтарио) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-N (Amersham Bioscience Corp., Бэ-д'Юрфе, Квебек) на 1 ч при силе тока 275 мА. Мембрану блокировали в течение 1 ч в 0,15% Tween 20, 5% обезжиренного молока в PBS и инкубировали в течение 1 ч с антителом козы к IgG человека (H+L), коньюгированным с Cy5 (Jackson, Кат. № 109-176-099). Проявляли сигнал и определяли количество путем сканирования при помощи сканера Typhoon Trio+ (GE Healthcare). Как показано на фиг. 4, все комбинации вариантов гуманизированного антитела 3A4 экспрессировались в клетках CHO.

Пример 4. Кинетический анализ мышиного и гуманизированного антитела 3A4.

Приобретенные материалы.

GLM сенсорные чипы, набор для связывания аминоконца Biorad ProteOn (EDC, sNHS и этаноламин) и буферы с 10 мМ ацетатом натрия приобрели у Bio-Rad Laboratories (Миссиссога, Онтарио). Буфер HEPES, EDTA и NaCl приобретены у Sigma-Aldrich (Оаквиль, Онтарио). 10-процентный раствор Tween 20 приобретен у Teknova (Холлистер, Калифорния). Антитело козы, специфическое к Fc-фрагменту IgG человека, приобретено у Jackson ImmunoResearch. Колонку для гель-фильтрации Superdex 75 10/300 GL приобретена у GE Healthcare.

Гель-фильтрация.

Белок KAAG1 в концентрации 3,114 мг/мл и объемом 220 мкл ввели в колонку Superdex G75. Разделение проводили при 0,4 мл/мин в подвижном буфере HBST (см. ниже) без Tween 20. Объем собранной фракции составил 500 мкл. Концентрацию KAAG1 в каждой фракции определяли по ОП₂₈₀ с помощью коэффициента удлинения 5500 и MB, равного 8969. На фиг. 5 представлен профиль гель-фильтрации KAAG1. Небольшой пик возможного агрегата представляет собой элюат на уровне около 11 мл. Элюат белка на уровне 13 мл использовали в качестве анализируемого вещества для анализа ППР (фракции 15-19).

Биосенсорные анализы ППР.

Все анализы с применением поверхностного плазмонного резонанса осуществляли с помощью прибора BioRad ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories Ltd. (Миссиссога, Онтарио) с подвижным буфером HBST (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3,4 мМ EDTA и 0,05% Tween 20, pH 7,4) при температуре 25°C. Поверхность для захвата мышиного Fc-участка создали при помощи сенсорного чипа GLM, активированного посредством 1:5 разведения стандартных растворов BioRad sNHS/EDC, вводимых в течение 300 с при 30 мкл/мин в направлении подачи анализируемого вещества (горизонтальное). Сразу после активации, в направлении подачи анализируемого вещества вводили 13 мкг/мл раствор антитела, специфичного к Fc-фрагменту IgG человека в 10 мМ NaOAc, pH 4,5, со скоростью потока 25 мкл/мин до тех пор, пока не иммобилизировалось примерно 8000 резонансных единиц (RU). Оставшиеся активные группы заблокировали посредством 300 с введения 1 М этаноламина со скоростью 30 мкл/мин в направлении подачи

анализируемого вещества, и это также обеспечивает создание ложно активированных промежуточных сигналов для холостых проб. Скрининг вариантов 3A4 на связывание с KAAG1 проходил в два этапа, непрямой захват вариантов 3A4 из клеточного супернатанта на поверхность, специфическую к Fc-фрагменту IgG человека, в направлении подачи лиганда (вертикальное) с последующим введением KAAG1 в направлении подачи анализируемого вещества. Сначала, для стабилизации фонового уровня использовали одно введение буфера в течение 30 с со скоростью 100 мкл/мин в направлении подачи лиганда. Для каждого захвата 3A4 неочищенные варианты 3A4 в среде для культивирования клеток разбавляли до 4% в HBST или использовали примерно 1,25 мкг/мл очищенного 3A4 в HBST. Четыре-пять вариантов 3A4 вместе с 3A4 дикого типа одновременно ввели в отдельные каналы для лигандов за 240 с при потоке 25 мкл/мин. Это привело к насыщающему захвату 3A4 примерно 400-700 RU на поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека. Первый канал для лиганда, при необходимости, оставляли пустым в качестве холостого контроля. Сразу после этапа захвата 3A4 дважды вводили буфер в направлении подачи анализируемого вещества для стабилизации фонового уровня, а затем ввели очищенный при помощи гель-фильтрации KAAG1. Для типичного скрининга в отдельные каналы для анализируемого вещества одновременно вводили пять концентраций KAAG1 (8, 2,66, 0,89, 0,29 и 0,098 нМ) и буферный контроль со скоростью 50 мкл/мин в течение 120 с с фазой диссоциации, равной 600 с, что дало набор сенсограмм связывания с буферным эталоном для каждого из захваченных вариантов 3A4. Комплексы поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека, и 3A4 восстанавливали в импульсном режиме, продолжительностью 18 с, подачей 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при 100 мкл/мин для подготовки поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека, для следующего цикла впрыска. Сенсограммы выравнивали и сопоставляли с двумя эталонами с помощью введения буферной холостой пробы и промежуточных сигналов, и полученные сенсограммы проанализировали с помощью программного обеспечения ProteOn Manager, версии 3.0. Кинетические значения и значения аффинности определяли путем приближения упомянутых сенсограмм к модели связывания Langmuir 1:1 с применением локального R_{max} , а константы аффинности (K_D М) вывели из получаемых констант скорости (k_d s^{-1} / k_a М $^{-1}$ s^{-1}).

Определение констант скорости и аффинности.

На фиг. 6 подытожены константы скорости ассоциации (k_a , 1/М.с) и диссоциации (k_d , 1/с), а также константы аффинности (K_D , М) для взаимодействия KAAG1 с очищенным мышевым 3A4, мышевым 3A4, которое временно экспрессировалось в качестве химерного, и временно экспрессируемыми гуманизированными вариантами. Эти константы графически представлены на фиг. 7а-с. Константы скорости ассоциации очень сходны с чистыми исходными, химерными и гуманизированными вариантами 3A4 (фиг. 7а). Константы скорости диссоциации сходны с временно экспрессируемыми химерами при сравнении с исходными 3A4, что указывает на то, что процедура трансфекции не изменила параметры взаимодействия KAAG1 с антителом (фиг. 7б). Тем не менее, все гуманизированные варианты похоже имели слегка измененную скорость диссоциации, т.е. более высокую скорость диссоциации (фиг. 7б). Это отражено в константах аффинности (фиг. 7с). Таким образом, существует линейная корреляция между аффинностью связывания ($\log K_D$) гуманизированного варианта и количеством возвратных мутаций, осуществленных в исходном антителе (LcHc), с понижением аффинности связывания по мере увеличения количества мутаций. Однако разница в аффинности связывания отличается лишь в 4 раза между наихудшим вариантом (H1L1, 0,47 нМ), у которого не было сохраненных мышевых остатков, и наилучшим вариантом, у которого было 10 сохраненных мышевых остатков (H4L2, 0,1 нМ). Наконец, было обнаружено, что аффинность связывания у всех вариантов с KAAG1 является субнаномолярной, а наилучший вариант (H4L2, 0,1 нМ) демонстрировал аффинность приблизительно в 6 раз слабее, чем мышевое антитело (LcHc, 0,057 нМ). В целом, данные результаты указывают на то, что гуманизация была успешной, поскольку все варианты проявляли высокую аффинность к KAAG1.

Пример 5. Связывание гуманизированных вариантов 3A4 с KAAG1 в ELISA.

Также применяли способы ELISA для сравнения связывающей активности гуманизированных вариантов 3A4 с мышевым антителом 3A4. Рекомбинантный KAAG1 человека для нанесения покрытия вносили в 96-луночные планшеты на ночь, промывали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) с повышающимися количествами мышевых или гуманизированных вариантов 3A4. После другого цикла промывки в лунки добавили антителу к антителу человека, коньюгированному с HRP, и калориметрически измерили связанное антитело 3A4 при Abs_{450} . Как показано на фиг. 8а, гуманизированные варианты (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3 и Lh1Hh4) проявляли очень сходное связывание с KAAG1 при сравнении с мышевым 3A4 (LcHc), у которого наблюдалась более высокая аффинность, равная 0,016 нМ. Этот результат указывал на то, что все четыре варианта гуманизированной тяжелой цепи были сопоставимы с исходной тяжелой цепью h3A4 при сборке с вариантом L1 гуманизированной легкой цепи. На фиг. 8а показаны результаты, полученные при сборке вариантов тяжелой цепи с вариантом Lh2 гуманизированной легкой цепи 3A4. В этом случае существует различие в связывании вариантов. Например, Lh2h4 был вариантом с наиболее близким профилем к профилю мышевого 3A4. Это согласовывалось с данными ППР, из которых видно, что вариант 4 тяжелой цепи характеризовался наивысшей аффинностью к KAAG1. Взятые вместе, эти данные по связыванию демонстрируют то, что все гуманизированные варианты в данном анализе взаимодействуют с KAAG1 человека. Несмотря на нали-

чие незначительных различий, связывание в ELISA согласовывалось с результатами ППР.

Пример 6. Связывание гуманизированных вариантов 3A4 на поверхности раковых клеток.

Проточную цитометрию применяли для оценки способности гуманизированных вариантов 3A4 взаимодействовать с KAAG1, экспрессируемым на поверхности раковых клеток. Для этого клетки карциномы яичника SKOV-3, которые, как было показано ранее, эффективно связывались 3A4 с помощью проточной цитометрии, инкубировали с восемью гуманизированными вариантами и исходным мышевым антителом. Вкратце, клетки SKOV-3 отделяли от планшета при помощи EDTA и инкубировали на льду с либо 3,0, 0,3 мг/мл, либо 0,3 мг/мл антител в течение 1 ч. После трех этапов промывания клетки инкубировали с вторичным антителом, антителом к IgG человека, коньюгированным с FITC, в течение 1 ч на льду. Флюоресценцию на клеточной поверхности измеряли в проточном цитометре, и значения показаны в гистограмме на фиг. 9. Как показано, все варианты могли обнаруживать KAAG1 на поверхности непермеабилизованных клеток, наиболее сильные сигналы получали при наиболее высокой концентрации антител 3A4 (3 мг/мл), и они понижались по мере понижения концентрации антитела. Среди различных вариантов, варианты с наибольшим количеством обратных мутаций мышевой цепи (фиг. 9, см. Lh1Hh4 и Lh2Hh4) взаимодействовали с KAAG1 на поверхности клеток с наивысшей активностью. Фактически, Lh1Hh4 и Lh2Hh4, по-видимому, демонстрировали слегка улучшенное связывание на клеточной поверхности с KAAG1 по сравнению с мышевым антителом 3A4 (LcHc).

Пример 7. Этот пример описывает применение антител к KAAG1 для обнаружения экспрессии KAAG1 при ТНРМЖ.

В качестве средства определения возможного присутствия антигена KAAG1 в образцах ТНРМЖ проводили иммуногистохимический анализ. Были получены микрочипы тканей, содержащие 139 образцов биопсии РМЖ, взятых у пациентов. Залитые парафином образцы опухолей молочной железы, имеющие эпителиальное происхождение, размещали на покровных стеклах и фиксировали в течение 15 мин при 50°C. Депарафинизацию проводили путем обработки 2x ксиолом с последующим дегидратацией в последовательных промывках по 5 мин в 100, 80 и 70% этаноле. Слайды промывали 3x в PBS в течение 5 мин и обрабатывали раствором для извлечения антигена (1 mM EDTA, pH 8,0), чтобы размаскировать антиген. Эндогенные частицы, реагирующие с пероксидом, удаляли инкубацией стекол с H₂O₂ в метаноле и блокирование выполняли инкубацией стекол с бессывороточным блокирующим раствором (Santa Cruz Biotech) в течение 5 мин при комнатной температуре.

Первичное антитело.

(3A4 к KAAG1) добавляли в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционноспособный по отношению к KAAG1 антиген обнаруживали путем инкубации с биотин-коньюгированным мышевым анти-каппа, а затем - с стрептавидин-HRP третичным антителом. Позитивное окрашивание было выявлено путем обработки стекол субстратом ДАБ-перекись водорода в течение менее 5 мин, а затем контрастировали гематоксилином. Белок KAAG1, как оказалось, экспрессировался на очень высоком уровне в абсолютном большинстве образцов опухолей молочной железы. Характерные чипы, содержащие образцы 139 опухолей, приведены на фиг. 10. В частности, 15/20 образцов биопсии с подтвержденным ТНРМЖ (фиг. 10, образцы указаны звездочкой) имели сильное окрашивание антителом 3A4 благодаря экспрессии KAAG1. Вместе взятые эти иммуногистохимические исследования иллюстрируют применимость обнаружения KAAG1 в РМЖ, в частности ТНРМЖ, с помощью моноклональных антител.

Пример 8.

Этот пример описывает применение антител к KAAG1 для обнаружения экспрессии KAAG1 в клеточных линиях ТНРМЖ.

Объединенные результаты анализа биоинформатики первичной структуры кДНК, кодирующей KAAG1, биохимических исследования и иммуногистохимического определения белка в эпителиальных клетках указывают на то, что антиген KAAG1 находился на клеточной поверхности. Однако требовалось более прямое свидетельство, чтобы продемонстрировать, что KAAG1 действительно экспрессируется на поверхности клеток ТНРМЖ. Для проведения анализа клеточные линии РМЖ получали из коммерческих источников (ATCC, Manassas, VA) и использовали в экспериментах с проточной цитометрией. Анализы экспрессии RT-PCR с использованием специфических праймеров mRNA KAAG1 ранее показали, что определенные клетки РМЖ экспрессировали mRNA KAAG1 (см. PCT/CA2007/001134). Поэтому некоторые из этих клеточных линий были выбраны для определения наличия антигена KAAG1 на их поверхности. Для подтверждения этого исследовали тройные негативные клеточные линии MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20 и BT-549 на предмет поверхностной экспрессии антигена KAAG1, используя антитело 3A4 к KAAG1. Кроме того, клеточные линии РМЖ, которые не являются тройными негативными, а именно, T47D и MCF-7, также были включены в анализ. И наконец, в качестве отрицательного контроля в эксперимент по проточной цитометрии включили контрольную клеточную линию 293-6E, которая демонстрирует неопределяемый уровень экспрессии антигена KAAG1. Для целей анализа методом проточной цитометрии (FCM) клетки собирали, используя 5 mM EDTA, подсчитывали с помощью гемоцитометра и повторно суспендировали в FCM-буфере (0,5% BSA, 10 мкг/мл козьей сыворотки в 1× PBS) с плотностью клеток 2×10^6 клеток/мл. Химерные антитела 3A4 к KAAG1 или контрольные IgG до-

бавляли к 100 мкл клеток до конечной концентрации, равной 0,5 мкг/мл, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Клетки промывали в холодном FCM-буфере для удаления несвязавшихся антител, ресуспендировали в 100 мкл FCM-буфера, содержащего антитело к IgG человека, конъюгированное с вторичным антителом FITC (разведение 1:200) и инкубировали на льду в течение 45 мин. После еще одного этапа промывания в холодном FCM-буфере клетки повторно суспендировали в 300 мкл FCM-буфера и анализировали с помощью проточного цитометра. К каждому образцу добавляли 10 мкг/мл иодида пропида для осуществления отбора мертвых клеток. Результаты трех независимых экспериментов показаны на фиг. 11, где средняя интенсивность флуоресценции (MFI) свернутой индукции представляет собой геометрическое среднее значение сигнала при инкубации клеток с антителом 3A4 от сигнала отрицательного контрольного образца IgG человека, который был произвольно установлен равным 1. Инкубация антител с контрольными клетками 293-6ЕНЕК-293 привела к сигналам флуоресценции, сходным с сигналом, полученным при инкубации клеток в отсутствие первичного антитела. Помимо этого, не наблюдали значительного различия между сигналом, полученным с 3A4, по сравнению с контрольным образцом IgG. Кроме того, при инкубации контрольного образца IgG с клеточными линиями ТНРМЖ сигналы были очень схожими с сигналами, полученными от контрольного образца клеток 293-6Е. В отличие от этого, регистрируемый флуоресцентный сигнал наблюдали при инкубации антитела 3A4 с клеточными линиями ТНРМЖ. Несмотря на различное наблюдаемое количество флуоресценции, наиболее высокое число KAAG1 было обнаружено на поверхности клеточных линий MDA-MB-231 и BT-20 - двух клеточных линий ТНРМЖ (см. фиг. 11, клеточные линии ТНРМЖ обозначены звездочкой). В действительности все пять клеточных линий ТНРМЖ были положительными в отношении экспрессии KAAG1 в этих условиях. Клетки T47 D и MCF-7 также экспрессировали KAAG1. Вместе взятый этот проточный цитометрический анализ показывает, что клеточные линии ТНРМЖ экспрессируют KAAG1 на поверхности своих клеток на высоком уровне.

Пример 9. Способы применения антитела к KAAG1 3A4 в качестве коньюгата антитела.

Как продемонстрировано выше, антиген KAAG1 был обнаружен с помощью 3A4 на поверхности раковых клеток с использованием поточной цитометрии. Существуют несколько различных молекулярных событий, которые могут произойти при связывании антитела с его целью на поверхности клеток. Они включают i) блокирование доступа к другому антигену/рецептору клеточной поверхности или лиганду, ii) образование относительно стабильного комплекса антитело-антigen, позволяющего нацеливаться на клетки с помощью ADCC или CDC, iii) могут происходить сигнальные события, которые проиллюстрированы с помощью агонистических антител, iv) комплекс может быть интерниализирован или v) комплекс может быть сброшен с клеточной поверхности. Для решения данного вопроса мы изучали поведение комплекса KAAG1-антитело 3A4 на поверхности клеток. Клеточную линию карциномы яичников - SKOV3 - использовали в качестве положительного контрольного образца в этом эксперименте, поскольку она была успешно применена в предыдущих экспериментах по интерниализации (см. РСТ/СА2009/001586). Клетки ТНРМЖ MDA-MB-231 помещали в чашки, промывали и инкубировали с 0,5 мкг/мл химерного антитела 3A4, как описано в примере 3. После промывки добавляли полную среду и клетки размещали при 37°C в течение не более 60 мин. Клетки удаляли в определенные моменты времени (см. фиг. 12), быстро охлаждали, подготавливали для проточной цитометрии, используя FITC-коньюгированные человеческие антитела IgG, а результаты выражали как процентную долю средней интенсивности флуоресценции, оставшейся на клеточной поверхности, по сравнению с сигналом в начале отсчета времени 0 мин (см. фиг. 12, сигнал от поверхности (%), оставшийся от сигнала при 0 мин). Как показано на фиг. 12, флуоресцентный сигнал быстро уменьшается при инкубации 3A4 с клетками MDA-MB-231 (фиг. 12, черные столбцы, обозначенные как MDA-MB-231 на чертеже) и предположительно достигает максимальной потери сигнала через 30-45 мин. Потерю сигнала сравнивали с потерей, наблюдавшейся при инкубации 3A4 с клетками SKOV3 (фиг. 12, серые столбцы). Эти результаты показывают, что комплекс 3A4/KAAG1 исчез с клеток, что указывало на то, что могла произойти интерниализации комплекса. Предварительные исследования для выяснения механизма, ответственного за такое снижение флуоресценции клеточной поверхности, показали, что, судя по всему, комплекс интерниализировался. Сходные результаты ожидаются для гуманизированных антител 3A4.

Сходные результаты получали в двух дополнительных клеточных линиях ТНРМЖ, а именно MDA-MB-436 (фиг. 13) и BT-20 (фиг. 14), что подтверждает интерниализацию комплекса 3A4/KAAG1 на поверхности множества клеточных линий ТНРМЖ. В отличие от этого, несмотря на сходные уровни MFI от связывания 3A4 на поверхности MDA-MB-436 и T47D (фиг. 11), потеря сигнала от клеточной поверхности не наблюдалась при инкубации 3A4 с клеточной линией T47D. Это открытие позволяет предположить, что интерниализация комплекса 3A4/KAAG1 может происходить до значительно большей степени в клетках ТНРМЖ (фиг. 15) по сравнению с клетками, которые не являются тройными негативными.

Эти результаты дополнительно подтвердили путем проведения иммунофлюоресценции на живых клетках для того, чтобы узнать можно ли наблюдать такую интерниализацию с помощью микроскопии. Клетки MDA-MB-231 высевали на покровные стекла, и после того, как клетки надлежащим образом закрепились, добавили свежую среду, содержащую химерное антитело к KAAG1 3A4 в количестве 10 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Клетки промывали в PBS, затем фиксировали в 4% пара-

формальдегиде (в PBS) в течение 20 мин. После промывания клетки пермеабилизировали при помощи 0,1% Triton X-100 в PBS в течение 5 мин. Блокировку осуществляли с помощью 1,5% сухого молока в PBS в течение 1 ч. Ассоциированный с лизосомами мембранный белок 1, (LAMP1, Chang et al., 2002) обнаруживали путем инкубации с антителом к LAMP1 (Santa Cruz, sc-18821, разведение 1:100) в 1,5% молоке в PBS в течение 2 ч. После промывания в PBS добавляли все вместе вторичные антитела в 1,5% молока и инкубировали в течение 1 ч. Для химерных антител к KAAG1 вторичным антителом было антитело осла к IgG (H+L) человека, конъюгированное с родамином Red-X, разведение 1:300. Для антитела к LAMP1 вторичным антителом было антитело козы к IgG (H+L) мыши, конъюгированное с DyLight488, разведение 1:300. Оба вторичных антитела получали от Jackson ImmunoResearch. Покровные стекла промывали в PBS и погружали в препятствующий обесцвечиванию реактив ProLong Gold с DAPI. Как видно на фиг. 7, спустя 4 ч инкубации при 37°C в присутствии раковых клеток MDA-MB-231 антитело 3A4 можно было обнаружить в комплексах в основном вблизи окколоядерной области (стрелки, см. красное окрашивание в левой части фиг. 16), что представляет собой типичные пути эндосомально-лизосомальной интернализации. Это наблюдение дополнительно подтверждалось при визуализации лизосомального маркера LAMP1, при этом оказалось, что он тоже экспрессировался в данных областях (стрелки, см. зеленое окрашивание в средней части фиг. 16). Важно то, что объединение двух изображений привело к появлению желто-оранжевых структур, указывающих на то, что 3A4 и антитела к LAMP1 присутствовали в одних и тех же структурах (стрелки, см. желтое окрашивание в правой части фиг. 16). Совместная локализация 3A4, которое связывается с KAAG1 на поверхности раковых клеток, с LAMP1 - маркером поздних эндосом/лизосом, демонстрирует, что комплекс антитело/антитело интернализировался, и что он проходит по пути, пригодному для высвобождения полезного груза, который может быть присоединен к антителу 3A4. Идентичные результаты наблюдали в другой клеточной линии ТНРМЖ - BT-20 (см. фиг. 17).

Вместе взятые, эти исследования продемонстрировали, что антитела, специфичные к KAAG1, такие как 3A4, можно применять в качестве коньюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Таким образом, высокий уровень специфичности к ТНРМЖ у KAAG1 в сочетании с возможностью интернализации данной цели в клетки способствует разработке применений в качестве ADC.

Пример 10.

С целью продемонстрировать эффективность антител к KAAG1 в нахождении и уничтожении клеток, у которых отсутствует экспрессия белка ER, экспрессия белка PgR и/или которые демонстрируют отсутствие повышенной экспрессии белка HER2, мы произвели два коньюгата антитело-лекарство (ADCs): 3A4-ADC1 и 3A4-ADC2.

Для этого мы использовали химерное антитело 3A4 и присоединили цитотоксическое средство посредством высоко стабильного пептидного линкера, который селективно расщепляется лизосомальными ферментами после интернализации (3A4-ADC1), или конъюгировали с другим антимитотическим средством посредством нерасщепляемого линкера (3A4-ADC2). Цитотоксическое средство может становиться активным после интернализации в клетки.

Способность 3A4 ADCs к обнаружению KAAG1 на поверхности клеток ТНРМЖ определяли, используя проточную цитометрию с применением способов, описанных в данном документе. Вкратце, не-коньюгированные 3A4, 3A4-ADC1, 3A4-ADC2 и контрольный образец IgG инкубировали в присутствии клеток ТНРМЖ MDA-231, которые являются KAAG1-позитивными. Результаты указывают на то, что присоединение к 3A4 любого из этих двух средств не оказывает отрицательного влияния на его связывание с клетками тройного негативного рака молочной железы, такими как MDA-231 (данные не показаны).

Получив подтверждение того, что ADC на основе 3A4 может связываться с KAAG1, экспрессированным на поверхности клеток ТНРМЖ, их цитотоксичность, направленную на эти клетки, оценивали путем анализа пролиферации клеток. Клетки MDA-231 или TOV-112D культивировали, как описано выше в предыдущих примерах. Клетки засевали с плотностью 3000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты в 200 мкл среды в каждой лунке в течение ночи при 37°C, в 5% CO₂. На следующий день среду заменяли на свежую, содержащую антитела, в концентрации, изменяющейся от 0,122 до 500 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Все условия выполняли в трех экземплярах лунок. Число выживших клеток определяли с помощью анализа клеточной пролиферации, используя CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI), следуя инструкции от производителя. После сбора первичных данных результаты выражали в виде процентной доли выживаний по сравнению с числом клеток в лунках, обработанных с использованием PBS, которое принимали за 100%. Результаты указывают на то, что неконьюгированное 3A4 не оказывало влияние на распространение клеток MDA-231 при всех исследованных концентрациях. В отличие от этого исследованные ADCs антитела 3A4 показали значительную цитотоксичность.

Эти результаты указывают на то, что коньюгаты антитела 3A4 можно применять в качестве альтернативного лечения пациентов, страдающих тройным негативным раком молочной железы или базально-подобным раком молочной железы. Сходные результаты ожидаются для коньюгатов на основе гуманизированных антител 3A4.

Настоящее описание относится к нескольким документам, содержание которых включено в данный

документ во всей своей полноте путем ссылки.

Последовательности, на которые ссылаются в описании.

SEQ ID NO.:1

GAGGGGCATCAATCACACCGAGAAGTCACAGCCCCCAACCACGTGAGGTGTGGGGGGG
 TAGGGATCTGCATTTCTCATATCAACCCCACACTATAGGGCACCTAAATGGGTGGGGGTGG
 GGGAGACCGACTACTTGAGTTCTGAAGGCTCCTGGCTCCAGCCACGTAATTGCCCCCG
 CTCTGGATCTGGCTAGCTCCGGATTGGCAGTCCGGGGGTGAGATGTTCTGACG
 GCCCCAAAGGGTGCCTGAACGCCGCCGGTACCTCCTTCAGGAAGACTTCGAAGCTGGACACC
 TTCTCTCATGGATGACGACGCCGCCCGTAGAAGGGTCCCCGTTGCGGTACACAAGC
 ACGCTCTTCACGACGGCTGAGACAGGGTGGCTGGACCTGGCGTGTGCCGTCATCTCCCC
 GCTGGCCGCCGCCTCAGCTCGCTCGCTGGGAGGCACCTCGCTGTCCCAGCGCCTC
 ACCGCACCCAGGGCGCGGATCGCCTCTGAACAGAAGAAAAGTGA
 AAGAGAAGTAACGGCGTGCCTAGGCCTCAGGGACAGAGGAGACACTAGGGAGCTTGAGGAC
 TCGGAGTAGACGCTCAAGTTTCAACCGTGGCTGCACAGCCAATCAGGACCCGAGTGC
 CACACACCAGGTTCACCTGCTACGGGAGAATCAAGGGAGCAGCTTGAGCAGGAGCCGG
 AACACACACACAAATGGTAAACCCAATTCTTACATCATATCTGTGCTACCCTTCAA
 ACAGCCTA

SEQ ID NO.:2

MDDDAAPRVEGPVAVHKHALHDGLRQVAGPAAAHLPRWPPQLAASRREAPPLSQ
 RPHRTQGAGSPPETNEKLTPQVKEK

SEQ ID NO.:3

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCATAGGACAGAAGGTCA
 CTATGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTAAATAGTAACCTTCAAAAGAAACTTTGGCCT
 GGTACCAAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCTAAACTTCTGATATACTTTGATCCACTCGGAAT
 CTAGTATCCCTGATCGCTCATAGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTTACCATCAGCA
 GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTCTGTGTCAGAACATTATAGCACTCGCTCACGT
 TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTCCGC
 CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCCTGTTGTCGCTGTAATAACTCTATC
 CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGATAACGCCCTCAATCGGTAACTCCAGGAGA
 GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACGCCCTCAGCAGCACCATCAGGCTGAGCA
 AACAGACTACGAGAAAACACAAAGTCTACGCCCTGCAAGTCACCCATCAGGCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:4

DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCSSQSLNSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
 TRESSIPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKAVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTL

TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:5

GAGGTTCACTGCAGCAGCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGCTTCAGTGACGC
 TGTGCTGCAAGGCTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACACTGGTGAAGCAGACTC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCAGCACAGCCTACATGGAAC
 TCAGCAGTTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCCTCAATC
 GCCAAGGGCACCACACTCACAGTCTCCTCAGCCTCAACGAAAGGCCATCTGTCTTCCCCTGG
 CCCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACT
 TCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCC
 CGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCA
 GCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC
 TCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCATGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGGCCAGAAGACCTGAGGTCAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGAGGAGCAGTACA
 ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGTCCTGCACCAGACTGGCTGAATGCCAAG
 AGTACAAGTGCAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAG
 CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACACAGGTGTACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCA
 AGAACCCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCT
 TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCCCGGGAAA

SEQ ID NO.:6

EVQLQQSVAELVRPGASVTLCKASGYIFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNT
 AFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSYWGQGTTLVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVWSNGALTSVHFTPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDSRWWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

SEQ ID NO.:7

GATGTTTGATGACCCAACTCCACGCTCCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCT
 CCATCTCTGTAGATCGAGTCAGGCCTTACATAGTAATGGAAACACCTATTAGAATGGT

ATTTCAGAAACCAGGCCAGCCTCAAAGTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTTCTG
 GGGTCCCGACAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTACACTAAGATCAGCGGAG
 TGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTATTACTGCTTCAGGTCACATGTTCTCACGTTCG
 GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTTCCCAC
 CTGATGAGCAGTGAATCTGAACTGCCTCTGTTGCTGCTGATAACTTCTATCCCA
 GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGTAACTCCCAGGAGGTG
 TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGAGCAAAG
 CAGACTACGAGAACACAAAGTCTACGCCTCGCAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCG
 TCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:8

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIYKVSN
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVAAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKAVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
 LSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:9

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGA
 TATCCTGTAAGGCTCTGGATACACCTTCACTGACAACATGAACTACATGGACTGGGTGAAGCAGAGCC
 ATGAAAGAGCCTTGACTGGATTGGAGATATTAACTCTTACTATGGTACTACTACCTACAACC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCCCGCACGCCTACATGGAGC
 TCCGCGGCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTGATT
 ATTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCATCTGCTTT
 CCCTGGCCCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGCGTGCACA
 CCTTCCCCGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCCTGC
 CCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTGTGAATTCACTCACACATGCCACCGTGCAGCAGC
 CTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGA
 TCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCA
 AGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGATAATGCAAGACAAGCCGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGACCGAGACTGGCTGAATG
 GCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCT
 CCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGC
 TGACCAAGAACCAAGGTACGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCC
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTGGTGT
 CCGACGGCTCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
 ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCGTGGACTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCT

CCCTGTCTCCGGGAAA

SEQ ID NO.:10

EIQLQQSGPELVKGASVKISCKASGYFTDNYMNVVKQSHGKSLEWIGDINPYYGTT
TYNQKFKGKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDDWFYWGQGTLTVSAASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNSGALTSVGHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPKG

SEQ ID NO.:11

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGACTCA
CTATCACTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCTACACTTTAAACTGGTCCAGCAGAAACCAG
GAAAATCTCAAAGACCTGATCTTGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGTCCCACAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCTCACCACAGCAGCCTGGAGTTGAAGATT
TGGGAATTATTCTTGCTACAGTATGATGAGATTCCGCTCACGTTGGCTGGACCAAGC
TGGAGCTGAGAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTCCGCCATGTGATGAGCAGTTGA
AATCTGAACTGCCCTGTTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCAAAGTAC
AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACAGGAAAC
ACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:12

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFAGTKLELRAVAAPSVFI FPPSD
EQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKAD
YEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:13

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTAAACCTTCAGTCACCTTCAC
TCACCTGCACTGCACTGGCTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCAGTGGATCCGGCAGT
TTCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGCTACATAACTACGATGGTACAATGACTACAACC
CATCTCTAAAAGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAAGCAGTTCTCCTGCAGT
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGTTAT
TTGCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGAGCCTCAACGAAGGGCCATCTG
TCTTTCCCTGGCCCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGGCCATGGCTGCCTGG
TCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCG

TGCACACCTCCCGCTGCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCG
 TGCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAAGTGAATCAAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGGCTGGAGGTGACATAATGCAAAGACAAAGCCGCGG
 AGGAGCAGTACACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACCAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGG
 ATGAGCTGACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACA
 TCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCCCTCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCTGAGGCTCTGCACAAACCACTACACGAGAAGA
 GCCTCTCCCTGCTCCGGAAA

SEQ ID NO.:14

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHN
 DYNPSLKSRSITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQTLVTVAASSTK
 GPSVFP LAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:15

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGGCTGTGCAATAGGACAGAAGGTCA
 CTATGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTAAATAGTAACCTTCAAAGAACTTTTGGCCT
 GGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCTAAACTCTGATATACTTGCATCCACTCGGAAT
 CTAGTATCCCTGATCGCTCATAGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTTACCATCAGCA
 GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTCTGTGCAGAACATTAGCACTCCGCTCACGT
 TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO.:16

DIVMTQSPSSLAWSIGQKVTMNCKSSQSLNSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
 TRESSIPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.:17

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGCTTCAGTGACGC
 TGTCCCTGCAAGGCTTCGGCTACATATTTACTGACTATGAGATAACTGGGTGAAGCAGACTC

CTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCTCAATC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCAGCACAGCCTACATGGAAC
 TCAGCAGTTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTATTCTGATTATTGGG
 GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 SEQ ID NO.:18
 EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCASKASGYIFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNT
 AFNQKFKGKATLTADISSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGSDYWGQGTLTVSS
 SEQ ID NO.:19
 GATGTTTGATGACCCAACTCCACCGCTCCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCT
 CCATCTCTGTAGATCGAGTCAGGCCTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT
 ATTGAGAAACCCAGGAGCCTCAAAGGTCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTCTG
 GGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTACACTCAAGATCAGCGGAG
 TGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTAACTGCTTCAGGTTCACATGTTCTCACGTTCG
 GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
 SEQ ID NO.:20
 DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIYKVSN
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVVEADLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.:21
 GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGA
 TATCCTGTAAGGCTCTGGATACACCTTCACTGACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCC
 ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCCCGCACAGCCTACATGGAGC
 TCCCGGGCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTGATT
 ATTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTGCA
 SEQ ID NO.:22
 EIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTDNYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPYGTT
 TYNQKFKGKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDDWFYWGQGTLTVSA
 SEQ ID NO.:23
 GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGTC
 CTATCACTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCTACAACTTTAACTGGTCCAGCAGAAACAG
 GAAAATCTCAAAGACCTGATCTTCTGCAAACAGATGGTAGATGGGTCCATCAAGGT
 TCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCTCTCACCACAGCAGCCTGGAGTTGAAGATT
 TGGGAATTATTCTTGTCTACAGTATGAGATTCCGCTCACGTTGGCTGGACCAAGC
 TGGAGCTGAGA
 SEQ ID NO.:24
 DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFOQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGV

PSRFSGSGSGQDYSLTISLLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELR
SEQ ID NO.:25
GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTAAACCTTCAGTCAC
TCACCTGCACTGTCACTGGCTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCAGT
TTCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGCTACATAAACTACGATGGTACAATGACTACA
CATCTCTAAAAGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACAGTTCTCCTGCAGT
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGTTAT
TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
SEQ ID NO.:26
EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGHWHIRQFPGNKLEWMGYINYDGHN
DYNPSLKSRSITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTLTVSA
SEQ ID NO.:27
KSSQSLLNSNFQKNFLA
SEQ ID NO.:28
FASTRES
SEQ ID NO.:29
QQHYSTPLT
SEQ ID NO.:30
GYIFTDYEIH
SEQ ID NO.:31
VIDPETGNTA
SEQ ID NO.:32
MGYSDY
SEQ ID NO.:33
RSSQSLLHSNGNTYLE
SEQ ID NO.:34
KVSNRFS
SEQ ID NO.:35
FQGSHVPLT
SEQ ID NO.:36
GYTFTDNYMN
SEQ ID NO.:37
DINPYYGTTT
SEQ ID NO.:38
ARDDWFDY
SEQ ID NO.:39

KASQDIHNFLN
SEQ ID NO.:40
RANRLVD
SEQ ID NO.:41
LQYDEIPLT
SEQ ID NO.:42
GFSITSGYGH
SEQ ID NO.:43
YINYDGHND
SEQ ID NO.:44
ASSYDGLFAY
SEQ ID NO:45 - нуклеотидная последовательность
вариабельного участка тяжелой цепи ЗА4
CAGATCCAGTTGGTCAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGA
TGTCCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACGACTACATGAGCTGGTGAAACAGAGCC
ATGCAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAACTACAACC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGC
TCAACAGCCTGACATCGGAAGACTCAGCAGTCTATTACTGTCAAGAGACCCGGGGCTATGG
ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:46 - полипептидная последовательность
вариабельного участка тяжелой цепи ЗА4
QIQLVQSGPEMVKPGASVCKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKAILTVKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO:47 - нуклеотидная последовательность
вариабельного участка легкой цепи ЗА4
GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGGCTGTCACTTGGAGATCAAGCCT
CCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT
ACCTTCAGAAACAGGCCAGTCTCAAAGCTCTGATCCACACAGTTCCAACCGATTTCCTG
GGTCCCAGACAGATTCACTGAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAG
TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTACTGCTTCAAGGTTCACATGTTCCGTCACGTTCG
GTGCTGGGACCAGGCTGGAGCTGAAA
SEQ ID NO:48 - полипептидная последовательность
вариабельного участка легкой цепи ЗА4
DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK
SEQ ID NO:49 - полипептидная последовательность CDR1

тяжелой цепи 3A4
GYTFTDDYMS
SEQ ID NO:50 - полипептидная последовательность CDR2
тяжелой цепи 3A4
DINPYNGDTNYNQKFKG
SEQ ID NO:51 - полипептидная последовательность CDR3
тяжелой цепи 3A4
DPGAMDY
SEQ ID NO:52 - полипептидная последовательность CDR1
легкой цепи 3A4
RSSQSLLHSNGNTYLE
SEQ ID NO:53 - полипептидная последовательность CDR2
легкой цепи 3A4
TVSNRFS
SEQ ID NO:54 - полипептидная последовательность CDR3
легкой цепи 3A4
FQGSHVPLT
SEQ ID NO.:55
GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
SEQ ID NO.:56
GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCCGTGAAGC
SEQ ID NO.:57
GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGGTGTGCCTGCTGAATAACTCTATCCCGAGAGGCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG
ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGTAG
SEQ ID NO.:58
AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO.:59
CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGG
TGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAAGTTCCAAAACGA
GGAGGATTGATATTCACCTGCCCGATCTGGCCATACACTGAGTGACAATGACATCCACTT
TGCCTTCTCTCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAAGTTAACGGATCTAGCGAATTCA

TGAACTTCTGCTGCTGGGTGCATTGGAGCCTGCCTGCTACCTCCACCATGCCA
 ATGGTCCCAAGGCTTGAGACGGAGCTTACAGCGCTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTCC
 CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACACTGCCTCTGTTGTCGCTGCTGAATAACCTCT
 ATCCCAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGG
 AGAGTGTACAGAGCAGCACCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCACCCCTGACCGTGA
 GCAAAGCAGACTACAGAGAAACACAAAGTACAGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCT
 CGCCCGTACAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAGGGTACCGCGCCGCTTCGAATGAGA
 TCCCCCGACCTCGACCTCTGGTAATAAAGGAAATTATTTCATTGCAATAGTGTGGAA
 TTTTTGTGTCCTCACTCGGAAGGACATATGGGGGCAAATCATTGGTCGAGATCCCTCG
 GAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGGACGAACAAACCTGACTACGGCATCTGCCCT
 TCTCGCGGGCAGTGCATGTAATCCCTCAGTTGGTGGTACAACCTGCCAACGGCCCTG
 TTCCACATGTGACACGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTGACTGAGTGTGACATCCT
 TATAAAATGGATGTGCACATTGCCAACACTGAGTGGCTTCATCCTGGAGCAGACTTGCAGT
 CTGGACTGCAACACAACTGCCTTATGTGTAACCTGGCTGAAGCTTACACCAATG
 CTGGGGGACATGTACCTCCACGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCA
 GAGGGGCCTGTGAGCTACCGATAAGCGGACCCCTCAAGAGGGATTAGCAATAGTGTAA
 GGCCCCCTGTTAACCTAAACGGTAGCATATGCTCCGGTAGTGTATATACTATCCAG
 ACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGTTA
 GTAAAAGGGCTTAAGGAACACCGATATCTCCACCCATGAGCTGTACGGTTTATTAC
 TGGGGTCAGGATCCACGAGGGTAGTGAACCATTAGTGTACAGGGCAGTGGCTGAAGATCA
 AGGAGCGGGCAGTGAACACTCTCTGAATCTCGCCTGCTTCTTATTCTCGTTAGCTAA
 TAGAATAACTGCTGAGTGTGAACAGTAAGGTATGTGAGGTGCTGAAAACAAGGTTTCA
 GTGACGCCCAAGATAAAATTGGACGGGGTTAGTGGCTATGCTATGACACCAA
 TATAACCTCACAACCCCTGGCAATAAAACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATC
 TTTAACAAATGAAATCCATGGGGGGACAAGCGTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGA
 ATTATGGCTATGGCAACACATAATCCTAGTGCATATGACTGGGTTATTAGATGTGT
 CCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATTGTTACACTCTATTGTAACAAGGGAAAGA
 GAGTGGACGCCGACAGCGGACTCCACTGGTTGTCCTAACACCCCCAAAATTAACGGG
 GCTCCACGCCATGGGCCATAAAACAAAGACAAGTGGCACTCTTTTGAAATTGTGGA
 GTGGGGGACCGCTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGT
 ATAACCTGGCTGATTGTAACCCGCTAACCAACTGGTCAAAACACTGCCAACAAACACT
 AATGGCACCCGGGAATACCTGCATAAGTAGTGGCGGGCAAGATAGGGCGCGATTGCT
 GCGATCTGGAGGACAAATTACACACATTGCGCCTGAGGCCAACAGCAGGGTTGTTGCT
 CATATTACGAGGTGCGCTGAGAGCACGGTGGCTAATGTTGCATGGTAGCATATACTACCC
 AAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTA
 TATCTGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATCTGGTAGTATGCTATCCTAATTATAT

CTGGGTAGCATAGGCTATCTAATCTATCTGGTAGCATATGCTATCTAATCTATCTG
 GGTAGTATATGCTATCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTATCTAATAGAGATTAGGGT
 AGTATATGCTATCTAATTTATCTGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATAT
 GCTATCTAATCTATCTGGTAGCATATGCTATCTAATCTATCTGGTAGCATAGGCT
 ATCTAATCTATCTGGTAGCATAGGCTATCTAATCTATCTGGTAGCATATGCTATCTA
 CTAATTATATCTGGTAGCATAGGCTATCTAATCTATCTGGTAGCATATGCTATCTA
 ATCTATATCTGGTAGTATATGCTATCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTATCTCAG
 ATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACCC
 TTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTCTAGACGTCAGGTGGCATTTCGGGAA
 ATGTGCGCGAACCCATTGGTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
 GACAATAACCTGATAAAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
 TCCGTGCGCCATTGGCTTGCCTCCTGCTACCCAGAAA
 CGCTGGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGTGACAGTGGTTACATGAACTGG
 ATCTCAACAGCGTAAGATCCTGAGAGTTTCGCCCCGAAGAACGTTCCAATGATGAGCA
 CTTTAAAGTCGCTATGTGGCGGTATTATCCGTGTTGACGCCGGCAAGAGCAACTCG
 GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTGGTAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC
 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCAGTGTGATAACACTG
 CGGCCAACATTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTGACAACA
 TGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACG
 ACGAGCGTGACACCACGATGCCCTGAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACATTAACTGGCG
 AACTACTTACTCTAGCTCCCGAACAAATTAAAGACTGGATGGAGGGGATAAAAGTTGAG
 GACCACTCTGCGCTCGGCCCTTCCGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAACTGGAGCCGGTG
 AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAG
 TTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
 GTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTAGATTG
 ATTAAAACCTCATTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGA
 CAAAATCCCTAACGTGAGTTTCGTTCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAGATCAAAG
 GATCTTCTGAGATCCTTTTCTGCGCTAACGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAACTGGCT
 TACAGCGGTGGTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAACTGGCT
 TCAGCAGCGCAGACCAAAACTGCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC
 AGAACTCTGAGCAGCGCTACATACCTCGCTGCTAACCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCA
 GTGGCGATAAGTCGTCTTACGGGTTGGACTCAAGACGAGTATGTTACCGGATAAGGCGCAGC
 GGTCGGGCTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
 TGAGATAACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACA
 GGTATCCGTAAGCGCAGGGTCGGAACAGAGAGCGCAGGGAGCTCCAGGGGAAACG
 CCTGGTATCTTATAGTCCTGCGGTTGCCACCTGACTTGAGCGTCGATTTGTGAT

GCTCGTCAGGGGGCGGAGCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCCTTTACGGTCTGG
 CCTTTGCTGGCTTTGCTCACATGTTTCTCGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACC
 GTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
 CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCTCTCCCGCGCTGGCGA
 TTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCGACTGAAAGCGGGAGTGAGCGAACGCAA
 TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGCTCGTA
 TGTGTGTGAAATTGAGCGATAACAATTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
 CCAAGCTCTAGCTAGAGGTGACCAATTCTCATGTTGACAGCTTACATCGCAGATCCGGC
 AACGTTGTTGCATTGCTGCAGCGCAGAAGCTGGTAGGTATGGCAGATCTACATTGAATCAA
 TATTGGCAATTAGCCATTAGTCATTGGTTATAGCATAATATTGGCTATTGGCA
 TTGCATACGTTGATCTATATCATAATATGTACATTATGGCTATGCTCAATATGACCG
 CCATGTTGACATTGATTAGTACTAGTTAAAGTAATCAATTACGGGTCAATTAGTTCAT
 AGCCCATAATGGAGTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCG
 AACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCAATAGGGACT
 TTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTAACGGTAAACTGCCCACGGCAGTACATCAAGTG
 TATCATATGCCAAGTCCGCCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTAT
 GCCCAGTACATGACCTTACGGACTTCTACTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 ATTACCATGGTGTGCGGTTGGCAGTACACCAATGGCGTGATAGGGTTGACTCACGG
 GGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGAGTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 GACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCGCCCCGTGACGCAATGGCGGTAGGCGTACCG
 TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGTTAGTGAACCGTCAGATCCTACTCTTCCGCATC
 GCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGCTCGCGTTGAGGACAAACTCTCGCGTCTTCCAG
 TACTCTGGATCGGAAACCCGTGGCCTCCGACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGA
 GTCCGCATGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGCGCTAACAGTCACAGTCGAAGG
 TAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGCAGCGGGTGGCGTGGGGTTGTTCTGGCGGAGGTGCT
 GCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO.: 60

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATTGATGACCCAGTCTCC

SEQ ID NO.: 61

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGATGACCCAAACTCC

SEQ ID NO.: 62

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATGTTATGTCAGTCTCC

SEQ ID NO.: 63

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGC

SEQ ID NO.: 64

GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCATCTGCTTCCCTGGCCCC

SEQ ID NO.:65
 GTAAGCGAATTACAAGATTGGGCTCAACTTCTTG
 SEQ ID NO.:66
 GCCTCCACCAAGGGCCATCGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTG
 GGGCACAGCAGCCCTGGCTGGTCAAGACTACTCCCCAACCGGTGACGGTGTCTG
 GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTCCCGTGTCTACAGTCAGGAC
 TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCAGCAGCTGGGACCCAGACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGT
 SEQ ID NO.:67
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSC
 SEQ ID NO.:68
 CTTGAGCCGGCGATGGTCAGGTGAGGTGTGGCAGGTTGAGATCCAGCTGTTGGGG
 TGAGTACTCCCTCTAAAAGCGGGCATTACTTCTGCCTAAGATTGTCAGTTCCAACAGA
 GGAGGATTGATATTCACCTGCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACATGACATCCACTT
 TGCCTTCTCTCACAGGTGCCACTCCAGGTCAAGTTGCGCCACCATGGAGACAGACA
 CACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCAGGTTCACTGGCGAGACGGAGCTTACG
 GGCCCATCTGCTTCTCCCTGCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGGCCCTG
 GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCCCTG
 ACCAGCGCGTGACACCTCCCGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
 GTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
 CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGC
 CCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGACCGTCAGTCTCTCTTCCCCAAACCC
 AAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGACA
 AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCAC
 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
 ATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCTGCC
 CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGAGCTGACCTGCGCTGGTCAAAGGTTCTAT
 CCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCGGAGAACAACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGAAATGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATA
 AAGGAAATTATTTATTGCAATAGTGTGGAAATTTTGTGTCTCACTCGGAAGGAC
 ATATGGGAGGGCAAATCATTGGTCAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCC
 GGACGAACTAACCTGACTACGGCATCTGCCCTCTCGCGGGGAGTGCATGTAATCCC

TTCAGTTGGTTGGTACAACCTGCCAAGTGAACCCCTAAACGGGTAGCATATGCTCCGGTAG
 TAGTATATACTATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAAACGGGAAGCATATG
 CTATCGAATTAGGGTAGTAAAGGGCTAAAGGAACAGCGATGTAGGTGGCGGGCCAAGAT
 AGGGCGCGATTGCTGCATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCCTGAGCGCCAAGCAC
 AGGGTTGTTGGCCTCATATTCAAGGGTCGCTGAGGACAGGTGGCTATGTTGCCATGGG
 TAGCATATACTACCCAAATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATA
 GGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATA
 TATCCTAATTTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATA
 CCTAATCTATATCTGGTAGTATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTATCCT
 AATAGAGATTAGGGTAGTATGCTATCCTAATTTATATCTGGTAGCATATACTACCCAAAT
 ATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATAC
 TGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
 GTAGTATGCTATCCTAATTTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTA
 GCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGTATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCA
 TATGCTATCCTACGATGATAAGCTCAACATGAGAATTAAATTCTGAAGACGAAAGGGCC
 TCGTGATAACGCTATTTTATAGGTAATGTCATGATAATAATGGTTCTAGACGTAGGTG
 GCACCTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAAATA
 TGATCCGCTATGAGACAATAACCTGATAATGCTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
 TGAGTATTCAACATTCGCGTGCCTTATTCCCTTTTGCGGCATTGCGCTTCTGTT
 TTGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGTAGCAGAGTGG
 GTTACATCGAACACTGGATCTCAACCGGTAAAGATCCTGGAGAGTTTCCCGCGAAGAACGTT
 TTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTCGCGGTATTATCCGTGTTGACGCCG
 GGCAAGAGCAACTCGTCGCCCATACACTATTCTCAGAATGACTGGTAGACTCACCAG
 TCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCA
 TGAGTGATAACACTCGGCCAACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG
 CTTTTTGCAACACATGGGATCATGTAACCTGCCTGATGTTGGAACCGGAGCTGAATG
 AAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCAGCAATGGCAACACGTTGCGCA
 AACTATTAACTGGCAACTTACTCTAGCTCCGGCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGG
 CGGATAAAAGTGCAGGACACTCTGCGCTCGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATA
 AATCTGGAGCCGGTGGCGTGGCTCGCGTATCATTGCGACTGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCGATCGTAGTTACACGACGGGACTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC
 AGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTACTCAT
 ATATACTTTAGATTGATTAAACTCATTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT
 TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTCTGCTTCACTGAGCGTCAGACCCCG
 TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAA
 CAAAAAAACCACCGTACCGCGTGGTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTC

CGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCCTCTAGTGTAGCCGTAGT
 TAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
 CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTAC
 CGGATAAGGCAGCGGTGGCTGAACGGGGGGTCGTGACACAGCCCAGCTGGAGCGAA
 CGACCTACACCGAACTGAGATAACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGGCCACGCTCCCGAAG
 GGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTGGACAGGAGAGCGCAGGAGGAGC
 TTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATTTATAGTCCTGCGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
 GTCGATTTTGTGATGTCGTGAGGGGGGGGGCGGACCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCC
 TTTACCGGTTCTGGCTTTGCTGGCCTTGCTCACATGTTCTTCGCTTATCCCCTG
 ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCCGCAGCGAACGA
 CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTATGGCTATGTCATGCAATATGAC
 CGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTC
 ATAGCCCCATATGGAGTCCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCCTGGCTGACCGC
 CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGA
 CTTCCATTGACGTCAATGGGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAG
 TGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCATTGACGTCAATGACGTAAATGGCCGCCTGGCATT
 ATGCCCATACATGACCTTACGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG
 CTATTACCATGGTGTGAGCGGTTTGGCAGTACACCAATGGCGTGGTAGGGTTGACTCAC
 GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTGGCACCACAAATCAAC
 GGGACTTTCAAATGCGTATAACCCGCCCGTGACGCAAATGGCGTAGGCGTGTAC
 GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCCGCA
 TCGCTGTCTGCGAGGGCAGCTGTTGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTCGCGGTTTCC
 AGTACTCTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGC
 GAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAACCTCTCGAGAAAGCGTCAACCAGTCACAGTCGAA
 GGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCAGCGGGTGGCGGTGGGGTTGTTCTGGCGGAGGTG
 CTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGCGGT

SEQ ID NO.:69

GGGTTCCAGGTTCACGGCAGGTTAGCTGCAGCAGTCAGTGT

SEQ ID NO.:70

GGGTTCCAGGTTCACGGCAGGTTAGCTGCAGCAGTCAGG

SEQ ID NO.:71

GGGGCCAGGGAAAGACAGATGGGCCCTCGTTGAGG

SEQ ID NO.: 89: Иллюстративный вариант осуществления CDRL1

K-S-S-Q-S-L-L-N/H-S/T-S/N/D-N/G-Q/N/K-K/L-N-Y-L-A

SEQ ID NO.:90: Иллюстративный вариант осуществления CDRL1

K-A-S-Q-D-I-H-N/T-Y/F-L-N

SEQ ID NO.:91: Иллюстративный вариант осуществления CDRL2

F-A-S-T-R-E-S

SEQ ID NO.: 92: Иллюстративный вариант осуществления CDRL2

L-V-S-K-L-D-S

SEQ ID NO.:93: Иллюстративный вариант осуществления CDRL2

R-A-N-R-L-V-D

SEQ ID NO.:94: Иллюстративный вариант осуществления CDRL3

Q-Q-H-Y-S-T-P-L-T

SEQ ID NO.:95: Иллюстративный вариант осуществления CDRL3

W/L-Q-Y/G-D/T-A/E/H-F-P-R-T

SEQ ID NO.:96: Иллюстративный вариант осуществления CDRH1

1

G-Y-T/I-F-T-D/E-Y-E/N-M/I/V-H

SEQ ID NO.:97: Иллюстративный вариант осуществления CDRH1

G-F-T/S-I-T-S-G-Y-G-W-H

SEQ ID NO.:98: Иллюстративный вариант осуществления CDRH2

V/N/G-I/L-D-P-E/A/G-T/Y-G-X-T-A

SEQ ID NO.:99: Иллюстративный вариант осуществления CDRH2

Y-I-N/S-F/Y-N/D-G

SEQ ID NO.:100: Иллюстративный вариант осуществления CDRH3

M-G-Y-S/A-D-Y

SEQ ID NO.:101: Иллюстративный вариант осуществления CDRH3

A-S-S-Y-D-G-F-L-A-Y

SEQ ID NO.:102: Иллюстративный вариант осуществления CDRH1

3

A-R/W-W/F-G-L-R-Q/N

SEQ ID NO.103 - вариабельный участок легкой цепи 3A2

DAVMTQIPLTLSVTIGQPASLSCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLISLVS
LDSGVVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWWQGTHFPRTFAGGTNLEIK

SEQ ID NO.104 - вариабельный участок легкой цепи 3F6

SIVMTQIPLTLSVTIGQPASITCKSSQSLYSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLISLVS
LDSGVVPDGFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWWQGTHFPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO.105 - вариабельный участок легкой цепи 3E8

DAVMTQIPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVS
LDSGVVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWWQGTHFPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO.106 - вариабельный участок легкой цепи 3E10

DIVMTQAAPSVPVTPGESVISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSN
LASGVPDFSGSGSTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO.107 - вариабельный участок легкой цепи 3A9
DIVMTQSPSSLAMSLGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRSGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHFNTPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.108 - вариабельный участок легкой цепи 3B1
DIVMTQSPSSLAIISVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.109 - вариабельный участок легкой цепи 3G5
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.110 - вариабельный участок легкой цепи 3B2
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.111 - вариабельный участок легкой цепи 3B8
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.112 - вариабельный участок легкой цепи 3G8
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.113 - вариабельный участок легкой цепи 3F7
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.114 - вариабельный участок легкой цепи 3E9
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTEFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.115 - вариабельный участок легкой цепи 3C3
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFGS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTISGVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.106 - вариабельный участок легкой цепи 3E12
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNRSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.117 - вариабельный участок легкой цепи 4A2
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLLYFAS
TRESGVPDFRFIGSGSGTYFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLDLK
SEQ ID NO.118 - вариабельный участок легкой цепи 3F10

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVMSCKSSQSLNNTSNQLNLYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TTESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.119 - вариабельный участок легкой цепи 3F4
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVMSCKSSQSLNNTSNQKNLYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRASGVPDFRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.120 - вариабельный участок легкой цепи 3B11
DIVMTQSPSSLAMSVGQKVMSCKSSQSLNNSNQKNLYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.121 - вариабельный участок легкой цепи 3G12
DIVMTQSPKFMSTSVDGRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPELLIYWTSTRHTGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELR
SEQ ID NO.122 - вариабельный участок легкой цепи 3D1
DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.123 - вариабельный участок легкой цепи 3C2
DIQMTQSPSSMYASLGERVTLTCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVAGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSELEYEDLGIIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.124 - вариабельный участок легкой цепи 3E6
DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVAGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSELEYEDLGIIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.125 - вариабельный участок легкой цепи 3H3
DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHRYFLNWFFQQKPGKSPKTLIYRANRLVAGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYFCLQYDAFPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO.126 - вариабельный участок тяжелой цепи 3A2
HEIQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTFDYNMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDV
TEYNEKFGRATLTSKSSSTAYMDLSSLTSDSAVYFCAWFGLRQWGQGTLVTVST
SEQ ID NO.127 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F6
HEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTEYNMHWVKQKPGQPEWIGNINPYNDV
TEYNEKFGRATLTSKSSSTAYMDLSSLTSDSAVYFCAWFGLRQWGQGTLVTVSA
SEQ ID NO.128 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E8
HEVQLQQSVPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTEYNMHWVKQKPGQPEWIGNINPYNNV
TEYNEKFGRATLTSKSSSTAYMDLSSLTSDSAVYFCAWFGLRQWGQGTLVTVSA
SEQ ID NO.129 - вариабельный участок тяжелой цепи 3A9
HQVQVQQPGAEVRPGASVTLSCASKASYIFTDYEVHWRQRPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTAEDSAVYYCIGYADYWGQGTTLVSS
SEQ ID NO.130 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B1

HQVQLQQPGAEVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGG
 TAYNQKFKGKATLTTDKSSSTAYMELRSLTSEDAVYYCMGYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.131 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B2
 HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGA
 TAYNQKFKGKATLTTDKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.132 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F4
 HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGS
 TAYNQKFKGKATLTTADKASSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.133 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E9
 HEVQLQQSGAELVRPGASATLSCKASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGS
 TAYNQKFKGKATLTTADKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGYADYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.134 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B8
 HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
 TAYNQNFTGKATLTTADKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGYADYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.135 - вариабельный участок тяжелой цепи 3G8
 HQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPATGD
 TAYNQKFKGKATLTTADKSSSTAYMEVSSLTSEDAVYYCMGYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.136 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F7
 HQAYLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
 TAYNQKFKDKATLTTADKASSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.137 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E12
 HQVQLQQSEAEVLVPGASVLSCKASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
 TAYNQKFKGKATLTTADKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGHS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.138 - вариабельный участок тяжелой цепи 3G12
 HEVQLQQSVAELVRPGASVTSCKASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGN
 TAFNQKFKGKATLTTADISSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.139 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F10
 HEVQLQQSVAELVRPGAPVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGA
 TAYNQKFKGKATLTTADKSSSAYMELSSLTSEDAVYYCMGSYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.140 - вариабельный участок тяжелой цепи 3C3
 HEVQLQQSVAEVVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVIDPETGV
 TAYNQRFRDKATLTTDKSSSTAYMELSSLTSEDAVYFCMGSYS DYWGQGTTLVSS
 SEQ ID NO.141 - вариабельный участок тяжелой цепи 3G5
 HQVQLQQPGAEVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTPVHGLEWIGVLDPGTGR
 TAYNQKFKDKATLSADKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCMGSYS DYWGPGTTLVSS
 SEQ ID NO.142 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B11

HEVQLQQSVAELVRPGASVTLSCASGYFTDYEMHWVKQTPVRGLEWIGVIDPATGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSAAMELSSLTSEDSAVYYCMGYSODYWGQGTTLVSS
SEQ ID NO.143 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E6
HQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFSDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGD
TVYNQKFKGKATLTADKSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC1SYAMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO.144 - вариабельный участок тяжелой цепи 4A2
HQVKLQQSGTELVRPGASVTLSCASGYKFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGG
TAYNQKFKGKAILTADKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC1SYAMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO.145 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E10
HEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGDTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGG
ITYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMELRGLTSEDSAVYYCQAYYRNSDYWGQGTTLVSS
SEQ ID NO.146 - вариабельный участок тяжелой цепи 3D1
HEVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGDKLEWMGYISFNGD
YNYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTLTVSA
SEQ ID NO.147 - вариабельный участок тяжелой цепи 3C2
HDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYISFNGD
SNYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDATYYCASSYDGLFAYWGQGPLVTVSA
A
SEQ ID NO.:148
KSSQSLHSDGKTYLN
SEQ ID NO.:149
LVSKLDS
SEQ ID NO.:150
WQGTHFPRT
SEQ ID NO.:151
GYTFTD YNMH
SEQ ID NO.:152
YINPYNDVTE
SEQ ID NO.:153
AWFGL RQ
SEQ ID NO.:154
RSSKSLLHSNGN TYLY
SEQ ID NO.:155
RMSNLAS
SEQ ID NO.:156
MQHLEYPYT

SEQ ID NO.:157
GDTFTD YYMN
SEQ ID NO.:158
DINPNYGGIT
SEQ ID NO.:159
QAYYRNS DY
SEQ ID NO.:160
KASQDVGTAVA
SEQ ID NO.:161
WTSTRHT
SEQ ID NO.:162
QQHYSIPLT
SEQ ID NO.:163
GYIFTDYEIH
SEQ ID NO.:164
VIDPETGNTA
SEQ ID NO.:165
MGYSDY
SEQ ID NO.:166
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSNFQKNF
LAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTP
LTFQGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSDKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO.:167
MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFTDYEIHWVRQ
APGQGLEWMGVIDPETGNTAFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCMGYSY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAP
ELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO.:168
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYFAS
TRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPLTFQGQGTKLEIK
SEQ ID NO.:169

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYIFTDYEIHWRQAPGQGLEWMGVIDPETGNT
 AFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCMGYSYDWWGQGTLVTVSS
 SEQ ID NO.:170
 MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNFLNWFQQ
 KPGKAPKTLI FRANRLVDGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQG
 TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWQVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDKSTYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
 SEQ ID NO.:171
 MDWWTWIRILFLVAAATGTHAEVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGFSITSGYGWHWIR
 QHPGKGLEWIGYINYDGHNDYNPSLKSRTVTISQDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASSYDG
 LFAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNNGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLQGTLQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVHEALHNHTQKSLSLSPGK
 SEQ ID NO.:172
 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNFLNWFQOKPGKAPKTLI FRANRLVDGV
 PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTLKLEIK
 SEQ ID NO.:173
 EVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGFSITSGYGWHWIRQHPGKGLEWIGYINYDGHN
 DYNPSLKSRTVTISQDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGTLTVS
 SEQ ID NO:186 (консенсусная последовательность 1
 вариабельного участка вариантной легкой цепи ЗА4)
 DXVMTQTPSLXVXXGXXASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSN
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a1}

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

SEQ ID NO:187 (консенсусная последовательность 2
 вариабельного участка вариантной легкой цепи ЗА4)
 DX_{a1}VMTQTPSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K

где X_{a1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a2} может быть А или Р;

X_{a3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{a4} может быть L или Р;

X_{a5} может быть кислой аминокислотой;

X_{a6} может быть Q или Р;

X_{a7} может быть основной аминокислотой;

X_{a8} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a9} может быть А или Q;

X_{a10} может быть основной аминокислотой или

X_{a11} может быть гидрофобной аминокислотой,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO:188 (консенсусная последовательность 3
 вариабельного участка вариантной легкой цепи ЗА4)
 DX_{a1}VMTQTPSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K

где X_{a1} может быть V или I;

X_{a2} может быть А или Р;

X_{a3} может быть S или T;

X_{a4} может быть L или Р;

X_{A5} может быть D или E;
 X_{A6} может быть Q или P;
 X_{A7} может быть K или Q;
 X_{A8} может быть L или V;
 X_{A9} может быть A или Q;
 X_{A10} может быть R или K или
 X_{A11} может быть L или I,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO:189 (вариабельный участок варианта 1 легкой цепи
ЗА4: Lvh1)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:190 (вариабельный участок варианта 2 легкой цепи
ЗА4: Lvh2)

DVVMQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:191 (консенсусная последовательность 1
вариабельного участка вариантов тяжелой цепи ЗА4)

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYFTDDYMSWVXQXXLEWXGDINPYNGDT
NYNQKFKGXXXXTDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXVTVSS

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

SEQ ID NO:192 (консенсусная последовательность 2
вариабельного участка вариантов тяжелой цепи ЗА4)

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}
LEWX_{b11}GDINPYNGDTNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{b23}VTVSS

где X_{b1} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b2} может быть P или A;
 X_{b3} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b4} может быть V или K;
 X_{b5} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b6} может быть основной аминокислотой;
 X_{b7} может быть S или A;
 X_{b8} может быть H или P;
 X_{b9} может быть основной аминокислотой;
 X_{b10} может быть S или G;
 X_{b11} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b12} может быть основной аминокислотой;
 X_{b13} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b14} может быть I или T;
 X_{b15} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b16} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b17} может быть K или T;
 X_{b18} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;
 X_{b19} может быть Q или E;
 X_{b20} может быть N или S;
 X_{b21} может быть T или R;
 X_{b22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой или
 X_{b23} может быть S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 193 (консенсусная последовательность 3
 вариабельного участка вариантной тяжелой цепи 3A4)
 QX_{B1}QLVQSGX_{B2}EX_{B3}X_{B4}KPGASVKKX_{B5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{B6}QX_{B7}X_{B8}GX_{B9}X_{B10}
 LEWX_{B11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}TX_{B16}DX_{B17}SX_{B18}STAYMX_{B19}LX_{B20}SLX
 B_{B21}SEDX_{B22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{B23}VTVSS

где X_{B1} может быть I или V;
 X_{B2} может быть P или A;
 X_{B3} может быть M или V;
 X_{B4} может быть V или K;
 X_{B5} может быть M или V;
 X_{B6} может быть K или R;
 X_{B7} может быть S или A;
 X_{B8} может быть H или P;
 X_{B9} может быть K или Q;
 X_{B10} может быть S или G;
 X_{B11} может быть I или M;
 X_{B12} может быть K или R;
 X_{B13} может быть A или V;
 X_{B14} может быть I или T;
 X_{B15} может быть L или I;
 X_{B16} может быть V или A;
 X_{B17} может быть K или T;
 X_{B18} может быть S или T;
 X_{B19} может быть Q или E;
 X_{B20} может быть N или S;
 X_{B21} может быть T или R;
 X_{B22} может быть S или T или
 X_{B23} может быть S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO:194 (вариабельный участок варианта 1 тяжелой цепи 3A4: Hvh1)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:195 (вариабельный участок варианта 2 тяжелой цепи 3A4: Hvh2)
QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:196 (вариабельный участок варианта 3 тяжелой цепи 3A4: Hvh3)
QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:197 (вариабельный участок варианта 4 тяжелой цепи 3A4: Hvh4)
QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 198 мышиная легкая (каппа) цепь 3A4
DVVMTQTPLSLAVSLGQASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:199 вариант 1 гуманизированной легкой (каппа) цепи 3A4; Lh1
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:200 вариант 2 гуманизированной легкой (каппа) цепи 3A4; Lh2

DVVMQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVD
RFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFQGQTKLEIKRTVAAPS
IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
TLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRC

SEQ ID NO:201 тяжелая (Igg1) цепь мышного 3A4

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKAILTVKDSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
VTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
SDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:202 вариант 1 гуманизированной тяжелой (Igg1) цепи 3A4; Hh1

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
VTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
SDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:203 вариант 2 гуманизированной тяжелой (Igg1) цепи 3A4; Hh2

QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
VTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
SDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:204 вариант 3 гуманизированной тяжелой (Igg1)

цепи 3A4; Hh3

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
YNQKFKGRATLTVKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTIVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNKHPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:205 вариант 4 гуманизированной тяжелой (Igg1)
цепи 3A4: Hh4

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
YNQKFKGKATLTVKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTIVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNKHPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:206

ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

SEQ ID NO.:207

ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGGAGACAGGGAG

SEQ ID NO.:208

ATACCCAAGCTGGGCCACCATGAACCTTCTGCTGTCTGG

SEQ ID NO.:209

ATACCCAAGCTCTAACACTCTCCCCCTGTTGAAG

SEQ ID NO:210 pK-CR5

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTGTTAAAATTGGCTTAAATTGTTAAATCAGC
TCATTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAATCAAAGAATAGACCGAG
ATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCAAAC
GTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCA
AGTTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGAAAGCCGGGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGCGAAAGGAGCG
GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCTAACACCACACCCGCCGCGCTT
AATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA

TCGGTGCGGGCCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCAGTTA
 AGTTGGGTAACGCCAGGTTTCCCAGTCACGAGTTGAAACGACGGCAGTGAGCGCG
 TAATACGACTCACTATAGGGCAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCCTAGAACTAGT
 GGATCCACATCGGCGGCCAAATGATTGCCCTCCATATGCTCTCGAGTGAGAGACACAA
 AAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTCTTTATTAGCCAGAGGTGAGATT
 AATAAGCTTGTAGCAGATCTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTG
 GATGTCATTGTCACTCAAGTGATGGCCAGATCGGGCAGGTGAATATCAAATCCTCGTT
 TTTGGAAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCA
 ACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCACCGCTCAAGACCCCTACT
 TTAATTACATCATCAGCAGCACCTCGCCAGAAACAACCCGACCGCACCCGCTGCCCG
 CCACGGTGCACGCTACCTCGACTGTGACTGGTAGACGCCCTCTCGAGAGGTTTCCG
 ATCCGGTCGATGCCGACTCGCTCAGGTCCTCGGTGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGG
 TTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTGCTCAACCGCGAGCCAAACAGC
 TGGCCCTCGCAGACAGCGATCGGAAGAGAGTGACCGCGAGGCTGGATCGGTCGGTGTCT
 TCTATGGAGGTAAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTCACTAAACGAGC
 TCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTACACGCCACCTCGACCCGGTACCAATCTATAATAC
 AAACAGACCAGATTGCTGTTGTTATAATACAAACAGACAGATTGCTGTTGTTATAAT
 CAAACAGACCAGATTGCTGTTGTTATAATACAAACAGACAGATTGCTGTTGTTAAGG
 TTGTCAGTGAAAGACGAAAGGGTCAATTAGGCGCCGTCGACCTCGAGGGGGCCCGTA
 CCCAGCTTGTGAAATTGTTATCCGTCACAATTCCACACACATACGAGCGGAAGCATAAAG
 TGTAAGCCTGGGTGCTTAATGAGTGAGCTAATCACGTTATGCCACAGGTTACGCTGCT
 GCTTCCAGTCGGAAACCTGCGCCAGCTGCTTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGA
 GGCAGCTTGTGCTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAATCGACGCTCA
 CGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTACTCAAAGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
 GATAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCC
 GCGTTGCTGGCGTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAATCGACGCTCA
 AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATAACCGCGTTCCCCCTGGAAGCTCC
 CTCGTGCGCTCTCGTGTGACGAACCCCCCGTCAAGCCGCTGCGCCTTATCCGTAAC
 TATCGTCTTGAGTCAACCGGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
 AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACTAC
 GGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAA
 AGAGTTGGTAGCTTGTACCGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTGTGTTGC

AAGCAGCAGATTACGCGAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGG
 TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTGGTCATGAGATTCAAAAAGG
 ATCTTCACCTAGATCCTTAAATTAAAAATGAAGTTAAATCAACTAAAGTATATGAG
 TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGTTAACAGTGGCACCTATCAGCGATCTGCTA
 TTTCGTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGCTGTAGATAACTACGGATACGGAGGGCTTA
 CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAACCGCGAGACCCACGCTCACGGCTCCAGATTATCA
 GCAATAAACCCAGCCAGCGGAAGGGCGAGCGCAGAAGTGGCCTGCAACTTATCCGCTCC
 ATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAACAGTTGCGC
 AACAGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTCACGCTCGTCTGGTATGGCTTCAATT
 AGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCAGTTACATGATCCCCATGTTGCAAAAAAGCGGTT
 AGCTCCCTCGGTCCCGATCGTGTAGAAGTAAGTGGCCAGTGTTATCACTCATGGTT
 ATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTCTGTGACTGGT
 GAGTACTCAACCAAGTCATTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTTGGCCGGCG
 TCAATACGGATAAACCGCGCACATAGCAGAACTTAAAGTGCTCATCATTGAAAACGT
 TCTTCGGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACT
 CGTGCACCCAACTGATCTCAGCATTTTACTTACCCAGCGTTCTGGTGAGCAAAACAA
 GGAAGCAAAATGCCGCAAAAAGGAAATAAGGGCAGACCGAAATGTTGAATACTCATACTC
 TTCTTTTCAATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTT
 GAATGTATTTAGAAAATAACAAATAGGGTCCGCGCACATTCCCCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:211 pMPG-CR5

GTCGACGATACCGTGCACCTTAATTAAAGCGCGCTGACCAAATGATTGCCCTCCCATA
 TGTCCTTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCAAACACACTATTGCAATGAAAATAATTCT
 TTATTAGCCAGAGGTCAGGTGGGGATCCGTTAAACTTGGACCTGGAGTGGAACACCTGT
 GGAGAGAAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGATGGCCAGATCGGGCAGGTGAA
 TATCAAATCCTCCTCGTTTGAAACTGACAATCTAGCGCAGAAGTAATGCCGTTTGA
 GAGGGAGTACTCACCCAAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCGCC
 GTCTCAAGACCGCCTACTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCGACC
 GCCACCCGCTGCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTGCGACTGTGACTGGTAGACGCCT
 TTCTCGAGAGGTTTCCGATCCGGTCATGCCGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGAGTAC
 CGTTGGAGGCCGACGGGTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTGTCCTC
 AACCGCGAGCCAAACAGCTGCCCTCGCAGACAGCGATGCCAGAGAGTGACCGCGAGGCT
 GGATCGGTCCCGGTCTTCTATGGAGGTCAAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGGATCTG
 ACGGTTCACTAAACAGAGCTCTGTTATAGGCCTCCACCGTACACGCCCTACCTCGACCCGG
 GTACCAATCTTATAATACAAACAGACAGATTGTCTGTTGTTATAATACAAACAGACAGAG
 TTGTCGTTGTTATAATACAAACAGACAGATTGTCTGTTGTTATAATACAAACAGACAGAG

ATTGTCTGTTGTTAAGGTTGTCGAGTGAAGACGAAAGGGTTAATTAGGCGGCCGTCGACT
 AGCTTGGCACGCCAGAAATCCGCGCGTGGTTTGGGGTGGGGGTGTTGGCAGCCACAG
 ACGCCCGGTGTCGCGCCAGTACATGCGTCCATGCCAGGCCATCCAAAACCATGG
 GTCTGCTGCTCAGTCCAGTCGACGAGCCCCACGCCAACGCCAAAATAATAACCCCCAC
 GAACCATAAACCATCCCCATGGGGACCCGTCCTAACCCACGGGCCAGTGGCTATGGCA
 GGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGCCTTCACCCGAACGGGGGTGGGGT
 GGGGAAAAGGAAGAACGCCGGTATTGGCCCAATGGGTCTCGGTGGGTATCGACAGAG
 TGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTATGAACAAACGCCAACACCCGTGCGTTTATT
 CTGTCTTTTATTGCCGTATAGCGGGTTCCTCCGGTATTGTCTCCTCCGTGTTCACT
 TAGCCTCCCCATCTCCCTATCCTTGCCTCGGACGAGTGCTGGCGTCGGTTCCACT
 ATCGCGAGTACTCTACACAGCCATCGGTCAGCGCCCGCTCTGCGGGCAGTGT
 ACGCCCGACAGTCCCGCTCCGGATCGGACGATTGCGTGCATGACCCCTGCGCCCAAGCTGC
 ATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATA
 CGCCCGAGCGCGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCCTCGCTCGAAGTAGCGCTGCTG
 CTCCATACAAGCCAACCACGCCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCC
 GAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCCATTGTCCTCAGGACATTGTT
 GGAGCCGAAATCCCGTGCACGAGGTGCCGACTTCGGGAGTCCTCGGCTCGCATCACAGTTGCCAGTGATA
 CTCATCGAGAGCCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTGTCGTCATCACAGTTGCCAGTGATA
 CACATGGGATCAGCAATCGCCTGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCTTG
 CGGTCCGAATGGCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGAGCGATCGCATCCATGGC
 CTCCCGGACCGGCTGCGAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTCAAGGCTTGTGACCGACACC
 CTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAAGGCTCTCGCTGAATTCCCAATGTCAAGCACTTC
 CGGAATCGGGAGCGCGCCGATGCAAAGTGGCATAAACATAACGATTTGTAGAAACCATC
 GGCGCAGCTATTACCCGCAAGGACATATCCACGCCCTCCATCGAAGCTGAAAGCACGAGA
 TTCTCGCCCTCCAGAGAGCTGCATCAGGTGGAGACGCTGCAACTTTCGATCAGAAACTT
 CTCGACAGACGCTCGCGTGAGTCAGGCTTTCATATCTCATTGCCGGATCTGCGGCACG
 CTGTTGACGCTGTTAAGCGGGTCGCTGCAGGGTCGCTGGTGTGAGGGCACACCGTCACC
 TTAATATGCGAAGTGGACCTGGGACCGCGCCCGACTGCATCTCGTGTGAAATTGCC
 AATGACAAGACGCTGGGGTTGTGTCATAGAAACTAAAGACATGCAAATATATTCT
 TCCGGGGACACCGCCAGCAAACGCGAGCAACGGGCACGGGGATGAAGCAGGGCATGGCGGC
 GACCGCTGGCTACGTTGCTGGCGTCCGACGCGAGGCTGGATGCCCTCCCCATTATG
 ATTCTCTCGCTCCGGCGCATCGGATGCCCGTTGCGAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTA
 GATGACGACCACAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGGGCTCTTACAGCCTAACCGATC
 ACTGGACCGCTGATCGTCACGGGATTATGCCCTCGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCA
 TGGATTGTAGGCGCCCTATACCTTGTCTGCCCTCCCCGTTGCGTGCAGGTGATGGAGC
 CGGGCACCTCGACCTGAATGGAAGGCCGGCACCTCGCTAACGGATTCAACCACTCCAAGAA

TTGGAGCCAATCAATTCTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTGGCAGAACATAT
 CCATCGCGTCCGCCATCTCAGCAGCCGACGCCGAGCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA
 GGCGCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACG
 CTCAAGTCAGAGGTGGCGAACCCGACAGGACTATAAGATAACCAGGCCTTCCCCCTGGAAG
 CTCCCTCGTGCCTCCTGTTCCGACCGTCCGCTACCGATACCTGTCCGCCTTCTCCC
 TTCGGAAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCT
 TCGCTCCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCCGTTAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
 TAACTATCGTCTGAGTCCAACCGGTAAGACAGACTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
 TAACAGGATTAGCAGAGCAGGTTATGTAGGCGGTCTACAGAGTTCTGAAAGTGGTGGCTAA
 CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGG
 AAAAGAGTTGGTAGCTTGTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGT
 TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTCTAC
 GGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTGGTCATGAGATTATCAA
 AAGGATCTTCACCTAGATCCTTAAATTAAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATA
 TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
 TCTATTCGTTCATCCATAGTGCCTGACTCCCCGTCGTAGATAACTACGATAACGGGAGGG
 CTTACCATCTGGCCCCAGTGCCTGCAATGATAACCGCAGACCCACGCTACCGGCTCAGATT
 ATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCTCTGCAACTTATCCGC
 CTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCATTGCTGCAAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGGTATGGCTTC
 ATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
 GGTTAGCTCCTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTT
 GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGGTATGGCTTC
 ATGGTAGCTCAGTCAACCAAGTCAAGGCGAGTTACATGATGCTCTGGTATGGCTTC
 GGCCTCAACACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGCTCATCATTGGAAA
 ACGTTCTCGGGGCAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGGAGATCCAGTTGATGTAACC
 CACTCGTGCACCCAACGTGATCTCAGCATCTTACTTCACCAGCTTCTGGGTGAGCAAA
 AACAGGAAGGCAAATGCCGAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
 ACTCTCCTTTCAATTATTGAAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACAT
 ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGTCCCGCACATTCCCCGAAAAGTGCC
 ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATGACATTAACCTATAAAATAGGCGTACCGAG
 GCCCTTCGTCCTCAAGAATTCTCATGTTGACAGCTTCTCTAGCAGATCCGAATTCCCC
 TCCCCAATTAAATGAGGACCTAACCTGTGGAAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAACGTAC
 AACACAGAGGTTATTGGAATAACTAGCATGCTAACCTCATGCAGGGTCACAAAAGTGATG
 ACGATGGTGGAGGAAACCTATTCAAGGCAGTAATTCCACTTCTTGCTGTTGGAGACC
 CCTTGAAATGCAGGGAGTGCTAATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGGTACTATAACCC

CTAAAAACCCAACAGCCCAGTCCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTGGACAAA
ACAATGCTTATCCAGTTGAGTGTGGGTTCTGTAGCTAGTAGAAATGAAAATACTAGGTATT
TTGGGACTTTCACAGGAGGGAAAATGTCAGTACTTCATGTGACCAACACAGCTACCA
CAGTGGTAGATGAACAGGGTGTGGGCCTCTTGAAAGCTGATAGCCTGTATGTTCAG
CTGCTGATATTGTCAGCTGAGAAAAGATCTGAAAGAACACTTACCTAATTCCCTTTGC
GATATTAAAGATCCGCCTGAGAAAAGATCTGAAAGAACACTTACCTAATTCCCTTTGC
TAAGTGACCTTATAAACAGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGCAGCCTATGTATGGATGGAAT
CCCAGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTGATGGCAGAAAGACTTCCAGGGACCCAGATATGA
TAAGATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAACAAAATGCTTAAACAGGTGCTTTATTG
TACATATACATTAAATAATGCTGCTTTGTATAAGCCACTTTAAGCTGTGTTATTTGGG
GGTGGTGTGTTAGGCCTTTAAACACTGAAAGCCTTACACAAATGCAACTCTGACTATGG
GGTCTGACCTTGGGAATGTCAGCAGGGCTGAAGTATCTGAGACTTGGGAAGAGCATTGT
GATTGGGATTCACTGCTTGATCCATGTCCAGAGTCTCAGTTCTGAATCCTCTCTGTA
ATATCAAGAACATTCAGCCTTCCTCCATTCAACAATTCTAGAAGTTAAACTGGGGTAGATGCT
ATTACAGAGGTAGAATGCTCCTAAACCCAGAAATGGGGATCTGC

SEQ ID NO:212 - полипептидная последовательность CDR2
гуманизированной тяжелой цепи ЗА4.

DINPYNGDTN

SEQ ID NO:213 - OGS18500

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGTGATGACCCAAACTCC

SEQ ID NO:214 - OGS2084

GGGAAGATGAAGACAGATGGTCAGCCACAGTCCG

SEQ ID NO:215 - OGS1879

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGAATCTGG

SEQ ID NO:216 - OGS1810

GGGGCCAGGGAAAGACAGATGGGCCTTCGTTGAGGC

Список цитированной литературы

Santana-Davila R. and Perez E.A. (2010) "Treatment options for patients with triple-negative breast cancer" *J Hematol Oncol.* 27:42.

de Ruijter T.C., Veeck J., et al. (2011) "Characteristics of triple-negative breast cancer." *J Cancer Res Clin Oncol.* 137:183.

Ismail-Khan R. and Bui M.M. (2010) "A review of Triple-negative breast cancer" *Cancer Control* 17:173.

Carey L.A., Perou C.M. et al. (2006) "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." *JAMA* 295:2492.

Krieg M., Seynaeve C. et al. (2009) "Sensitivity to first-line chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." *J Clin Oncol* 27:3764.

Rouzier R., Perou C.M. et al. (2005) "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy" *Clin Cancer Res* 11:5678.

Fong P.C., Boss D.S. et al. (2009) "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers." *N Engl J Med* 361:123.

Dent R., Trudeau M et al. (2007) "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Feature and Patterns of Recurrence" *Clin. Cancer Res.* 13: 4429.

Bernstein L and J.V. Lacey Jr. (2011) "Receptors, Associations, and Risk Factor Differences by Breast Cancer Subtypes: Positive or Negative?" *J Natl Cancer Inst* 103(6): 451-453 (Расширенная публикация 23 февраля 2011 г.).

Nofech-Mozes S. et al., (2009) "Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers" *Cancer Res. Treat.* 118: 131-137.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения тройного негативного рака молочной железы, включающий введение индивиду антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое конъюгировано с терапевтической молекулой, подходящей для лечения тройного негативного рака молочной железы, и способно связываться с ассоциированным с почками антигеном 1 (KAAG1), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

CDRH1 с SEQ ID NO: 49,

CDRH2 с SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 212,

CDRH3 с SEQ ID NO: 51,

CDRL1 с SEQ ID NO: 52,

CDRL2 с SEQ ID NO: 53 и

CDRL3 с SEQ ID NO: 54.

2. Способ по п.1, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, антитело человека или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

3. Способ по п.1 или 2, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 48 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 46;

б) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 186, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 48, и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 191, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 46;

- с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 187 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 192;
- д) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 188 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 193;
- е) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;
- ф) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194;
- г) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195;
- и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 196;
- и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 197;
- ж) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194; и
- к) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

- а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205;
- б) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;
- с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;
- д) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204;
- е) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205;
- ж) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;
- з) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;
- и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204; и
- и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором терапевтическая молекула представляет собой цитотоксическое средство или антимитотическое средство.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение химиотерапевтического средства.

7. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение противоракового средства.

8. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение цитотоксического агента.

9. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение ингибитора PARP1, ингибитора EGFR или терапевтического антитела, подходящего для лечения тройного негативного рака молочной железы.

10. Способ по любому из пп.1-5, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают аффинностью 1нМ или меньше или 0,1 нМ или меньше в отношении KAAG1.

11. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного специфически связываться с KAAG1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

CDRH1 с SEQ ID NO: 49,

CDRH2 с SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 212,

CDRH3 с SEQ ID NO: 51,

CDRL1 с SEQ ID NO: 52,

CDRL2 с SEQ ID NO: 53 и

CDRL3 с SEQ ID NO: 54,

в производстве лекарственного средства для лечения тройного негативного рака молочной железы.

12. Применение по п.11, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с терапевтической молекулой, подходящей для лечения тройного негативного рака молочной железы.

13. Применение по п.12, при котором терапевтическая молекула представляет собой цитотоксическое средство или антимитотическое средство.

14. Применение по любому из пп.11-13, при котором антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, антитело человека или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15. Применение по любому из пп.11-14, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 48 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 46;

б) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 186, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 48, и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 191, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенных как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 46;

с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 187 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 192;

д) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 188 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 193;

е) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 190 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

ф) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194;

г) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195;

х) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 196;

и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 197;

ж) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194; и k) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195.

16. Применение по любому из пп.11-15, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

- a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205;
 - b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;
 - c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;
 - d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204;
 - e) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205;
 - f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;
 - g) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;
 - h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204; и
 - i) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205.

17. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит противораковое средство.

18. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит химиотерапевтическое средство.

19. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит цитотоксическое средство.

20. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит ингибитор PARP1, ингибитор EGFR или терапевтическое антитело, подходящее для лечения тройного негативного рака молочной железы.

21. Применение по любому из пп.11-16, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают аффинностью 1 нМ или меньше или 0,1 нМ или меньше в отношении KAAG1.

CDR-L2

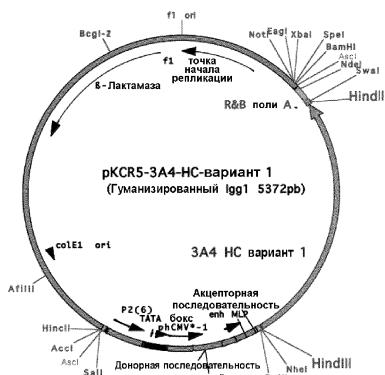
ФИГ. 1б

Выравнивание вариабельной легкой цепи

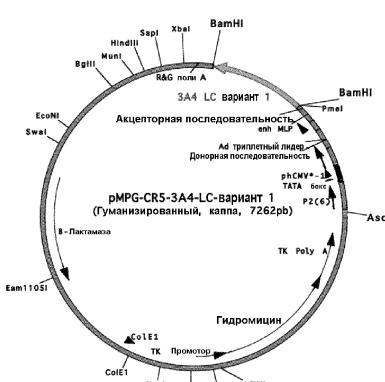
Фиг. 2а

Выравнивание вариабельной тяжелой цепи

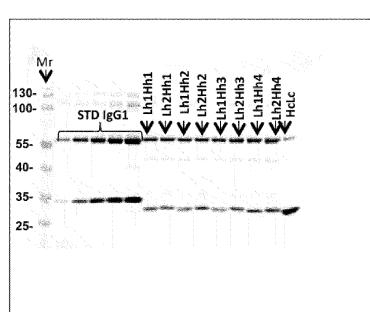
Фиг. 2б



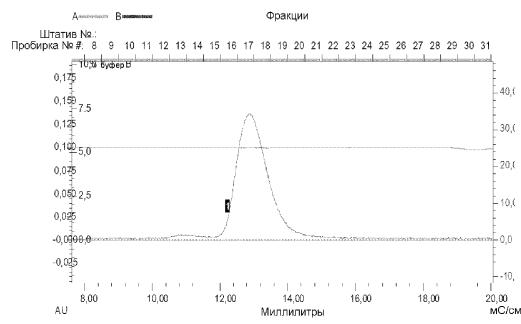
Фиг. 3а



Фиг. 3б



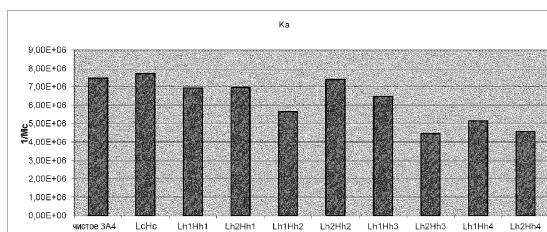
Фиг. 4



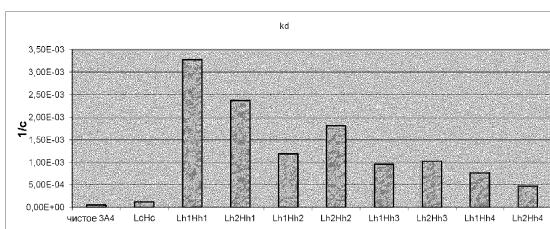
Фиг. 5

Антитело	ka (1/Mc)	kd (1/c)	Kо (нМ)	Различие, раз
LcHc	$7,72 \times 10^6$	$1,21 \times 10^{-4}$	0,016	-
Lh1Hh1	$6,93 \times 10^6$	$3,28 \times 10^{-3}$	0,474	29,6
Lh2Hh1	$6,97 \times 10^6$	$2,37 \times 10^{-3}$	0,341	21,3
Lh1Hh2	$5,65 \times 10^6$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,211	13,2
Lh2Hh2	$7,40 \times 10^6$	$1,81 \times 10^{-3}$	0,245	15,3
Lh1Hh3	$6,46 \times 10^6$	$9,60 \times 10^{-4}$	0,149	9,3
Lh2Hh3	$4,46 \times 10^6$	$1,02 \times 10^{-3}$	0,228	14,3
Lh1Hh4	$5,14 \times 10^6$	$7,64 \times 10^{-4}$	0,149	9,3
Lh2Hh4	$4,57 \times 10^6$	$4,70 \times 10^{-4}$	0,103	6,4

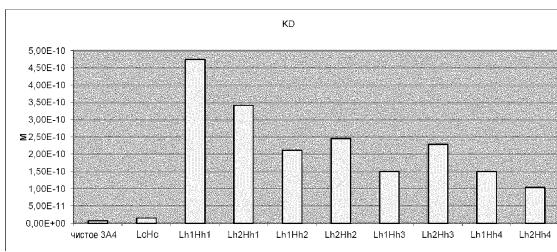
Фиг. 6



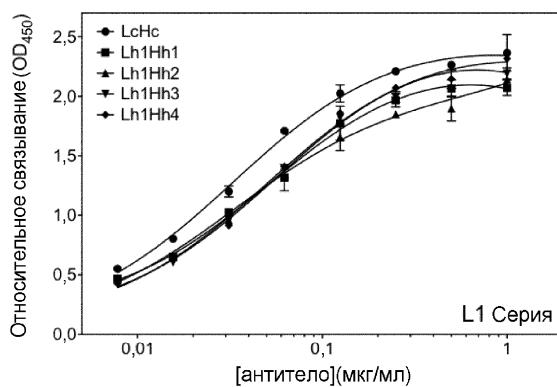
Фиг. 7а



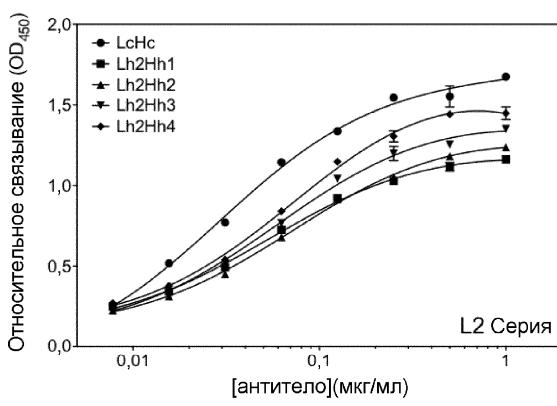
Фиг. 7b



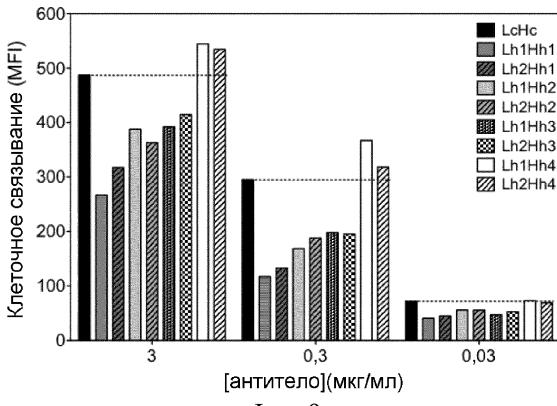
Фиг. 7c



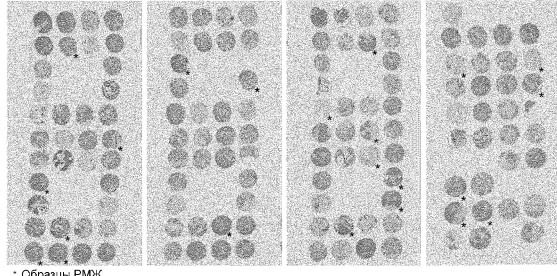
Фиг. 8а



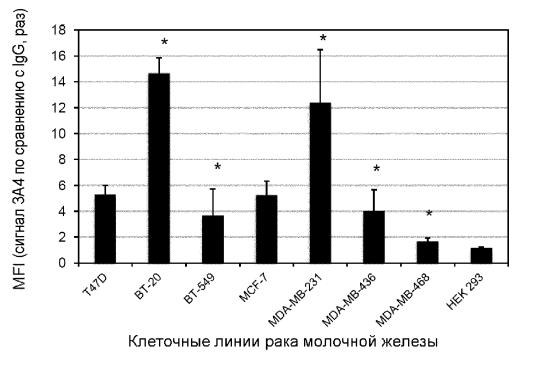
Фиг. 8б



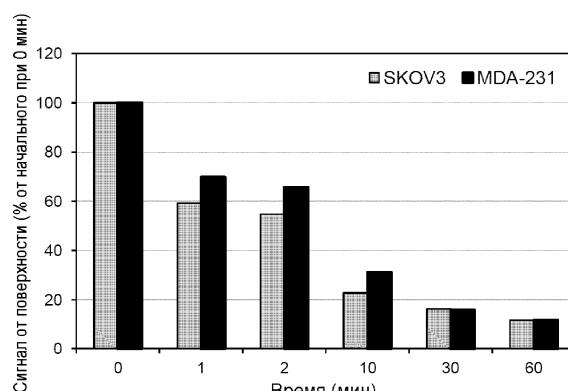
Фиг. 9



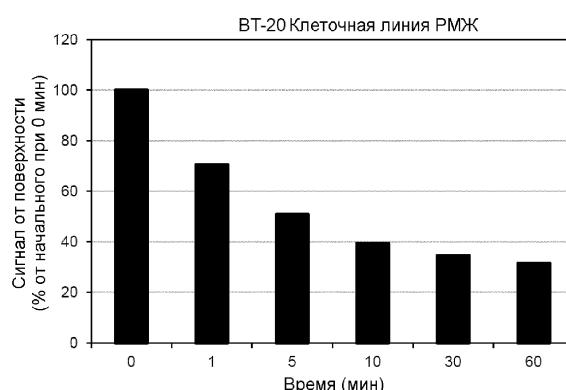
Фиг. 10



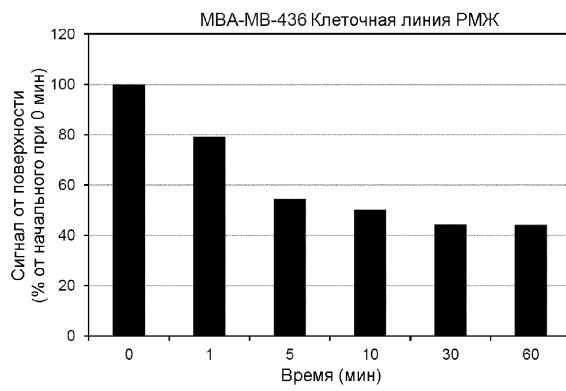
Фиг. 11



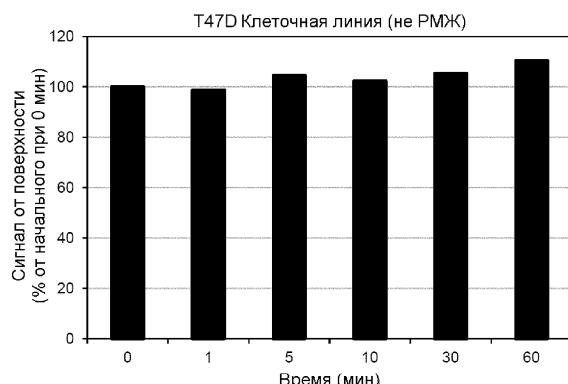
Фиг. 12



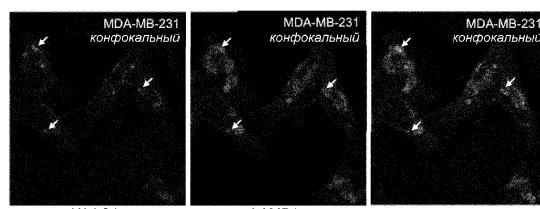
Фиг. 13



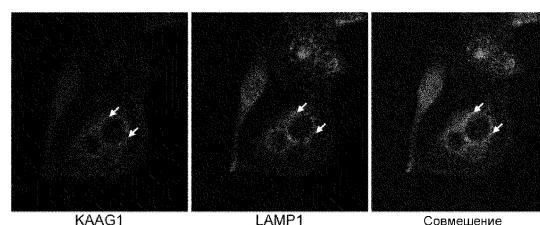
Фиг. 14



Фиг. 15



LAMP1
ФИГ. 16



Фиг. 17