



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129489** (13) **C2**
(51) МПК (2025.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2018 01569	(72) Винахідник(и): Декерт Ютта (US), Таварес Деніел (US), Руї Лінгюн (US), Льобріх Свен (US), Келлі Меган (US)
(22) Дата подання заявки: 26.08.2016	(73) Володілець (володільці): ДЕБІОФАРМ ІНТЕРНАЦІОНАЛ, С.А., Forum "après-demain", Chemin Messidor 5-7, Case Postale 5911, CH-1002, Lausanne, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 15.05.2025	(74) Представник: Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/211,455, 62/212,183	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2013/295104 A1, 07.11.2013 WO 2013/149171 A2, 03.10.2013 WO 2015/116729 A2, 06.08.2015 US 2005/287538 A1, 29.12.2005 US 2006/039913 A1, 29.10.2009 Membrane topology of the L6 antigen and identification of the protein epitope recognized by the L6 monoclonal antibody / MARKEN J.S. et al. // The journal of biological chemistry. 1994. Vol. 269 (10). P. 7397-7401 US 2013/058947 A1, 07.05.2013 US 2009/041783 A1, 12.02.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 28.08.2015, 31.08.2015	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.08.2018, Бюл.№ 15	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 14.05.2025, Бюл.№ 20	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2016/048887, 26.08.2016	

(54) АНТИТІЛО ДО CD37**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язується з CD37. Також винахід стосується виявлення експресії CD37 у зразку, застосування терапевтично активного агента, що містить антитіло до CD37.

UA 129489 C2

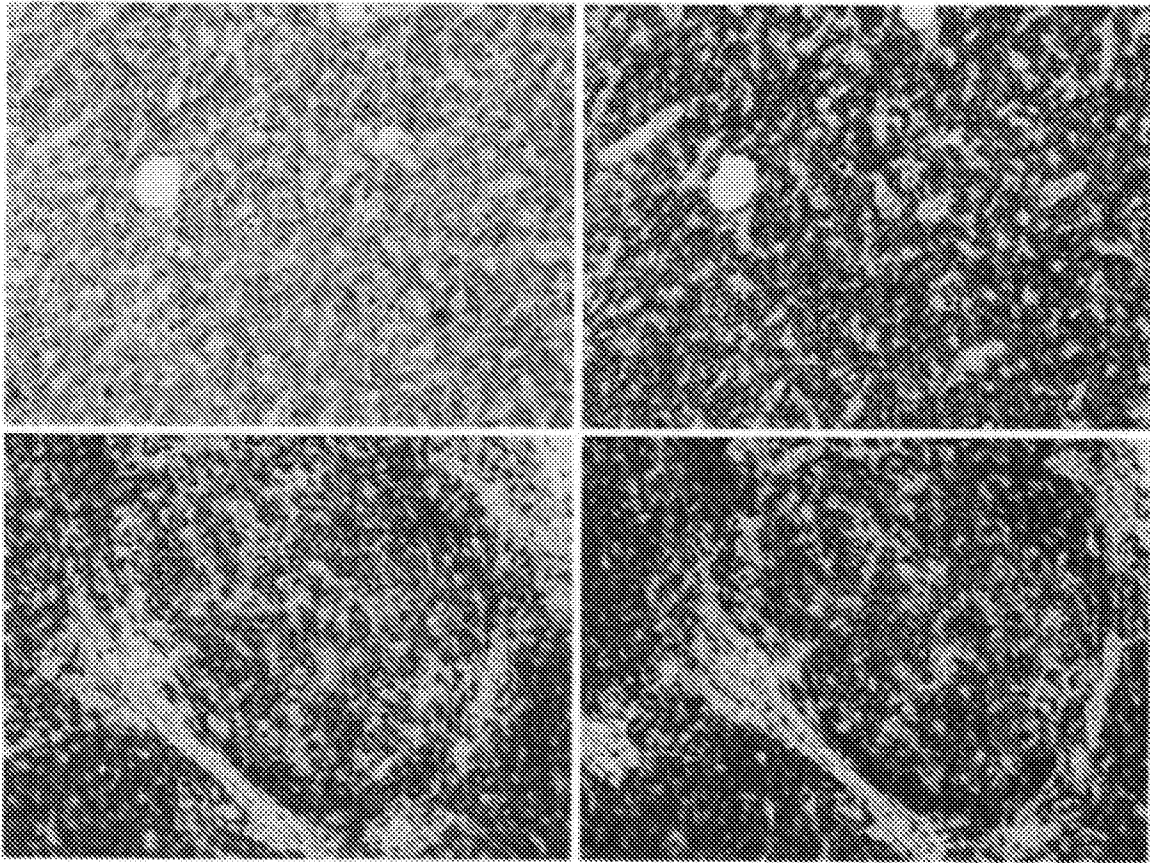


Fig. 7

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[0001] Дана заявка заявляє пріоритет на основі попередньої заявки на патент США № 62/211,455, поданої 28 серпня 2015 року, та попередньої заявки на патент США № 62/212,183, поданої 31 серпня 2015 року, кожна з яких включена у даний опис шляхом посилання у всій своїй повноті.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

[0002] Даний винахід у цілому відноситься до діагностичних досліджень та наборів для націленого на CD37 лікування, а також до антитіл, які зв'язуються з CD37 людини.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0003] Рак є однією з основних причин смерті у розвинених країнах, тільки у Сполучених Штатах рак діагностований більш ніж у одного мільйона людей та викликає 500000 смертей на рік. У цілому, за оцінками, більш ніж у 1 з 3 людей буде розвиватися деяка форма раку протягом життя.

[0004] Антиген лейкоцитів CD37 ("CD37"), також відомий як GP52-40, тетраспанін-26 або TSPAN26, являє собою трансмембранний білок суперсімейства тетраспанінів (Maescker et al., 1997 FASEB J. 11:428-442). Зазначений білок являє собою сильно глікозилований білок із чотирма трансмембранними доменами, який експресується на поверхні В-клітин на стадіях від пре-В-клітин до зрілих периферичних В-клітин, але відсутній на кінцевій стадії диференціювання у плазматичні клітини (Link et al., 1987, J Pathol. 152:12-21). Антиген CD37 лише у незначному ступені експресований на Т-клітинах, мієлоїдних клітинах та гранулоцитах (Schwartz-Albiez et al. 1988, J. Immunol., 140(3):905-914). Однак CD37 також експресується на злоякісних В-клітинах, таких як В-клітини, що виявляються при неходжкінській лімфомі (НХЛ) та хронічному лімфоцитарному лейкозі (ХЛЛ) (Moore et al. 1986, J Immunol. 137(9):3013-8). Цей профіль експресії дозволяє припустити, що CD37 являє собою перспективну терапевтичну мішень для лікування В-клітинних злоякісних новоутворень, що експресують CD37. Однак для того, щоб ці способи лікування були максимально ефективними, необхідно мати можливість чутливого та специфічного визначення CD37 у динамічному діапазоні.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

[0005] У даному описі запропоновані антитіла до CD37 та їх антиген-зв'язуючі фрагменти, а також способи виявлення CD37, діагностики асоційованих з CD37 захворювань та розладів (таких як рак), контролю ефективності націлених на CD37 способів лікування, та розділення пацієнтів на групи. Антитіла до CD37 та їх антиген-зв'язуючі фрагменти є особливо кращими через те, що вони забезпечують можливість більш специфічного та вираженого зафарбовування, а також зафарбовування без ядерного фону. Антитіла до CD37 та їх антиген-зв'язуючі фрагменти можуть зв'язуватися з епітопом, який містить одну або більше з амінокислот 110-137 CD37. Антитіла до CD37 та їх антиген-зв'язуючі фрагменти також можуть зв'язуватися з поліпептидом, який містить амінокислоти 107-242 CD37 (SEQ ID NO:20) та/або з поліпептидом, який містить амінокислоти 107-235 CD37 (SEQ ID NO:19), при цьому зазначені антитіла до CD37 та їх антиген-зв'язуючі фрагменти не зв'язуються з поліпептидом, який складається з амінокислот 138-235 CD37.

[0006] У одному з варіантів реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису специфічно зв'язується з тим же епітопом CD37, що і антитіло, яке містить поліпептид, представлений SEQ ID NO:9, та поліпептид, представлений SEQ ID NO:10.

[0007] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису специфічно зв'язується з CD37 та конкурентно інгібує зв'язування з CD37 антитіла, що містить поліпептид, представлений SEQ ID NO:9, та поліпептид, представлений SEQ ID NO:10.

[0008] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису містить послідовності варіабельної області важкого ланцюгу CDR1, CDR2 та CDR3, представлені SEQ ID NO: 3-5, відповідно, та послідовності варіабельної області легкого ланцюгу CDR1, CDR2 та CDR3, представлені SEQ ID NO: 6-8, відповідно.

[0009] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису специфічно зв'язується з CD37, та зазначене антитіло або його фрагмент містить послідовності варіабельної області важкого ланцюгу CDR1, CDR2 та CDR3, представлені SEQ ID NO: 3-5, та послідовності варіабельної області легкого ланцюгу CDR1, CDR2 та CDR3, представлені SEQ ID NO: 6-8, відповідно.

[00010] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису містить поліпептидні послідовності, щонайменше на 90% ідентичні поліпептидним послідовностям, представленим SEQ ID NO: 9 та 10. У іншому варіанті реалізації зазначені поліпептидні послідовності щонайменше на 95% ідентичні поліпептидним

послідовностям, представленим SEQ ID NO: 9 та 10. У іншому варіанті реалізації зазначені поліпептидні послідовності щонайменше на 99% ідентичні поліпептидним послідовностям, представленим SEQ ID NO: 9 та 10. У іншому варіанті реалізації зазначені поліпептидні послідовності містять амінокислоти послідовностей SEQ ID NO: 9 та 10.

5 [00011] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису специфічно зв'язується з CD37, причому зазначене антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить SEQ ID NO:9.

[00012] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису специфічно зв'язується з CD37, причому зазначене антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить SEQ ID NO:10.

10 [00013] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису отримують за рекомбінантним способом. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент є мишачим, відмінним від людського, гуманізованим, химерним або людським. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент має змінену поверхню. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент являє собою повнорозмірне антитіло. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент являє собою антиген-зв'язуючий фрагмент. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, одноланцюговий Fv або scFv, стабілізований дисульфідним зв'язком Fv, домен V-NAR, IgNar, інтраантитіло, IgGΔCH₂, мініантитіло, F(ab')₃, тетратіло, триатіло, діатіло, одномономерне антитіло, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂ або scFv-Fc. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить Fab, Fab', F(ab')₂, одноланцюговий Fv або scFv, стабілізований дисульфідним зв'язком Fv, інтраантитіло, IgGΔCH₂, мініантитіло, F(ab')₃, тетратіло, триатіло, діатіло, DVD-Ig, mAb₂, (scFv)₂ або scFv-Fc.

15 [00014] У іншому варіанті реалізації антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент продукується клітиною. У іншому варіанті реалізації зазначена клітина виділена. У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб одержання антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, який включає (а) культивування клітини та (b) виділення антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту з культивованої клітини.

30 [00015] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з CD37 людини зі значенням K_d, що становить від приблизно 0,5 до приблизно 10 нМ. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з CD37 людини зі значенням K_d, що становить 1,0 нМ, або краще.

35 [00016] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з поліпептидом, який містить, який по суті складається з або який складається з амінокислот 107-242 CD37 (SEQ ID NO:20). У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з поліпептидом, який містить, який по суті складається з або який складається з амінокислот 107-235 CD37 (SEQ ID NO:19). У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з послідовністю, представленою SEQ ID NO:15. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з послідовністю, представленою SEQ ID NO:16. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з послідовністю, представленою SEQ ID NO:17. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з поліпептидом, який містить амінокислоти 107-242 CD37 (SEQ ID NO:20), але не зв'язується з поліпептидом, який складається з амінокислот 138-235 CD37. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з поліпептидом, який містить амінокислоти 107-235 CD37 (SEQ ID NO:19), але не зв'язується з поліпептидом, який складається з амінокислот 138-235 CD37.

45 [00017] У іншому варіанті реалізації антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного винаходу зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:15, але не зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:18. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:16, але не зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:18. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:17, але не зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:18. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язується з щонайменше однією амінокислотою з амінокислот 110-137 CD37.

50 [00018] У іншому варіанті реалізації афінність зв'язування антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту вимірюють за допомогою протокової цитометрії, Біасоре, імуноферментного аналізу (ELISA) або радіоімуноаналізу.

[00019] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент має виявлювану мітку. У іншому варіанті реалізації мітка вибрана з групи, яка складається з імунофлуоресцентної мітки, хемілюмінесцентної мітки, фосфоресціуючої мітки, ферментної мітки, радіоактивної мітки, авідину/біотину, частинки колоїдного золота, забарвленої частинки та магнітної частинки.

[00020] У іншому варіанті реалізації запропонована композиція, яка містить антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент та буфер, вибраний з групи, яка складається з буферу для імуногістохімії (ІГХ), буферу для імуноферментного аналізу (ELISA) та буферу для аналізу методом сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS).

[00021] У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб виявлення експресії CD37 у зразку, який включає приведення зазначеного зразку у контакт з антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом або композицією відповідно до даного опису. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент має виявлювану мітку. У іншому варіанті реалізації мітка вибрана з групи, яка складається з імунофлуоресцентної мітки, хемілюмінесцентної мітки, фосфоресціуючої мітки, ферментної мітки, радіоактивної мітки, авідину/біотину, частинки колоїдного золота, забарвленої частинки та магнітної частинки. У іншому варіанті реалізації мітка являє собою ферментну мітку.

[00022] У іншому варіанті реалізації експресію CD37 визначають за допомогою радіоімуноаналізу, аналізу методом вестерн-блоттингу, цитометрії, імунофлуоресцентного аналізу, імуноферментного аналізу, імунопреципітаційного аналізу, хемілюмінесцентного аналізу або імуногістохімічного аналізу. У іншому варіанті реалізації експресію CD37 визначають за допомогою імуногістохімічного аналізу.

[00023] У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб підвищення ефективності лікування раку із застосуванням терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який включає введення зазначеного терапевтично активного агенту суб'єкту, що має рак, при якому у зразку раку від зазначеного суб'єкта із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції відповідно до даного опису була виявлена підвищена експресія CD37.

[00024] У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб ідентифікації раку, який, можливо, може реагувати на терапевтично активний агент, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який включає: (а) приведення біологічного зразку, що містить клітини зазначеного раку, у контакт з антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом або композицією; (б) виявлення зв'язування антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту з CD37 у біологічному зразку (а); (с) привласнення значення зв'язуванню, виявленому на стадії (б), де зазначене значення привласнюють на основі порівняння з одним або більше еталонними зразками; та (d) порівняння значення, отриманого на стадії (с), зі значенням для еталонної тканини або клітини, де значення для рівня CD37 зазначеного раку, яке перевищує значення для еталонного зразку з нормальною або низькою експресією CD37, або значення для рівня CD37 зазначеного раку, яке рівне або яке перевищує значення для еталонного зразку з високою експресією CD37, вказує на рак, який, ймовірно, може реагувати на антитіло до CD37.

[00025] У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб лікування пацієнта, що має рак, який включає: (а) визначення значення рівня експресії CD37 на основі виявлення експресії CD37 у зразку раку, отриманому від зазначеного пацієнта, де зазначене виявлення виконують із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції; та (б) введення терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо зазначене значення показує, що пацієнт отримає користь від введення терапевтично активного агенту.

[00026] У іншому варіанті реалізації спосіб лікування пацієнта, що має рак, включає: (а) визначення значення рівня експресії CD37 на основі виявлення експресії CD37 у зразку раку, отриманому від зазначеного пацієнта, де зазначене виявлення виконують із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції; та (б) інструктування особи, що надає медичні послуги, щодо введення терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо зазначене значення показує, що пацієнт отримає користь від введення терапевтично активного агенту.

[00027] У іншому варіанті реалізації спосіб лікування пацієнта, що має рак, включає: (а) надання зразку раку, отриманого від пацієнта, що має рак, для визначення значення рівня експресії CD37 на основі виявлення експресії CD37 із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції та (б) введення терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо зазначене

значення показує, що пацієнт отримає користь від введення терапевтично активного агенту.

[00028] У іншому варіанті реалізації спосіб лікування пацієнта, що має рак, включає: (а) виявлення експресії CD37 у зразку раку, отриманому від зазначеного пацієнта, виконане із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції; (b) визначення значення рівня експресії CD37 зразку раку та (c) введення терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, пацієнту, якщо зазначене значення показує, що пацієнт отримає користь від введення терапевтично активного агенту.

[00029] У іншому варіанті реалізації спосіб ідентифікації раку як чутливого до лікування із застосуванням активного агенту проти CD37 включає: (а) визначення рівня експресії CD37 у раковому зразку зазначеного раку із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції, яке включає застосування способу, який дозволяє виявити відмінності у інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування у експресуючому CD37 зразку раку у порівнянні з інтенсивністю зафарбовування або рівномірністю зафарбовування у одному або більше еталонних зразках; (b) визначення значення інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування CD37 для зазначеного зразку раку та (c) порівняння значення інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування CD37, визначеного на стадії (b), з відносним значенням, визначеним шляхом вимірювання експресії білку CD37 у щонайменше одному еталонному зразку, що являє собою зразок тканини, клітини або осаду клітин, який не є чутливим до лікування із застосуванням терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, та де значення інтенсивності зафарбовування CD37 для зазначеного зразку раку, визначене на стадії (b), яке перевищує зазначене відносне значення, ідентифікує зазначений рак як чутливий до лікування із застосуванням зазначеного терапевтично активного агенту.

[00030] У іншому варіанті реалізації спосіб ідентифікації раку як чутливого до лікування із застосуванням терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, включає: (а) визначення рівня експресії CD37 у раковому зразку зазначеного раку із застосуванням антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту або композиції, яке включає застосування способу, який дозволяє виявити відмінності у інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування у експресуючому CD37 зразку раку у порівнянні з інтенсивністю зафарбовування або рівномірністю зафарбовування у одному або більше еталонних зразків; (b) визначення значення інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування CD37 для зазначеного зразку раку та (c) порівняння значення інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування CD37, визначеного на стадії (b), з відносним значенням, визначеним шляхом вимірювання експресії білку CD37 у щонайменше одному еталонному зразку, що являє собою зразок тканини, клітини або осаду клітин, який є чутливим до лікування із застосуванням терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, та де значення інтенсивності зафарбовування CD37 для зазначеного зразку раку, визначене на стадії (b), яке перевищує або рівне зазначеному відносному значенню, ідентифікує зазначений рак як чутливий до лікування із застосуванням зазначеного терапевтично активного агенту.

[00031] У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб, який додатково включає введення терапевтично активного агенту, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, суб'єкту, від якого був отриманий зразок раку або біологічний зразок. У іншому варіанті реалізації рівень CD37 у пацієнта визначають у зразку раку або біологічному зразку, отриманому від зазначеного пацієнта. У іншому варіанті реалізації зразок раку або біологічний зразок являє собою рідкий екстракт, кров, плазму, сироватку, спинномозкову рідину, лімфатичну рідину або препарат селезінки. У іншому варіанті реалізації виявлення здійснюють за методом імуногістохімії (ІГХ). У іншому варіанті реалізації метод ІГХ являє собою калібрувальний метод ІГХ, який дозволяє відрізнити різні рівні експресії CD37. У іншому варіанті реалізації ІГХ забезпечує діапазон інтенсивності зафарбовування для зразків з низьким рівнем експресії CD37, середнім рівнем експресії CD37 або високим рівнем експресії CD37. У іншому варіанті реалізації ІГХ дозволяє виявити відмінності у інтенсивності зафарбовування або рівномірності зафарбовування у експресуючому CD37 зразку раку або біологічному зразку у порівнянні з еталонним зразком. У іншому варіанті реалізації ІГХ виконують вручну. У іншому варіанті реалізації ІГХ виконують з використанням автоматизованої системи. У іншому варіанті реалізації значення CD37 визначають на основі ІГХ. У іншому варіанті реалізації виявлення здійснюють за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA). У іншому варіанті реалізації еталонний зразок являє собою позитивний еталонний зразок або негативний еталонний зразок. У іншому варіанті реалізації еталонний зразок включає клітини, осади клітин або тканину.

[00032] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент додатково містить реагент для детекції, вибраний з групи, яка складається з імунофлуоресцентної мітки, хемілюмінесцентної мітки, фосфоресціуючої мітки, ферменту, радіоактивної мітки, авідину/біотину, частинки колоїдного золота, забарвленої частинки та магнітної частинки. У іншому варіанті реалізації реагент для детекції являє собою фермент.

[00033] У іншому варіанті реалізації рак являє собою CD37-позитивний рак. У іншому варіанті реалізації рак являє собою лейкоз або лімфому. У іншому варіанті реалізації рак вибраний з групи, яка складається з В-клітинних лімфом, НХЛ, В-клітинного лімфобластного лейкозу/лімфоми з клітин-попередників та новоутворень зі зрілих В-клітин, В-клітинного хронічного лімфоцитарного лейкозу (ХЛЛ)/лімфоми з невеликих лімфоцитів (ЛМЛ), В-клітинного пролімфоцитарного лейкозу, лімфоплазмочитарної лімфоми, мантийноклітинної лімфоми (МКЛ), фолікулярної лімфоми (ФЛ), ФЛ низького ступеню, середнього ступеню та високого ступеню, шкірної лімфоми з клітин фолікулярного центру, В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони, MALT-типу В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони, вузлового типу В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони, В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони селезінки, волосатоклітинного лейкозу, дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми (ДКВЛ), лімфоми Беркитта, плазмочитоми, плазмочітинної мієломи, посттрансплантаційного лімфопроліферативного захворювання, макроглобулінемії Вальденстрема та анапластичної великоклітинної лімфоми (АВКЛ). У іншому варіанті реалізації CD37-позитивний рак являє собою дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому або мантийноклітинну лімфому.

[00034] У іншому варіанті реалізації експресію CD37 виявляють із застосуванням щонайменше одного додаткового антитіла до CD37 або його антиген-зв'язуючого фрагменту. У іншому варіанті реалізації експресію CD37 вимірюють із застосуванням двох антитіл до CD37 або їх антиген-зв'язуючих фрагментів. У іншому варіанті реалізації щонайменше одно додаткове антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить агент для детекції. У іншому варіанті реалізації агент для детекції являє собою хромогенний агент для детекції, флуорогенний агент для детекції, ферментативний агент для детекції або електрохемілюмінесцентний агент для детекції. У іншому варіанті реалізації агент для детекції являє собою пероксидазу хрину (ПХ).

[00035] У іншому варіанті реалізації щонайменше одне додаткове антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язане/зв'язаний з твердим носієм. У іншому варіанті реалізації щонайменше одне додаткове антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язане/зв'язаний з планшетом для мікротитрування.

[00036] У іншому варіанті реалізації ELISA являє собою двошаровий "сендвіч" (sandwich) ELISA.

[00037] У іншому варіанті реалізації терапевтично активний агент містить антитіло до CD37 huCD37-3. У іншому варіанті реалізації терапевтично активний агент являє собою кон'югат антитіло-майтаниноїд, що містить антитіло до CD37 huCD37-3, мایتаниноїд DM1 та нерозщеплюваний N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)-циклогексан-карбоксилатний (SMCC) лінкер (IMGN529).

[00038] У іншому варіанті реалізації запропонований комбінований діагностичний та фармацевтичний набір, який містить антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент або композицію відповідно до даного опису для застосування для діагностики та терапевтично активний агент, що містить антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування для лікування.

[00039] У іншому варіанті реалізації антитіло для детекції дозволяє виявляти експресію CD37 за допомогою ІГХ. У іншому варіанті реалізації антитіло для детекції дозволяє виявляти експресію CD37 за допомогою ELISA.

[00040] У іншому варіанті реалізації антитіло до CD37 у терапевтично активному агенті кон'юговане з цитотоксином.

[00041] У іншому варіанті реалізації діагностичний набір відповідно до даного опису містить антитіло, його антиген-зв'язуючий фрагмент відповідно до даного опису, реагент для ІГХ та один або більше стандартизованих еталонних зразків, що включають клітини, осад клітин або фіксовані у формаліні та залиті парафіном зразки тканини, та при цьому один або більше стандартизованих еталонних зразків отримані з не-експресуючих CD37, у низькому ступені експресуючих CD37 або у високому ступені експресуючих CD37 клітин, осадів клітин або тканин.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ/ФІГУР

[00042] На Фіг. 1А та 1В представлені результати скринінгу методом ELISA для антитіл, отриманих шляхом імунізації мишей із застосуванням білку hCD37-LEL (великої позаклітинної

петлі) (SEQ ID NO:15), що містить амінокислоти з 107 по 242 CD37 людини, злитого з гістидиновою міткою (His-tag). На Фіг. 1A показано, що супернатант клону 1B11 гібридами зв'язується з різними варіантами антигену CD37, hCD37-LEL, hCD37-Fc-LAGA (LAGA відноситься до мутацій Fc G236A та P238A), SEQ ID NO:17, що містять амінокислоти з 107 по 235 CD37 людини, злитими з доменом Fc IgG1 людини) та hCD37-ECD-Fc (позаклітинний домен, SEQ ID NO:16, що містить амінокислоти з 107 по 235 CD37 людини, злитий з доменом Fc IgG2a миші) як у нативних, так і у денатуруючих умовах. На Фіг. 1B показано, що супернатанти двох субклонів гібридами, 1B11-2 та 1B11-20, зв'язуються з hCD37-Fc-LAGA та hCD37-LEL як у нативних, так і у денатуруючих умовах.

[00043] На Фіг. 2 показано, що антитіло 1B11-2 зв'язується з нативними білками hCD37-Fc-LAGA та hCD37-LEL зі значно скороченою афінністю у порівнянні з еталонним антитілом до CD37, NCL-CD37 (клон CT1, Leica Biosystems).

[00044] На Фіг. 3 показано, що антитіло 1B11-2 зв'язується з денатурованим білком hCD37-LEL зі значно скороченою афінністю у порівнянні з NCL-CD37.

[00045] На Фіг. 4 показано, що антитіло 1B11-2 не зв'язується з процесованим білком hCD37-ECD-S2-Fc (S2 відноситься до другого сегменту великого позаклітинного домену CD37, що містить амінокислоти з 138 по 176, SEQ ID NO:18), тоді як NCL-CD37 зберігає здатність до зв'язування з цим білком CD37.

[00046] На Фіг. 5 показані імуногістохімічні зображення нормальної мигдалини людини, пофарбованої або моноклональним антитілом (MAT) миші NCL-CD37 (ліворуч), або MAT миші CD37 1B11-2 (праворуч). Стрілки вказують на зародкові центри, мантийні зони (і ті, і інші CD37-позитивні) та міжфолікулярні області (CD37-негативні), відповідно. Чорні стрілки вказують на зародкові центри; сірі стрілки вказують на мантийні зони (і ті, і інші CD37-позитивні), а незабарвлені стрілки вказують на міжфолікулярні області (CD37-негативні). При застосуванні антитіла NCL-CD37 фарбування ядер присутнє як у зародковому центрі, так і у мантийній зоні. При застосуванні антитіла 1B11-2 фарбування ядер відсутнє.

[00047] На Фіг. 6 показані імуногістохімічні зображення нормального тонкого кишечника людини (верхня панель) та нормальної підшлункової залози людини (нижня панель) із застосуванням або моноклонального антитіла (MAT) NCL-CD37 миші (ліва панель), або MAT 1B11-2 миші (права панель). Стрілками на панелях ліворуч позначене рожеве фарбування цитоплазми клітин Панета (верхня панель, позначене чорними стрілками) та острівкових клітин (нижня панель, позначене незабарвленими стрілками), отримане із застосуванням MAT NCL-CD37 миші. Стрілки на панелях праворуч показують, що при застосуванні антитіла 1B11-2 це фарбування не спостерігається у відповідних областях.

[00048] На Фіг. 7 показані імуногістохімічні зображення тканини пацієнта з дифузійною великоклітинною В-клітинною лімфомою (верхня панель) та тканини пацієнта з фолікулярною лімфомою (нижня панель), пофарбовані із застосуванням або MAT NCL-CD37 миші (ліва панель), або MAT 1B11-2 миші (права панель). Більш сильне, більш чітке фарбування спостерігається для обох типів раку при застосуванні MAT 1B11-2 миші.

[00049] На Фіг. 8 показані результати вестерн-блоттингу після електрофорезу у ДНС-ПААГ у денатуруючих умовах продуктів злиття Fc з антигенами позаклітинного домену (ECD) CD37, де наведене порівняння моноклонального антитіла 1B11-2 миші з моноклональним антитілом миші до CD37 (Leica), що поставляється на ринок. Маркери молекулярної маси у кілодальтонах (кД) показані у вихідному вигляді та у вигляді схематичного зображення праворуч.

[00050] На Фіг. 9 показані результати вестерн-блоттингу після електрофорезу у ПААГ у нативних умовах продуктів злиття Fc з антигенами позаклітинного домену (ECD) CD37, що виявляються із застосуванням моноклонального антитіла 1B11-2 миші.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[00051] У даному описі запропоновані способи виявлення CD37 людини. Ці способи дозволяють ідентифікувати ракові захворювання, що характеризуються експресією CD37, для поліпшення ефективності лікування із застосуванням націлених на CD37 терапевтичних засобів. Способи виявлення можуть бути використані для розділення пацієнтів на групи, контролю або визначення терапевтичної ефективності або визначення ймовірності того, що рак буде реагувати на націлений на CD37 терапевтичний засіб. Способи виявлення дозволяють виявляти клінічно значимий динамічний діапазон CD37. Також розкриті нові поліпептиди, що зв'язуються з CD37, такі як антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти, придатні для застосування у способах виявлення (наприклад, імуногістохімічному (ІГХ) аналізі для CD37). Агент, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент), запропонований у даному описі, забезпечує можливість більш специфічного та вираженого фарбування без ядерного фону. Агент, що зв'язується з CD37, зв'язується з епітопом, який

містить одну або більше із амінокислот 110-137 CD37. Агент, що зв'язується з CD37, також зв'язується з поліпептидом, що містить амінокислоти 107-242 CD37 (SEQ ID NO:20), або з поліпептидом, що містить амінокислоти 107-235 CD37 (SEQ ID NO:19), але не зв'язується з поліпептидом, що складається із амінокислот 138-235 CD37. Також запропоновані споріднені поліпептиди та полінуклеотиди, композиції, що містять агенти, що зв'язуються з CD37, та способи одержання агентів, що зв'язуються з CD37.

I. Визначення

[00052] Для полегшення розуміння даного винаходу нижче визначений ряд термінів та фраз.

[00053] Термін "CD37" у контексті даного опису відноситься до будь-якого нативного CD37, якщо не зазначене інше. CD37 також відноситься до GP52-40, лейкоцитарного антигену CD37 та тетраспаніну-26. Термін "CD37" охоплює "повнорозмірний" непроцесований CD37, а також будь-яку форму CD37, яка утворюється у результаті процесингу у клітині. Зазначений термін також охоплює природні варіанти CD37, наприклад, варіанти сплайсингу, алельні варіанти та ізоформи. Поліпептиди CD37, описані у даному описі, можуть бути виділені з безлічі джерел, таких як біологічні зразки людини, або з іншого джерела або отримані за рекомбінантними або синтетичними способами.

[00054] Термін "підвищена експресія" або "надекспресія" CD37 відноситься до зразку, який демонструє підвищені рівні експресії CD37. CD37 може бути підвищений або надекспресований у порівнянні з негативним контролем або контролем з низьким вмістом CD37 або у порівнянні зі зразком здорової або неуразеної тканини або клітин того ж типу. Така підвищена експресія або надекспресія може бути викликана, наприклад, мутацією, ампліфікацією гену, посиленою транскрипцією, посиленою трансляцією або підвищеною стабільністю білку.

[00055] У одному прикладі експресію CD37 вимірюють за допомогою імуногістохімії (ІГХ) та визначення значення інтенсивності зафарбовування або значення рівномірності зафарбовування шляхом порівняння з каліброваними контролями, що мають встановлені значення (наприклад, досліджуваному зразку привласнюють значення інтенсивності, рівне 3, якщо його інтенсивність порівнянна з каліброваним контролем рівня 3, або досліджуваному зразку привласнюють значення інтенсивності, рівне 2, якщо його інтенсивність порівнянна з каліброваним контролем рівня 2). Рівномірність зафарбовування, яка є гетерогенною або гомогенною, також свідчить про збільшення експресії CD37. Значення інтенсивності зафарбовування та рівномірності зафарбовування можуть бути застосовані окремо або у комбінації (наприклад, 2 гомо, 2 гетеро, 3 гомо, 3 гетеро і т.д.). У іншому прикладі підвищення експресії CD37 може бути визначене за допомогою виявлення підвищення щонайменше у 2 рази, щонайменше у 3 рази або щонайменше у 5 разів по відношенню до контрольних значень (наприклад, рівень експресії у біологічному зразку, тканині або клітині від суб'єкта, що не має раку або що має рак, не характеризується підвищеними значеннями CD37). У іншому прикладі експресії CD37 привласнюють Н-значення. Н-значення поєднують значення інтенсивності зафарбовування зі значеннями рівномірності з використанням розрахунку, запропонованого у даному описі. У іншому прикладі експресію CD37 вимірюють шляхом визначення процентного вмісту клітин, які мають щонайменше конкретний рівень зафарбовування (наприклад, щонайменше 25% клітин мають значення, що становить щонайменше 2, або щонайменше 75% клітин мають значення, що становить щонайменше 2).

[00056] "Еталонний зразок" може бути застосований для зіставлення та порівняння результатів, отриманих за способами, запропонованими у даному описі, з досліджуваним зразком. Еталонні зразки можуть являти собою клітини (наприклад, лінії клітин, осадки клітин) або тканину. Рівні CD37 у "еталонному зразку" можуть являти собою абсолютну або відносну кількість, діапазон кількостей, мінімальну та/або максимальну кількість, середню кількість та/або медіанну кількість CD37. Діагностичні способи, запропоновані у даному описі, включають порівняння рівнів експресії CD37 у досліджуваному зразку з "еталонним значенням". У деяких варіантах реалізації еталонне значення являє собою рівень експресії CD37 у еталонному зразку. Еталонне значення може являти собою попередньо задане значення, а також може бути визначене за допомогою еталонних зразків (наприклад, контрольних біологічних зразків або еталонних зразків), досліджуваних паралельно з досліджуваними зразками. Еталонне значення може являти собою індивідуальний поріг відсікання, такий як медіана або середнє, або діапазон значень, такий як довірчий інтервал. Еталонні значення можуть бути попередньо встановлені для різних підгруп осіб, таких як особи, схильні до раку, особи, що мають рак ранньої або пізньої стадії, особи чоловічої та/або жіночої статі або особи, які проходили терапії раку. Приклади негативних еталонних зразків або значень та позитивних еталонних зразків або значень описані у даному описі.

[00057] У деяких варіантах реалізації еталонний зразок являє собою зразок зі здорової тканини, зокрема, відповідну тканину, не уражену раком, або відповідну тканину, не уражену раком, що характеризується надекспресією CD37. Ці типи еталонних зразків називають негативними контрольними зразками або еталонними зразками. У інших варіантах реалізації еталонний зразок являє собою зразок з пухлини, яка експресує CD37. Ці типи еталонних зразків згадуються як позитивні контрольні зразки. Позитивні контрольні зразки також можуть бути використані у якості порівняльного індикатора типу (гетеро або гомо), ступеню (0, 1, 2, 3) інтенсивності зафарбовування, Н-значення та/або процентного вмісту клітин, що мають щонайменше конкретний рівень зафарбовування, який корелює з рівнем експресії CD37. Позитивні контрольні порівняльні зразки згадуються як калібровані еталонні зразки. Еталонні зразки з низьким рівнем або відсутністю CD37 описані у прикладах у даному описі та також включають червону пульпу селезінки (наприклад, моноцити та червоні клітини крові), Т-клітини та міжфолікулярну область мигдалин людини. Експресуючі CD37 еталонні зразки описані у прикладах у даному описі та також включають білу пульпу селезінки (наприклад, В-лімфоцити та маргінальну зону селезінки), зародковий центр мигдалин людини та мантийну зону мигдалин людини. Приклади неекспресуючих ліній клітин включають клітини 300-19, а приклади експресуючих ліній клітин включають В-клітини Дауді (Daudi), Ramos, Намальви (Namalwa) та неходжкінської лімфоми RL. Іншим позитивним еталонним зразком з високим рівнем CD37 є лінія клітин, стабільно або тимчасово трансфікована CD37 (наприклад, 300.19/CD37, як описано у опублікованій заявці США № 2015/0093397 та публікації PCT WO 2013/149171, кожна з яких включена у даний опис за допомогою посилання). Відповідні позитивні та негативні еталонні рівні CD37 для конкретного раку можуть бути визначені шляхом вимірювання рівнів CD37 у одного або більш підходящих суб'єктів, та такі еталонні рівні можуть бути адаптовані до конкретних груп суб'єктів (наприклад, еталонний рівень може бути зіставлений з віком так, що можуть бути проведені порівняння між рівнями CD37 у зразках від суб'єктів певного віку та еталонними рівнями для конкретного перебігу захворювання, фенотипу або їх відсутності у певній віковій групі).

[00058] У контексті даного опису "імуногістохімія" відноситься до гістохімічних та імунологічних способів, використовуваних для аналізу, наприклад, клітин або тканин. Таким чином, терміни "імуногістохімія", "імуноцитохімія" та "імунохімія" використовуються взаємозамінно.

[00059] "Зразок" або "біологічний зразок" згідно із даним винаходом має біологічне походження, у конкретних варіантах реалізації, таке як походження від еукаріотичних організмів. У деяких варіантах реалізації зразок являє собою зразок від людини, але зразки від тварин також можуть бути використані у практиці згідно із даним винаходом. Необмежуючі джерела зразку для застосування у контексті даного винаходу включають, наприклад, солідні тканини, аспірати біопсій, рідкі екстракти, кров, плазму, сироватку, спинномозкову рідину, лімфатичну рідину, зовнішні зрізи шкіри, дихальних, кишкових та сечостатевої шляхів, слюзи, слину, молоко, пухлини, органи, культури клітин та/або компоненти культур клітин. "Зразок раку (раковий зразок)" являє собою зразок, який містить ракову клітину. Способи, запропоновані у даному описі, можуть бути придатні для застосування для зразків солідної тканини, де кількість доступного матеріалу є невеликою. Способи, запропоновані у даному описі, можуть бути застосовані для дослідження аспекту експресії CD37 або стану зразку, включаючи, але не обмежуючись ними, порівняння різних типів клітин або тканин та виявлення або визначення наявності та/або типу захворювання або відхилення від норми.

[00060] Для цілей даного опису "зріз" зразку тканини відноситься до окремої частини або фрагменту зразку тканини, наприклад, тонкого шару тканини або клітин, вирізаних зі зразку тканини. Зрозуміло, що безліч зрізів зразків тканини може бути взята та піддана аналізу відповідно до даного винаходу. У деяких випадках обрана частина або зріз тканини містить гомогенну популяцію клітин. У інших випадках обрана частина містить область тканини, наприклад, просвіт як необмежуючий приклад. Обрана частина може бути невеликою, як одна клітина або дві клітини, або може являти собою, наприклад, багато тисяч клітин. У більшості випадків збір клітин важливий, та хоча даний винахід був описаний для застосування при виявленні клітинних компонентів, спосіб може також бути застосований для виявлення неклітинних компонентів організму (наприклад, розчинних компонентів у крові як необмежуючий приклад).

[00061] У контексті даного опису термін "захоплюючий реагент" відноситься до реагенту, здатного зв'язувати та захоплювати молекулу-мішень у зразку таким чином, що за підходящих умов комплекс захоплюючий реагент – молекула-мішень може бути відділений від іншої частини зразку. У одному з варіантів реалізації захоплюючий реагент іммобілізований. У одному

з варіантів реалізації захоплюючий реагент у сендвіч-імуноаналізі являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент або суміш різних антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів до цільового антигену.

[00062] У контексті даного опису термін "виявлюване" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відноситься до антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, яке/який може бути виявлене(ий) або безпосередньо через мітку, посилену за допомогою засобу виявлення, або опосередковано за допомогою, наприклад, іншого антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, що є міченим. Для прямого мічення антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент звичайно кон'югують із фрагментом, який може бути виявлений яким-небудь засобом. У одному з варіантів реалізації виявлюване антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент являє собою біотинільоване антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

[00063] У контексті даного опису термін "засіб виявлення" відноситься до фрагменту або методики, використовуваних для виявлення присутності виявлюваного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту та включає агенти для детекції, які підсилюють іммобілізовану мітку, таку як мітка, іммобілізована на планшеті для мікротитрування. У одному з варіантів реалізації засіб виявлення являє собою флуориметричний агент для детекції, такий як авідин або стрептавідин.

[00064] Звичайно "сендвіч-ELISA" включає наступні стадії: (1) планшет для мікротитрування покривають захоплюючим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом; (2) додають зразок, та будь-який присутній антиген зв'язується із захоплюючим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом; (3) додають антитіло для детекції або його антиген-зв'язуючий фрагмент, яке/який зв'язується з антигеном; (4) додають пов'язане з ферментом вторинне антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, яке/який зв'язується з антитілом для детекції або його антиген-зв'язуючим фрагментом та (5) додають субстрат, який конвертується ферментом у виявлювану форму.

[00065] Термін "мітка" у контексті даного опису відноситься до виявлюваної сполуки або композиції, безпосередньо або опосередковано кон'югованих з антитілом з одержанням "міченого" антитіла. Мітка може бути виявлюваною сама по собі (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або, у випадку ферментної мітки, може каталізувати хімічну зміну субстратної сполуки або композиції, яка є виявлюваною.

[00066] Під термінами "корелювати" або "що корелює" мається на увазі порівняння будь-яким способом характеристики та/або результатів першого аналізу з характеристикою та/або результатами другого аналізу. Наприклад, можна використовувати результати першого аналізу при проведенні другого аналізу та/або можна використовувати результати першого аналізу для визначення, чи повинен виконуватися другий аналіз, та/або можна порівнювати результати першого аналізу з результатами другого аналізу. У одному з варіантів реалізації підвищена експресія CD37 корелює з підвищеною ймовірністю ефективності націленої на CD37 протиракової терапії.

[00067] Термін "антитіло" означає молекулу імуноглобуліну, яка розпізнає та специфічно зв'язується з мішенню, такою як білок, поліпептид, пептид, вуглевод, полінуклеотид, ліпід або комбінації зазначеного, за допомогою щонайменше одного сайту розпізнавання антигену у межах варіабельної області молекули імуноглобуліну. У контексті даного опису термін "антитіло" охоплює інтактні поліклональні антитіла, інтактні моноклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла, такі як біспецифічні антитіла, отримані із щонайменше двох інтактних антитіл, химерні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла людини, химерні білки, що містять антитіло, та будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну за умови, що зазначені антитіла проявляють бажану біологічну активність. Антитіло може належати до будь-якого з п'яти основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM або їх підкласів (ізотипів) (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2), основаних на ідентичності константних доменів їх важких ланцюгів, позначуваних альфа, дельта, епсилон, гама та мію, відповідно. Різні класи імуноглобулінів мають різні та добре відомі структури субодиниць та тривимірні конфігурації. Антитіла можуть бути некон'югованими або кон'югованими з іншими молекулами, такими як токсини, радіоізотопи і т.д.

[00068] Термін "фрагмент антитіла" відноситься до частини інтактного антитіла. "Антиген-зв'язуючий фрагмент" відноситься до частини інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном. Антиген-зв'язуючий фрагмент може містити варіабельні області інтактного антитіла, відповідні до антигену. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ та Fv, лінійні антитіла та одноланцюгові антитіла. Приклади фрагментів антитіл, охоплюваних терміном "антиген-зв'язуючий фрагмент" антитіла, включають (без обмеження): (i) фрагмент Fab, моновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL

та CH1 (наприклад, антитіло, що розщеплюється папаїном з утворенням трьох фрагментів: двох антиген-зв'язуючих фрагментів Fab та одного фрагменту Fc, який не зв'язує антиген); (ii) фрагмент F(ab')₂, бівалентний фрагмент, що містить два фрагменти Fab, з'єднані дисульфідним містком у шарнірній області (наприклад, антитіло, що розщеплюється пепсином з утворенням двох фрагментів: бівалентного антиген-зв'язуючого фрагменту F(ab')₂ та фрагменту pFc', який не зв'язує антиген) та споріднену до нього моновалентну одиницю F(ab'); (iii) фрагмент Fd, що складається з доменів VH та CH1 (тобто та частина важкого ланцюгу, яка включена у Fab); (iv) фрагмент Fv, що складається з доменів VL та VH одного плеча антитіла, та споріднений стабілізований дисульфідним зв'язком Fv та (v) фрагмент dAb (доменне антитіло) або sdAb (однодоменне антитіло) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), який складається з домену VH.

[00069] У деяких варіантах реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент являє собою неприродне антитіло. У деяких варіантах реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент одержують очищенням із природних компонентів. У деяких варіантах реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент одержують за рекомбінантним способом. У деяких варіантах реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент одержують за допомогою гібридоми.

[00070] "Блокувальне" антитіло або "антитіло-антагоніст" являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність пов'язаного з ним антигену, такого як CD37. У конкретному варіанті реалізації блокувальні антитіла або антитіла-антагоністи у значній мірі або повністю інгібують біологічну активність антигену. Краще, щоб біологічна активність знижувалася на 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% або навіть 100%.

[00071] Термін "антитіло до CD37" або "антитіло, яке зв'язується з CD37" відноситься до антитіла, здатного зв'язуватися з CD37 з достатньою афінністю, таким чином, що зазначене антитіло придатне для застосування у якості діагностичного та/або терапевтичного агенту при націлюванні на CD37. Ступінь зв'язування антитіла до CD37 зі стороннім білком, що не є CD37, становить менше приблизно 10% від ступеня зв'язування антитіла з CD37, як виміряно, наприклад, за допомогою радіоімунаналізу (RIA). У деяких варіантах реалізації антитіло, яке зв'язується з CD37, характеризується константою дисоціації (Kd) ≤1 мкМ, ≤100 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ або ≤0,1 нМ. Приклади антитіл до CD37 відомі у даній галузі техніки та розкриті, наприклад, у опублікованій заявці США № 2011/0256153, яка включена у даний опис за допомогою посилання.

[00072] "Моноклональне" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відноситься до гомогенної популяції антитіл або антиген-зв'язуючих фрагментів, залученої у високоспецифічне розпізнавання та зв'язування однієї антигенної детермінанти або епітопу. Це відрізняє їх від поліклональних антитіл, які звичайно включають різні антитіла, спрямовані проти різних антигенних детермінант. Термін "моноклональне" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент охоплює інтактні та повнорозмірні моноклональні антитіла, а також фрагменти антитіл (такі як Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноланцюгові (scFv) мутанти, химерні білки, що містять ділянку антитіла, та будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну, що містить сайт розпізнавання антигену. Крім того, "моноклональне" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відноситься до таких антитіл та їх антиген-зв'язуючих фрагментів, отриманих за будь-якою кількістю способів, включаючи, але не обмежуючись ними, гібридому, фаговий дисплей, експресію рекомбінантних генів та використання трансгенних тварин.

[00073] Термін "гуманізоване" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент відноситься до форм антитіл або антиген-зв'язуючих фрагментів, що не є людськими (наприклад, мишачих), які являють собою специфічні ланцюги імуноглобулінів, химерні імуноглобуліни або їх фрагменти, які містять мінімальні послідовності, що не є людськими (наприклад, мишачі). Як правило, гуманізовані антитіла або їх антиген-зв'язуючі фрагменти являють собою імуноглобуліни людини, у яких залишки у ділянках, що визначають комплементарність (CDR), замінені залишками CDR інших видів, відмінних від людини, (наприклад, миші, щура, кролика, хом'яка), що мають бажану специфічність, афінність та зв'язуючу здатність (Jones et al., 1986, Nature, 321: 522-525, Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323-327, Verhoeyen et al., 1988, Science, 239: 1534-1536). У деяких випадках залишки каркасної ділянки Fv (FR) імуноглобуліну людини замінені відповідними залишками антитіла або фрагмента від інших видів, відмінних від людини, які мають бажану специфічність, афінність та зв'язуючу здатність. Гуманізоване антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент можуть бути додатково модифіковані за допомогою заміщення додаткових залишків або у каркасній ділянці Fv, або/та залишків із числа заміщених, що не є людськими, для корекції та оптимізації специфічності, афінності та/або зв'язуючої здатності антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту. У цілому гуманізоване антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент буде містити по суті усі із щонайменше одного,

а як правило двох або трьох варіабельних доменів, що містять усі або по суті усі ділянки CDR, які відповідають імуноглобуліну, що не є людським, тоді як усі або по суті усі ділянки FR являють собою ділянки FR консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент можуть також містити щонайменше частину константної області або домену (Fc) імуноглобуліну, як правило імуноглобуліну людини. Приклади способів, використовуваних для одержання гуманізованих антитіл, описані у патентах США 5225539 або 5639641.

[00074] Термін "первинне" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент у даному описі відноситься до антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, яке/який специфічно зв'язується із цільовим білковим антигеном у зразку. Первинне антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент як правило є першим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, використовуваним при виконанні імуногістохімічного аналізу. У одному з варіантів реалізації первинне антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент є єдиним антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, використовуваним при виконанні імуногістохімічного аналізу. Термін "вторинне" антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент у даному описі відноситься до антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, яке/який специфічно зв'язується з первинним антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, утворюючи у такий спосіб місток між первинним антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом та наступним реагентом, якщо такий є. Вторинне антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент як правило є другим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, використовуваним при виконанні імуногістохімічного аналізу. Термін "третинне" антитіло у даному описі відноситься до антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, яке/який специфічно зв'язується із вторинним антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, утворюючи у такий спосіб місток між вторинним антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом та наступним реагентом, якщо такий є.

[00075] "Варіабельна область" антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту відноситься до варіабельної області легкого ланцюгу антитіла або варіабельної області важкого ланцюгу антитіла як окремо, так і у комбінації. Варіабельні області важкого та легкого ланцюгу складаються кожна із чотирьох каркасних ділянок (FR), з'єднаних трьома ділянками, що визначають комплементарність (CDR), також відомими як гіперваріабельні області. Ділянки CDR у кожному ланцюзі містяться разом у безпосередній близькості від ділянок FR та разом з ділянками CDR іншого ланцюгу сприяють утворенню антиген-зв'язуючого сайту антитіла. Існує щонайменше два способи визначення ділянок CDR: (1) підхід, оснований на міжвидовій мінливості послідовностей (наприклад, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); та (2) підхід, оснований на кристалографічних дослідженнях комплексів антиген-антитіло (Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Крім цього у даній галузі техніки для визначення CDR іноді використовують комбінації цих двох підходів.

[00076] Систему нумерації Кабата звичайно використовують при вказівці залишків у варіабельному домені (залишки приблизно 1-107 легкого ланцюгу та залишки приблизно 1-113 важкого ланцюгу) (наприклад, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[00077] Нумерація положення амінокислоти за Кабатом відноситься до системи нумерації, використовуваної для варіабельних доменів важкого ланцюгу або варіабельних доменів легкого ланцюгу у складі антитіла, описаних у джерелі Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При використанні цієї системи нумерації фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу кількість амінокислот або додаткові амінокислоти відповідно до вкорочення або вставки у ділянках FR або CDR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюгу може включати одну амінокислотну вставку (залишок 52a за Кабатом) після залишку 52 у H2 та вставлені залишки (наприклад, залишки 82a, 82b та 82c і т.д. за Кабатом) після залишку 82 FR важкого ланцюгу. Нумерація залишків за Кабатом для даного антитіла може бути визначена за допомогою порівняння у областях гомології послідовності антитіла зі "стандартною" послідовністю, пронумерованою за Кабатом. Замість цього Чотіа вказує на розташування структурних петель (Chothia та Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Кінець петлі CDR-H1 за Чотіа при нумерації з використанням нумерації за Кабатом варіюється між H32 та H34 залежно від довжини петлі (це відбувається тому, що схема нумерації за Кабатом поміщає вставки у положеннях H35A та H35B; якщо ні 35A, ні 35B не присутні, тоді цикл закінчується на положенні 32, якщо є присутнім тільки 35A, цикл закінчується на положенні 33; якщо присутні і 35A, і 35B, тоді цикл закінчується на положенні 34). Гіперваріабельні області згідно AbM

являють собою компроміс між CDR за Кабатом та структурними петлями за Чотіа та використовуються програмою моделювання антитіл Oxford Molecular's AbM.

Петля	Кабат	AbM	Чотіа
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34 (Нумерація за Кабатом)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32 (Нумерація за Чотіа)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

5 [00078] Термін антитіло людини ("людське" антитіло) або його антиген-зв'язуючий фрагмент означає антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, які продукуються людиною, або антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що мають амінокислотну послідовність, що відповідає антитілу або його антиген-зв'язуючому фрагменту, який продукується людиною, отримані із застосуванням будь-якого способу, відомого у даній галузі техніки. Це визначення антитіла людини або його антиген-зв'язуючого фрагменту включає інтактні або повнорозмірні антитіла, їх фрагменти.

10 [00079] Термін "химерні" антитіла або їх антиген-зв'язуючі фрагменти відноситься до антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів, у яких амінокислотна послідовність отримана від двох або більше видів. Як правило, варіабельна область як легкого, так і важкого ланцюгів відповідає варіабельній області антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів з бажаною специфічністю, афінністю та зв'язуючою здатністю, отриманих від одного виду ссавців (наприклад, миші, щура, кролика і т.д.), тоді як константні області гомологічні послідовностям у антитілах або їх антиген-зв'язуючих фрагментах, отриманих від іншого виду (звичайно людини), щоб уникнути виникнення імунної відповіді у цих видів.

20 [00080] Терміни "епітоп" або "антигенна детермінанта" використовуються у даному описі взаємозамінно та відносяться до тієї частини антигену, яка може бути розпізнана та специфічно зв'язана конкретним антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У випадку, коли антиген є поліпептидом, епітопи можуть бути утворені як суміжними амінокислотами, так і несуміжними амінокислотами, що зближуються при укладанні білку у третинну структуру.

25 Епітопи, утворені із суміжних амінокислот, звичайно зберігаються при денатурації білку, тоді як епітопи, утворені при укладанні білку у третинну структуру, звичайно губляться при денатурації білку. Епітоп звичайно включає щонайменше 3, а як правило щонайменше 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

30 [00081] "Афінність зв'язування" у цілому відноситься до міцності сумарної кількості нековалентних взаємодій між окремо взятим сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) та партнером, що зв'язується з нею (наприклад, антигеном). Якщо не зазначене інше, у контексті даного опису "афінність зв'язування" відноситься до власної афінності зв'язування, яка відбувається взаємодію між членами пари, що зв'язується (наприклад, антитілом та антигеном) у співвідношенні 1:1. Афінність молекули X відносно її партнера Y звичайно може бути охарактеризована константою дисоціації (Kd). Афінність може бути виміряна за звичайними способами, відомими у даній галузі техніки, включаючи описані у даному описі. Низькоафінні антитіла, як правило, повільно зв'язуються з антигеном та схильні легко дисоціювати, тоді як високоафінні антитіла, як правило, зв'язуються з антигеном швидше та схильні довше залишатися зв'язаними. У даній галузі техніки відомі різні способи вимірювання афінності зв'язування, будь-який з яких може бути застосований для цілей даного винаходу. Конкретні ілюстративні варіанти реалізації описані нижче.

35 [00082] "Або краще" у контексті даного опису у відношенні афінності зв'язування відноситься до більш сильного зв'язування між молекулою та партнером, що зв'язуються з нею. "Або краще" у контексті даного опису відноситься до більш сильного зв'язування, що характеризується меншим чисельним значенням Kd. Наприклад, для антитіла, яке має афінність до антигену "0,6 нМ або краще", афінність антитіла до антигену становить <0,6 нМ, тобто 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ і т.д. або будь-яке значення менше 0,6 нМ.

45 [00083] Фраза "по суті подібний" або "по суті такий же" у контексті даного опису означає досить високий ступінь подібності між двома числовими значеннями (як правило, одне пов'язане з антитілом згідно із даним винаходом, а інше пов'язане з еталонним

50

антитілом/антитілом порівняння), таким чином, що фахівцеві у даній галузі техніки було б зрозуміло, що різниця між цими двома значеннями має малу біологічну та/або статистичну значимість або взагалі не має біологічної та/або статистичної значимості у контексті біологічних характеристик, обумовлених зазначеними значеннями (наприклад, значення Kd). Різниця між зазначеними двома значеннями становить менше приблизно 50%, менше приблизно 40%, менше приблизно 30%, менше приблизно 20% або менше приблизно 10% залежно від значення для еталонного антитіла/антитіла порівняння.

[00084] "Виділені" поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітина або композиція являють собою поліпептид, антитіло, полінуклеотид, вектор, клітину або композицію, які знаходяться у формі, не виявленій у природі. Виділені поліпептиди, антитіла, полінуклеотиди, вектори, клітина або композиції включають ті, які були очищені настільки, що вони більше не знаходяться у формі, у якій вони виявляються у природі. У деяких варіантах реалізації виділені антитіло, полінуклеотид, вектор, клітина або композиція є по суті чистими.

[00085] У контексті даного опису "по суті чиста" відноситься до речовини, яка є щонайменше на 50% чистою (тобто вільною від домішок), щонайменше на 90% чистою, щонайменше на 95% чистою, щонайменше на 98% чистою або щонайменше на 99% чистою.

[00086] Термін "імунокон'югат" або "кон'югат" у контексті даного опису відноситься до сполуки або її похідної, яка зв'язана з агентом, що зв'язується із клітиною (тобто антитілом до CD37 або його антиген-зв'язуючим фрагментом) та визначена загальною формулою: C-L-A, де C = цитотоксин, L = лінкер та A = клітинний зв'язуючий агент, антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент. Імунокон'югати також можуть бути визначені загальною формулою у зворотному порядку: A-L-C.

[00087] "Лінкер" являє собою будь-який хімічний фрагмент, здатний зв'язувати сполуку, звичайно лікарський засіб, такий як майтанзиноїд, з агентом, що зв'язується із клітиною, таким як антитіло до CD37 або його фрагмент, стабільним, ковалентним чином. Лінкери можуть бути піддані або бути по суті стійкими до розщеплення, індукованого кислотою, світлоіндукованого розщеплення, розщеплення, викликаного пептидазою, розщеплення, викликаного естеразою та розщеплення дисульфідного зв'язку в умовах, при яких сполука або антитіло залишається активною(им). Підходящі лінкери добре відомі у даній галузі техніки та включають, наприклад, дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотонестійкі групи, фотолабільні групи, нестійкі до пептидази групи та нестійкі до естерази групи. Лінкери також включають заряджені лінкери та їх гідрофільні форми, як описано у даному описі та відомо у даній галузі техніки.

[00088] Терміни "рак" та "раковий" відносяться до фізіологічного стану у ссавців, при якому популяція клітин характеризується нерегульованим ростом клітин, або описують такий стан. Приклади раку включають, але не обмежуються ними, карциному, лімфому, бластому, саркому та лейкоз. Більш конкретні приклади "раку" або "туморогенних" захворювань включають В-клітинні лімфоми, включаючи НХЛ, В-клітинний лімфобластний лейкоз/лімфому із клітин-попередників та новоутворення зі зрілих В-клітин, такі як В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ)/лімфома з малих лімфоцитів (ЛМЛ), В-клітинний пролімфоцитарний лейкоз, лімфоплазмоцитарна лімфома, мантіноклітинна лімфома (МКЛ), фолікулярна лімфома (ФЛ), включаючи ФЛ низького ступеню, середнього ступеню та високого ступеня, шкірна лімфома із клітин фолікулярного центру, В-клітинна лімфома із клітин маргінальної зони (MALT-типу, вузлового типу та лімфома селезінки), волосатоклітинний лейкоз, дифузійна велиоклітинна В-клітинна лімфома (ДКВЛ), лімфома Беркітта (БЛ), плазмоцитома, плазмоклітинна міелома, посттрансплантаційне лімфопроліферативне захворювання та анапластична велиоклітинна лімфома (АВКЛ). У деяких варіантах реалізації зазначений рак являє собою лейкоз або лімфому.

[00089] "Пухлина" та "новоутворення" відносяться до будь-якого утворення, який являють собою результат надлишкового росту або проліферації клітин, або доброякісних (неракових), або злоякісних (ракових), включаючи передракові ураження.

[00090] Терміни "ракова клітина", "клітина пухлини" та граматичні еквіваленти відносяться до загальної популяції клітин, отриманих з пухлини або передракового ураження, включаючи як нетуморогенні клітини, які становлять основну масу популяції клітин пухлини, так і туморогенні стовбурові клітини (ракові стовбурові клітини). У контексті даного опису до терміну "клітина пухлини" буде доданий термін "нетуморогенна", коли він відноситься винятково до тих клітин пухлини, які позбавлені здатності до відновлення та диференціювання, щоб відрізнити ці клітини пухлини від ракових стовбурових клітин.

[00091] Термін "суб'єкт" відноситься до будь-якої тварини (наприклад, ссавця), включаючи, але не обмежуючись ними, людей, приматів, що не є людиною, гризунів і т.п., які повинні бути реципієнтами конкретного лікування. Як правило, терміни "суб'єкт" та "пацієнт"

використовуються взаємозамінно у даному описі відносно людини.

[00092] "Хіміотерапевтичний агент" являє собою хімічна сполука, придатна для застосування для лікування раку, незалежно від механізму дії. Класи хіміотерапевтичних агентів включають, але не обмежуються ними, алкілюючі агенти, антиметаболіти, алкалоїди рослин – "веретенні отрути", цитотоксичні/протипухлинні антибіотики, інгібітори топоізомерази, антитіла, фотосенсибілізатори та інгібітори кінази. Хіміотерапевтичні агенти включають сполуки, застосовувані у "націленій терапії" та традиційній хіміотерапії.

[00093] Введення "у комбінації з" одним або більше додатковими терапевтичними агентами включає одночасне (спільне) та послідовне введення у будь-якому порядку.

[00094] Термін "фармацевтичний склад" відноситься до препарату, який знаходиться у такій формі, щоб забезпечити ефективну біологічну активність активного інгредієнта, і який не містить додаткових компонентів, неприйнятно токсичних для суб'єкта, якому препарат буде введений. Такий склад може бути стерильним.

[00095] "Ефективна кількість" антитіла, його антиген-зв'язуючого фрагменту або імунокон'югату, розкритих у даному описі, являє собою кількість, достатню для досягнення конкретно заявленої мети. "Ефективна кількість" може бути визначена емпірично та у звичайному порядку відносно до заявленої мети.

[00096] Термін "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості антитіла, його антиген-зв'язуючого фрагменту або іншого лікарського засобу, ефективного для "лікування" захворювання або розладу у суб'єкта або ссавця. У випадку раку терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може знижувати кількість ракових клітин; зменшувати розмір пухлини; пригнічувати (тобто певною мірою уповільнювати та у певному варіанті реалізації зупиняти) інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи; пригнічувати (тобто певною мірою уповільнювати та у певному варіанті реалізації зупиняти) метастазування пухлини; певною мірою пригнічувати ріст пухлини; певною мірою ослабляти один або більше симптомів, пов'язаних з раком; та/або приводити до позитивної відповіді, такої як підвищена виживаність без прогресування (PFS), безрецидивна виживаність (DFS) або загальна виживаність (OS), повна відповідь (CR), часткова відповідь (PR) або, у деяких випадках, стабільне захворювання (SD), зниження прогресування захворювання (PD), скорочення часу до прогресування (TTP) або будь-якої їх комбінації. Див. визначення "лікування" у даному описі. Залежно від того ступеню, у якому лікарський засіб може запобігати росту та/або знищувати існуючі ракові клітини, він може бути цитостатичним та/або цитотоксичним. У деяких варіантах реалізації виявлення підвищених рівнів CD37 дозволяє вводити зменшені кількості націленого на CD37 терапевтичного засобу для досягнення того ж терапевтичного ефекту, що і при більш високих дозах. "Профілактично ефективна кількість" відноситься до кількості, ефективної у дозах та протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного профілактичного результату. Звичайно, але необов'язково, оскільки профілактичну дозу використовують у суб'єктів до початку захворювання або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість буде менше терапевтично ефективної кількості.

[00097] Термін "позитивно відповідати" у цілому відноситься до обумовлювання сприятливого стану у суб'єкта. Відносно лікування раку цей термін відноситься до створення терапевтичного впливу на суб'єкта. Позитивні терапевтичні ефекти при раку можуть бути виміряні за декількома способами (Див. W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Наприклад, пригнічення росту пухлини, експресія молекулярного маркера, експресія сироваткового маркера та методи молекулярної візуалізації можуть бути застосовані для оцінки терапевтичної ефективності протиракового терапевтичного засобу. Відносно пригнічення росту пухлини у відповідності зі стандартами NCI T/C $\leq 42\%$ відповідає мінімальному рівню протипухлинної активності. T/C $< 10\%$ вважається високим рівнем протипухлинної активності, де T/C (%) = середній об'єм пухлини у випадку лікування / середній об'єм пухлини у контролі $\times 100$. Позитивна відповідь може бути виражена, наприклад, у підвищеній виживаності без прогресування (PFS), безрецидивній виживаності (DFS) або загальній виживаності (OS), повній відповіді (CR), частковій відповіді (PR) або, у деяких випадках, стабільному захворюванні (SD), зниженні прогресування захворювання (PD), скороченні часу до прогресування (TTP) або будь-якій їх комбінації.

[00098] PFS, DFS та OS можуть бути виміряні згідно зі стандартами, встановленим Національним інститутом раку та Настановою щодо контролю над харчовими продуктами та лікарськими засобами США для затвердження нових лікарських засобів. Див. Johnson et al, (2003) J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

[00099] "Виживаність без прогресування" (PFS) відноситься до періоду часу від реєстрації до прогресування захворювання або смерті. Для пацієнтів із НХЛ PFS може бути виміряна з

використанням стандартів, представлених у переглянутих критеріях оцінки результатів лікування злоякісних лімфом Міжнародного проекту щодо гармонізації (Cheson et al, J Clin Oncol. 25:579-86 (2007), який включений у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті). Для пацієнтів із ХЛЛ PFS може бути виміряна з використанням стандартів, представлених Міжнародною робочою групою за критеріями відповіді ХЛЛ Національного інституту раку (Hallek et al, Blood, 111:5446-56 (2008), який включений у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті). Для пацієнтів з лімфомою Ходжкіна та неходжкінською лімфомою PFS може бути виміряна з використанням стандартів класифікації Лугано (Cheson et al, J Clin Oncol. 32:3059-68 (2014)). У цілому виживаність без прогресування відноситься до ситуації, коли пацієнт залишається живим без погіршення перебігу розвитку раку.

[000100] "Час до прогресування пухлини" (TTP) визначають як період часу від реєстрації до прогресування захворювання. Для пацієнтів із НХЛ TTP може бути виміряна з використанням стандартів, представлених у переглянутих критеріях оцінки результатів лікування злоякісних лімфом Міжнародного проекту щодо гармонізації (Cheson et al, J Clin Oncol. 25:579-86 (2007), включений у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті). Для пацієнтів із ХЛЛ TTP може бути виміряна з використанням стандартів, представлених Міжнародною робочою групою за критеріями відповіді ХЛЛ Національного інституту раку (Hallek et al, Blood, 111:5446-56 (2008), включений у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті). Для пацієнтів з лімфомою Ходжкіна та неходжкінською лімфомою PFS може бути виміряна з використанням стандартів класифікації Лугано (Cheson et al, J Clin Oncol. 32:3059-68 (2014)).

[000101] "Повна відповідь" або "повна ремісія" або "CR" вказує на зникнення усіх ознак пухлини або раку у відповідь на лікування. Це не завжди означає, що рак був виликаний.

[000102] "Часткова відповідь" або "PR" відноситься до зменшення розміру або об'єму однієї або більше пухлин або уражень або поширення раку у організмі у відповідь на лікування.

[000103] "Стабільне захворювання" відноситься до захворювання без прогресування або рецидиву. При стабільному захворюванні не спостерігається достатнього зменшення розміру пухлини, щоб відповідати критеріям часткової відповіді або достатнього збільшення розміру пухлини, щоб відповідати критеріям прогресування захворювання.

[000104] "Прогресування захворювання" відноситься до появи ще одного нового ураження або пухлини та/або однозначного прогресування існуючих уражень, що не є мішенню. Прогресування захворювання також може відноситися до росту пухлини більш ніж на 20 відсотків з моменту початку лікування внаслідок або збільшення маси, або поширення пухлини.

[000105] "Безрецидивна виживаність" (DFS) відноситься до періоду часу у процесі та після лікування, протягом якого у пацієнта не проявляються ознаки захворювання.

[000106] "Загальна виживаність" (OS) відноситься до періоду часу від реєстрації пацієнта до смерті або дати останньої явки. OS включає збільшення тривалості життя у порівнянні з контрольними людьми або людьми, що не одержували лікування, або пацієнтами. Загальна виживаність відноситься до ситуації, коли пацієнт залишається живим протягом певного періоду часу, такого як рік, п'ять років і т.д., наприклад, із часу постановки діагнозу або лікування.

[000107] Такі терміни як "проведення лікування" або "лікування" або "лікувати" або "полегшення" або "полегшувати" відносяться до терапевтичних заходів, які виликають, уповільнюють, послабляють симптоми та/або зупиняють прогресування діагностованого патологічного стану або розладу. Таким чином, ті, хто потребує лікування, включають тих, у кого вже діагностовано або підозрюється розлад. У деяких варіантах реалізації суб'єкта успішно "виліковують" від раку у відповідності зі способами згідно із даним винаходом, якщо пацієнт демонструє одне або більше із наступного: зменшення кількості або повна відсутність ракових клітин; зменшення розміру пухлини; пригнічення або відсутність інфільтрації ракових клітин у периферичні органи, включаючи, наприклад, поширення раку у м'які тканини та кістки; пригнічення або відсутність метастазування пухлини; пригнічення або відсутність росту пухлини; полегшення одного або декількох симптомів, пов'язаних з конкретним раком; зниження захворюваності та смертності; поліпшення якості життя; зменшення туморогенності, частоти туморогенних станів або туморогенної здатності пухлини; зменшення числа або частоти зустрічальності ракових стовбурових клітин у пухлині; диференціювання клітин пухлини у нетуморогенний стан; підвищена виживаність без прогресування (PFS), безрецидивна виживаність (DFS) або загальна виживаність (OS), повна відповідь (CR), часткова відповідь (PR), стабільне захворювання (SD), зниження прогресування захворювання (PD), скорочення часу до прогресування (TTP) або будь-яку їхню комбінацію.

[000108] Профілактичні або попереджувальні заходи відносяться до терапевтичних заходів, які запобігають та/або уповільнюють розвиток цільового патологічного стану або розладу. Таким

чином, ті, хто потребує профілактичних або попереджувачих заходів, включають тих, хто схильні до розладу, і тих, у кого розлад підлягає запобіганню.

[000109] У контексті даного опису термін "особа, що надає медичні послуги" відноситься до окремих осіб або установ, які безпосередньо взаємодіють із живими суб'єктами, наприклад, пацієнтами, що є людьми, та здійснюють вплив. Необмежуючі приклади осіб, що надають медичні послуги, включають лікарів, медсестер, лаборантів, терапевтів, фармацевтів, консультантів, практиків альтернативної медицини, медичні установи, кабінети лікарів, лікарні, відділення невідкладної допомоги, клініки, центри невідкладної допомоги, клініки/установи альтернативної медицини та будь-які інші організації, що надають загальне та/або спеціалізоване лікування, спостереження, підтримку, терапію, засіб для лікування та/або рекомендації, що стосуються всіх або будь-якої частини стану здоров'я пацієнта, включаючи, але не обмежуючись ними, загальні медичні, спеціалізовані медичні, хірургічні та/або будь-який інший вид лікування, спостереження, підтримки, терапії, лікування та/або рекомендацій.

[000110] У деяких аспектах особа, що надає медичні послуги, може здійснювати вплив або інструктувати іншу особу, що надає медичні послуги, щодо здійснення терапії для лікування раку. "Здійснення" терапії у контексті даного опису включає призначення терапії суб'єктові, а також доставку, застосування або надання терапії суб'єктові. Особа, що надає медичні послуги, може забезпечити виконання або доручити іншій особі, що надає медичні послуги, або пацієнтові виконати наступні дії: одержати зразок, обробити зразок, надати зразок, отримати зразок, передати зразок, проаналізувати або виміряти зразок, кількісно оцінити зразок, надати результати, отримані після аналізу/вимірювання/ кількісної оцінки зразку, одержати результати, отримані після аналізу/вимірювання/ кількісної оцінки зразку, зрівняти/оцінити результати, отримані після аналізу/вимірювання/ кількісної оцінки одного або більше зразків, забезпечити порівняння/оцінку одного або більше зразків, одержати порівняння/оцінку одного або більше зразків, призначити терапію або терапевтичний агент (наприклад, CD37-зв'язуючий агент), почати застосування терапії, припинити застосування терапії, продовжити застосування терапії, тимчасово перервати застосування терапії, збільшити кількість терапевтичного агенту, що вводиться, зменшити кількість терапевтичного агенту, що вводиться, продовжити введення кількості терапевтичного агенту, що вводиться, підвищити частоту введення терапевтичного агенту, знизити частоту введення терапевтичного агенту, підтримувати ту ж частоту введення терапевтичного агенту, замінити терапію або терапевтичний агент щонайменше іншою терапією або терапевтичним агентом, об'єднати терапію або терапевтичний агент із щонайменше іншою терапією або додатковим терапевтичним агентом. Ці дії можуть бути виконані особою, що надає медичні послуги, автоматично з використанням комп'ютеризованого способу (наприклад, через веб-службу або автономну комп'ютерну систему).

[000111] Терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота", взаємозамінно використовувані у даному описі, відносяться до полімерів нуклеотидів будь-якої довжини та включають ДНК та РНК. Нуклеотиди можуть являти собою дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди, модифіковані нуклеотиди або основи та/або їх аналоги або будь-який субстрат, який може бути включений у полімер ДНК- або РНК-полімеразаю. Полінуклеотид може містити модифіковані нуклеотиди, такі як метильовані нуклеотиди та їх аналоги. Модифікація, якщо така є присутньою, може бути введена у структуру нуклеотиду до або після складання полімеру. Послідовність нуклеотидів може бути перервана ненуклеотидними компонентами. Полінуклеотид може бути додатково модифікований після полімеризації, наприклад, шляхом кон'югації з міченим компонентом. Інші типи модифікацій включають, наприклад, "кепи" (caps), заміщення одного або більше природних нуклеотидів аналогами, міжнуклеотидні модифікації, такі як, наприклад, модифікації з незарядженими зв'язками (наприклад, метилфосфонати, фосфотриєфіри, фосфоамідати, карбамати і т.д.) та зарядженими зв'язками (наприклад, фосфоротіоати, фосфородитіоати і т.д.), що містять кінцеві фрагменти, такі як, наприклад, білки (наприклад, нуклеази, токсини, антитіла, сигнальні пептиди, полі-l-лізин і т.д.), з інтеркаляторами (наприклад, акридин, псорален і т.д.), що містять хелатори (наприклад, метали, радіоактивні метали, бор, метали-окиснювачі і т.д.), що містять алкілюючі агенти, з модифікованими зв'язками (наприклад, альфа-аномерні нуклеїнові кислоти і т.д.), а також немодифіковані форми полінуклеотиду (полінуклеотидів). Додатково кожна з гідроксильних груп, звичайно присутніх у цукрах, може бути заміщена, наприклад, фосфонатними групами, фосфатними групами, захищена стандартними захисними групами або активована для одержання додаткових зв'язків з додатковими нуклеотидами або може бути кон'югована із твердими носіями. 5'- та 3'-кінець ОН можуть бути фосфорильовані або заміщені амінами або фрагментами органічних кепуючих груп, що містять від 1 до 20 атомів вуглецю. Інші гідроксили також можуть бути дериватизовані до стандартних захисних груп. Полінуклеотиди також можуть містити аналоги цукрів – похідних

рибози або дезоксирибози, які звичайно відомі у даній галузі техніки, включаючи, наприклад, 2'-О-метил-, 2'-О-аліл-, 2'-фтор- або 2'-азидо-рибозу, карбоциклічні аналоги цукрів, альфа-аномерні цукри, епімерні цукри, такі як арабіноза, ксилози або ліксози, піранозні цукри, фуранозні цукри, седогептулози, ациклічні аналоги та аналоги нуклеозидів, позбавлені азотистих основ, такі як метилприбозид. Один або більше фосфодієфірних зв'язків можуть бути замінені альтернативними сполучними групами. Ці альтернативні сполучні групи включають, але не обмежуються ними, варіанти реалізації, де фосфат замінений на P(O)S ("тіоат"), P(S)S ("дитіоат"), (O)NR₂ ("амідат"), P(O)R, P(O)OR', CO або CH₂ ("формацеталь"), у яких кожен R або R' незалежно являє собою H або заміщений або незаміщений алкіл (1-20 C), що необов'язково містить простий ефірний (--O--) зв'язок, арил, алкеніл, циклоалкіл, циклоалкеніл або аральдил. Не всі зв'язки у полінуклеотиді повинні бути однаковими. Попередній опис відноситься до всіх полінуклеотидів, що згадуються у даному описі, включаючи РНК та ДНК.

[000112] Термін "вектор" означає конструкцію, яка здатна доставляти та експресувати один/одну або більше необхідних генів або послідовностей у клітину хазяїна. Приклади векторів включають, але не обмежуються ними, вірусні вектори, вектори експресії депротеїнізованої ДНК або РНК, плазмідні, космідні або фагові вектори, вектори експресії ДНК або РНК, пов'язані з катіонними конденсуючими агентами, вектори експресії ДНК або РНК у ліпосомальних лікарських формах та деякі еукаріотичні клітини, такі як клітини-продуценти.

[000113] Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок" взаємозамінно використовують у даному описі для позначення полімерів амінокислот будь-якої довжини. Полімер може бути лінійним або розгалуженим, він може містити модифіковані амінокислоти та його ланцюг може включати неамінокислоти. Терміни також охоплюють полімер амінокислот, який був модифікований природнім шляхом або за допомогою втручання; наприклад, утворення дисульфідних зв'язків, глікозилювання, ліпідизації, ацетилювання, фосфорилювання або будь-яких інших маніпуляцій або модифікацій, таких як кон'югація з компонентом мітки. У визначення також включені, наприклад, поліпептиди, що містять один або більше аналогів амінокислоти (включаючи, наприклад, амінокислоти, що не зустрічаються у природі, і т.д.), а також інші модифікації, відомі у даній галузі техніки. Зрозуміло, що, оскільки поліпептиди згідно із даним винаходом ґрунтовані на антитілах, у деяких варіантах реалізації поліпептиди можуть зустрічатися у вигляді окремих ланцюгів або зв'язаних ланцюгів. У деяких варіантах реалізації поліпептид, пептид або білок є таким, що не зустрічається у природі. У деяких варіантах реалізації поліпептид, пептид або білок одержують очищенням із природних компонентів. У деяких варіантах реалізації поліпептид, пептид або білок одержують за рекомбінантним способом.

[000114] Терміни "ідентичний" або відсоток "ідентичності" у контексті двох або більш нуклеїнових кислот або поліпептидів відносяться до двох або більше послідовностей або підпослідовностей, які є однаковими або містять певний відсоток нуклеотидів або амінокислотних залишків, які є однаковими при порівнянні та вирівнюванні (та введенні пропусків, якщо необхідно) для максимальної відповідності без урахування яких-небудь консервативних амінокислотних замінів у контексті ідентичності послідовності. Відсоток ідентичності може бути визначений з використанням програмного забезпечення або алгоритмів для порівняння послідовностей або за допомогою візуального контролю. У даній галузі техніки відомі різні алгоритми та програмне забезпечення, які можуть бути використані для вирівнювання амінокислотних або нуклеотидних послідовностей. Одним з таких необмежувачих прикладів алгоритму вирівнювання послідовностей є алгоритм, описаний у джерелі Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268, модифікований у роботі Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877 та включений у програми NBLAST та XBLAST (Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). У деяких варіантах реалізації може бути застосована програма Gapped BLAST згідно з описом у джерелі Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Іншими загальнодоступними програмами, які можуть бути застосовані для вирівнювання послідовностей, є BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) або Megalign (DNASTAR). У деяких варіантах реалізації відсоток ідентичності двох нуклеотидних послідовностей визначають із використанням програми GAP, що входить у програмне забезпечення GCG (наприклад, з використанням матриці NWSgapdna.CMP та значення штрафу за пропуск, рівного 40, 50, 60, 70 або 90 та значення штрафу за продовження пропуску, рівного 1, 2, 3, 4, 5 або 6). У якості альтернативи у деяких варіантах реалізації програма GAP у складі пакета програм GCG, що включає алгоритм Нідлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), може бути використана для визначення відсотку ідентичності двох амінокислотних послідовностей (наприклад, з використанням матриці Blossum 62 або матриці PAM250 та значення штрафу за пропуск, рівного 16, 14, 12, 10, 8, 6 або 4 та значення штрафу за

продовження пропуску, рівного 1, 2, 3, 4, 5). У якості альтернативи у деяких варіантах реалізації відсоток ідентичності двох нуклеотидних або амінокислотних послідовностей визначають із використанням алгоритму Міллера-Маєрса (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Наприклад, відсоток ідентичності може бути визначений з використанням програми ALIGN (версія 2.0) та з використанням PAM120 з таблицею залишків, значенням штрафу за продовження пропуску, рівним 12, та значенням штрафу за пропуск, рівним 4. Підходящі параметри для максимального вирівнювання за допомогою конкретного програмного забезпечення для вирівнювання можуть бути визначені фахівцем у даній галузі техніки. У деяких варіантах реалізації використовують параметри за замовчуванням програмного забезпечення для вирівнювання. У деяких варіантах реалізації відсоток ідентичності "X" першої амінокислотної послідовності відносно другої амінокислотної послідовності розраховують як $100 \times (Y/Z)$, де Y являє собою число амінокислотних залишків, відзначених як ідентичні відповідності при вирівнюванні першої та другої послідовностей (відповідно до візуального контролю або конкретної програми вирівнювання послідовностей), а Z - загальна кількість залишків у другій послідовності. Якщо довжина першої послідовності перевищує довжину другої послідовності, відсоток ідентичності першої послідовності відносно другої послідовності буде більше, ніж відсоток ідентичності другої послідовності відносно першої послідовності.

[000115] У якості необмежуючого прикладу, наявність певного відсотку ідентичності послідовності конкретного полінуклеотиду (наприклад, щонайменше на 80% ідентичний, щонайменше на 85% ідентичний, щонайменше на 90% ідентичний, а у деяких варіантах реалізації щонайменше на 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичний) відносно еталонної послідовності у певних варіантах реалізації може бути визначене з використанням програми Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit використовує алгоритм локальної гомології згідно Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), для пошуку кращого сегмента гомології між двома послідовностями. При використанні програми Bestfit або будь-якої іншої програми для вирівнювання послідовностей для визначення того, чи є конкретна послідовність, наприклад, на 95% ідентичною еталонній послідовності згідно із даним винаходом, параметри встановлюють таким чином, що відсоток ідентичності обчислюється по всій довжині еталонної нуклеотидної послідовності та дозволені пропуски у гомології довжиною до 5% від загального числа нуклеотидів у еталонній послідовності.

[000116] У деяких варіантах реалізації дві нуклеїнові кислоти або два поліпептиди згідно із даним винаходом по суті ідентичні, тобто мають ідентичність нуклеотидів або амінокислотних залишків щонайменше 70%, щонайменше 75%, щонайменше 80%, щонайменше 85%, щонайменше 90%, а у деяких варіантах реалізації щонайменше 95%, 96%, 97%, 98%, 99% при порівнянні та вирівнюванні для максимальної відповідності, визначену з використанням алгоритму порівняння послідовностей або візуального контролю. У деяких варіантах реалізації ідентичність має місце у області послідовностей, яка має довжину щонайменше приблизно 10, приблизно 20, приблизно 40-60 залишків або будь-яке ціле значення між ними або у області з довжиною, що перевищує 60-80 залишків, щонайменше приблизно 90-100 залишків, або послідовності по суті ідентичні по всій довжині порівнюваних послідовностей, таких як, наприклад, кодуюча область нуклеотидної послідовності.

[000117] "Консервативна амінокислотна заміна" являє собою амінокислотну заміну, при якій один амінокислотний залишок замінений іншим амінокислотним залишком, що має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, що мають подібні бічні ланцюги, були визначені у даній галузі техніки, включаючи основні бічні ланцюги (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотні бічні ланцюги (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незаряджені полярні бічні ланцюги (наприклад, аспарагін, глутамін, серін, треонін, тирозин, цистеїн), неполярні бічні ланцюги (наприклад, гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалужені бічні ланцюги (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичні бічні ланцюги (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Наприклад, заміна фенілаланіну на тирозин є консервативною заміною. У деяких варіантах реалізації консервативні заміни у послідовностях поліпептидів та антитіл згідно із даним винаходом не скасовують зв'язування поліпептиду або антитіла, що містить амінокислотну послідовність, з антигеном (антигенами), тобто з CD37, з яким зв'язується поліпептид або антитіло. Способи ідентифікації нуклеотидних та амінокислотних консервативних замін, які не перешкоджають зв'язуванню антигену, добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) та Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[000118] У контексті даного опису та формули винаходу невизначені та визначені форми однини включають форми множини, якщо контекстом явно не продиктоване інше.

[000119] Зрозуміло, що у всіх випадках, коли варіанти реалізації описані у даному описі з використанням формулювання "що включає/що містить", також запропоновані інші аналогічні варіанти реалізації, описані у термінах "що складаються з" та/або "по суті, що складається з".

[000120] Термін "та/або" у даному описі, використовуваний у такій фразі як "А та/або В", призначений для включення "А та В", "А або В", "А" та "В". Аналогічно термін "та/або", використовуваний у такій фразі як "А, В та/або С", призначений для охоплення кожного з наступних варіантів реалізації: А, В та С; А, В або С; А або С; А або В; В або С; А та С; А та В; В та С; А (окремо); В (окремо) та С (окремо).

II. Агенти, що зв'язуються з CD37

[000121] У даному описі запропоновані агенти, які специфічно зв'язуються з CD37 людини. Ці агенти згадані у даному описі як "агенти, що зв'язуються з CD37". У деяких варіантах реалізації агенти, що зв'язуються з CD37, являють собою антитіла, їх антиген-зв'язуючі фрагменти, імунокон'югати або поліпептиди. Повнорозмірні амінокислотні послідовності для CD37 людини відомі у даній галузі техніки та також наведені у даному описі, як представлено SEQ ID NO:1, відповідно.

[000122] CD37 людини:

MSAQESCLSLIKYFLFVFNLFVFLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSFVGLAFVPLQIWSKVLAISGIFTM
GIALLGCVGALKELRCLLGLYFGMLLLLFATQITLILISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETA
ESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWQVLLIRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHL
ARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQKWLHNNLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCRNLDHVYNR
LARYR (SEQ ID NO:1)

[000123] Послідовність нуклеїнової кислоти CD37 людини:

atgtcagcccaggagagctgcctcagcctcatcaagctactctctctgtttcaacctctctctctcgcctcggcagcctgatctctcgtctc
gcatctggatcctcattgacaagaccagctcgtgtctctgtgggcttgccctcgtgcctctgcagatctgggtccaaagctcggccatctcagga
atcttcacatggtgcatgcctcctggtgtgtgtggggccctcaaggagctcgcctcctgggctgtatttgggatgctgctgctcctgttt
gccacacagatcacctgggaatcctcatctccactcagcgggcccagctggagcgaagctgcgggacgtcgtagagaaaaacatccaa
aagtacggcaccaaccccgaggagaccgcgccgagagagctgggactatgtgcagttccagctgcgctgctgctgctggcactaccg
caggactggttccaagtctcatcctgagaggtaacgggtcggagggcgaccgcgtgcctgctcctgctacaactgtcggcgaccaacga
ctccacaatcctagataaggtgatcttgcctcagctcagcaggcttgacacctggcggtccagacacagtgacagacatctgcgctgtccct
gcagagagccacatctaccgcgagggctgcgcgcaggccctcagaagtggctgcacaacaacctatttccatagtgggcatttgctggg
cgctcggcctactcagctcgggttcgatgcgtctcgtatctgtgcagaaacctggaccacgtctacaaccggctcgtcgtatccgt
(SEQ ID NO:2)

[000124] Таким чином, у деяких варіантах реалізації агенти, що зв'язуються з CD37, можуть специфічно зв'язуватися з епітопом, представленим SEQ ID NO:1, або з епітопом поліпептиду, що кодується SEQ ID NO:2.

[000125] Агенти, що зв'язуються з CD37, також включають агенти, що зв'язуються з CD37, з послідовностями антитіла 1B11-2, приведеними нижче.

muCD37-1B11-2 VH-CDR1

GYFMN (SEQ ID NO:3)

muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (Кабар)

RINPYNGDTFYNQKFKГ (SEQ ID NO:4)

muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (AbM)

RINPYNGDTF (SEQ ID NO:34)

muCD37-1B11-2 VH -CDR3

RGIVASSRFFDV (SEQ ID NO:5)

muCD37-1B11-2 VL-CDR1

KASQGVSNVD (SEQ ID NO:6)

muCD37-1B11-2 VL-CDR2

YASNRYT (SEQ ID NO:7)

muCD37-1B11-2 VL-CDR3

CHQDYTSPT (SEQ ID NO:8)

muCD37-1B11-2 варіабельна область важкого ланцюгу (VH)

EVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWWIQSHGKGLEWIGRINPYNGDTFYNQKFK
FKATLTVDKSSSTAHEMLLSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVWGAGTSVIVSS (SEQ ID NO:9)

muCD37-1B11-2 варіабельна область легкого ланцюгу (VL)

SIVMTQTPKFLVSAGDRVITCKASQGVSNVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGS

GYGTDFTFSISTVQAEDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:10)

muCD37-1B11-2 повнорозмірний важкий ланцюг (HC)

EVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMNWVIQSHGKGLEWIGRINPYNGDTFYNQKFK
FKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVWGAGTSVIVSSAKTTPPSVYPLA
PGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESPLYTLSSSVTVPSPPRSET
VTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPE
VQFSWFVDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKT
RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMINTNGSYFVYS
KLNQVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:11)

muCD37-1B11-2 повнорозмірний легкий ланцюг

SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQGVSNVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGS
GYGTDFTFSISTVQAEDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC
FLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS
TSPVKSFNREK (SEQ ID NO:12)

[000126] Агенти, що зв'язуються з CD37, включають агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять шість послідовностей CDR антитіла 1B11-2, представлених SEQ ID NO:3-8.

[000127] Молекули, що зв'язуються з CD37, можуть являти собою агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять ділянки CDR антитіла 1B11-2 (тобто SEQ ID NO: 3-8), які містять до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замінів на CDR. Молекули, що зв'язуються з CD37, можуть являти собою агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять ділянки CDR антитіла 1B11-2 (тобто SEQ ID NO: 3-8), які містять до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замінів. Молекули, що зв'язуються з CD37, можуть являти собою агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять (i) ділянки CDR, представлені SEQ ID NO: 3, 4, 6 та 7, які містять до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замінів на CDR та (ii) ділянки CDR, представлені SEQ ID NO: 5 та 8. Молекули, що зв'язуються з CD37, можуть являти собою агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять (i) ділянки CDR, представлені SEQ ID NO: 3, 4, 6 та 7, які містять до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замінів та (ii) ділянки CDR, представлені SEQ ID NO: 5 та 8. Молекули, що зв'язуються з CD37, можуть являти собою агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять (i) ділянки CDR, представлені SEQ ID NO: 3, 4 та 6-8, які містять до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замінів на CDR та (ii) ділянку CDR, представлену SEQ ID NO:5. Молекули, що зв'язуються з CD37, можуть являти собою агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які містять (i) ділянки CDR, представлені SEQ ID NO: 3, 4 та 6-8, які містять до чотирьох (тобто 0, 1, 2, 3 або 4) консервативних амінокислотних замінів та (ii) ділянку CDR, представлену SEQ ID NO:5.

[000128] Поліпептиди, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти можуть містити варіабельну область легкого ланцюгу, варіабельну область важкого ланцюгу або варіабельні області і легкого, і важкого ланцюгів антитіла 1B11-2. Також запропоновані поліпептиди, які містять (а) поліпептид, що має послідовність, щонайменше на 90% ідентичну SEQ ID NO:9 та/або (б) поліпептид, що має послідовність, щонайменше на 90% ідентичну SEQ ID NO:10. У деяких варіантах реалізації поліпептид являє собою антитіло та/або поліпептид, який специфічно зв'язується з CD37. У деяких варіантах реалізації поліпептид являє собою мишаче, химерне або гуманізоване антитіло, яке специфічно зв'язується з CD37. У деяких варіантах реалізації поліпептид, що має певний відсоток ідентичності послідовностям SEQ ID NO:9 або 10, відрізняється від SEQ ID NO:9 або 10 тільки наявністю консервативних амінокислотних замінів.

[000129] У деяких варіантах реалізації поліпептид, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюгу, що містить послідовність, щонайменше на 95% ідентичну SEQ ID NO:9. У деяких варіантах реалізації поліпептид, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюгу, що містить послідовність, щонайменше на 96% ідентичну SEQ ID NO:9. У деяких варіантах реалізації поліпептид, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюгу, що містить послідовність, щонайменше на 97% ідентичну SEQ ID NO:9. У деяких варіантах реалізації поліпептид, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюгу, що містить послідовність, щонайменше на 98% ідентичну SEQ ID NO:9. У деяких варіантах реалізації поліпептид, антитіло або його антиген-зв'язуючий

[000132] У деяких варіантах реалізації поліпептид, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюгу, що містить послідовність, представлену SEQ ID NO:9, та варіабельний домен легкого ланцюгу, що містить послідовність, представлену SEQ ID NO:10.

5 [000133] Поліпептиди можуть містити один з окремих легких ланцюгів або важких ланцюгів, описаних у даному описі. Антитіла та поліпептиди також можуть містити і легкий ланцюг, і важкий ланцюг. Послідовності легкого ланцюгу та важкого ланцюгу антитіла 1B11-2 представлені SEQ ID NO: 11 та 12.

10 [000134] Також запропоновані поліпептиди, які містять : (a) поліпептид, що має щонайменше приблизно 90% ідентичності послідовності SEQ ID NO:11, та/або (b) поліпептид, що має щонайменше приблизно 90% ідентичності послідовності SEQ ID NO:12. У деяких варіантах реалізації поліпептид містить поліпептид, що має щонайменше приблизно 95%, щонайменше приблизно 96%, щонайменше приблизно 97%, щонайменше приблизно 98% або щонайменше приблизно 99% ідентичності послідовності SEQ ID NO:11 або 12. Таким чином, у
15 деяких варіантах реалізації поліпептид містить (a) поліпептид, що має щонайменше приблизно 95% ідентичності послідовності SEQ ID NO:11, та/або (b) поліпептид, що має щонайменше приблизно 95% ідентичності послідовності SEQ ID NO:12. У деяких варіантах реалізації поліпептид містить (a) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO:11; та/або (b) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO:12.
20 У деяких варіантах реалізації поліпептид являє собою антитіло та/або поліпептид, який специфічно зв'язується CD37. У деяких варіантах реалізації поліпептид являє собою мишаче, химерне або гуманізоване антитіло, яке специфічно зв'язується з CD37. У деяких варіантах реалізації поліпептид, що має певний відсоток ідентичності послідовності SEQ ID NO:11 та/або 12, відрізняється від SEQ ID NO:11 та/або 12 тільки наявністю консервативних амінокислотних
25 замін. У деяких варіантах реалізації поліпептид, що має певний відсоток ідентичності послідовності SEQ ID NO:11 та/або 12, відрізняється від SEQ ID NO:11 та/або 12 тільки амінокислотами поза ділянок CDR. У деяких варіантах реалізації поліпептид, що має певний відсоток ідентичності послідовності SEQ ID NO:11 та/або 12, відрізняється від SEQ ID NO:11 та/або 12 тільки консервативними амінокислотними замінами поза ділянок CDR.

30 [000135] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з тим же епітопом, що і антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, які містять варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:9, та варіабельну область легкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:10. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується
35 з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) конкурентно інгібує зв'язування антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, що містить варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:9, та варіабельну область легкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:10, з CD37. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-
40 зв'язуючий фрагмент) конкурентно інгібує зв'язування антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, що містить варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:9, та варіабельну область легкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:10, з CD37, та зв'язується з епітопом, який перекривається, з епітопом, з яким зв'язується антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що містить
45 варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:9, та варіабельну область легкого ланцюгу, яка містить послідовність, представлену SEQ ID NO:10.

[000136] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з та/або не зв'язується з антигенними послідовностями CD37, приведеними нижче у даному описі.

50 Антигенні послідовності CD37

hCD37-LEL (підкреслені AK 107-242 CD37)

TMELLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETA A EESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI
LRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGL
QKWLHNNLSFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHHH (SEQ ID NO:15)

55 hCD37-ECD-Fc (підкреслені AK 107-235 hCD37)

GPEFLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETA A EESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI
LRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGL
QGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN
NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHGDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGTVRAPQ
60 VYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK

KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:16)

hCD37-Fc-LAGA (підкреслені AK 107-235 hCD37)

GPEFLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI
LRNGNGSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHYREGCAQGL
 5 QGSDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:17)

hCD37-ECD-S2-Fc (двічі підкреслені AK 107-109 hCD37 та підкреслені AK 138-235)

10 GPEFLISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGNGSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILD
KVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHYREGCAQGLQGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS
VFIFPPKIKDVLMLISLSPVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ
HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGFSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPED
IYVEWTNNKLTNLYKNTPEVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS
 15 RTPGK (SEQ ID NO:18)

hCD37 (AK 107-235)

LISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGN
GSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHYREGCAQGLQ
 (SEQ ID NO:19)

hCD37 (AK 107-242)

20 LISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGN
GSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHYREGCAQGLQKWL
HNNL (SEQ ID NO:20)

hCD37 (AK 107-109 та 138-235)

25 LISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGNGSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILP
QLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHYREGCAQGLQ (SEQ ID NO:21)

[000137] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з амінокислотами 107-242 CD37 (SEQ ID NO:20). У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з амінокислотами 107-235 CD37 (SEQ ID NO:19).

[000138] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з послідовністю, представленою SEQ ID NO:15. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з послідовністю, представленою SEQ ID NO:16. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з послідовністю, представленою SEQ ID NO:17.

[000139] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з амінокислотами 107-242 CD37 (SEQ ID NO:20), але не зв'язується з амінокислотами 138-235 CD37. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з амінокислотами 107-235 CD37 (SEQ ID NO:19), але не зв'язується з амінокислотами 138-235 CD37.

[000140] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:15, але не зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:18. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:16, але не зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:18. У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:17, але не зв'язується з поліпептидом, представленим SEQ ID NO:18.

[000141] У деяких варіантах реалізації агент, що зв'язується з CD37, (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) зв'язується з епітопом, який містить щонайменше одну амінокислоту з 110-137 SEQ ID NO:1. Амінокислоти 110-137 являють собою перший сегмент ("S1") більшого позаклітинного домену CD37.

[000142] Афіність або авідність антитіла до антигену може бути визначена експериментально із застосуванням будь-якого підходящого способу, добре відомого у даній галузі техніки, наприклад, проточної цитометрії, імуоферментного аналізу (ELISA) або радіоімуноаналізу (RIA) або кінетики (наприклад, аналіз BIACORE™). Можуть бути легко використані формати аналізу безпосереднього зв'язування, а також аналізу конкурентного

зв'язування. (Див., наприклад, Berzofsky, et al., Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992) та способи, описані у даному описі. Вимірювана афінність взаємодії антитіло-антиген може варіюватися при вимірюванні при різних умовах (наприклад, концентрація солі, pH, температура). Таким чином, вимірювання афінності та інших параметрів зв'язування антигену (наприклад, K_D або K_d , K_{on} , K_{off}) виконують зі стандартизованими розчинами антитіл та антигену та стандартизованим буфером, такими як відомі у даній галузі техніки та таким як буфер, описаний у даному описі.

[000143] У одному аспекті аналіз зв'язування може бути виконаний методом проточної цитометрії на клітинах, що експресують антиген CD37 на поверхні. Наприклад, CD37-позитивні клітини, такі як клітини 300-19, можуть бути інкубовані з різними концентраціями антитіл до CD37 з використанням 1×10^5 клітин на зразок у 100 мкл буферу для FACS (середовище RPMI-1640 з додаванням 2% нормальної сироватки козла).

[000144] Потім клітини можуть бути осаджені, промиті та інкубовані протягом 1 год з 100 мкл кон'югованого із флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) антитіла козла до IgG миші або антитіла козла до IgG людини (такого як, наприклад, одержуване від Jackson Laboratory, 6 мкг/мл у буфері для FACS). Потім клітини знову осаджують, промивають буфером для FACS та ресуспендують у 200 мкл фосфатно-сольового буферу (ФСБ), що містить 1% формальдегіду. Зразки можуть бути отримані, наприклад, з використанням проточного цитометру FACS Calibur із багатолунковим пробовідбірником HTS та проаналізовані з використанням CellQuest Pro (усі інструменти BD Biosciences, Сан-Дієго, США). Для кожного зразку середня інтенсивність флуоресценції FL1 (MFI) може бути експортована та нанесена на графік залежності від концентрації антитіла у напівлогарифмічному масштабі для одержання кривої зв'язування. Для кривих зв'язування будують сигмоїдальну криву залежності від дози, а значення EC_{50} обчислюють із використанням таких програм, як GraphPad Prism v4 з параметрами за замовчуванням (програмне забезпечення GraphPad, Сан-Дієго, Каліфорнія). Значення EC_{50} можуть бути використані у якості міри для уявної константи дисоціації " K_d " або " K_D " для кожного антитіла.

[000145] Моноклональні антитіла можуть бути отримані з використанням гібридомних методів, таких як методи, описані Kohler та Milstein (1975) Nature 256:495. При використанні гібридомного методу мишу, хом'яка або іншу підходящу тварину-хазяїна імунізують, щоб викликати вироблення лімфоцитами антитіл, які будуть специфічно зв'язуватися з імунізуючим антигеном. Лімфоцити також можуть бути імунізовані *in vitro*. Після імунізації лімфоцити виділяють та зливають із підходящою лінією клітин мієломи із застосуванням, наприклад, поліетиленгліколю, з утворенням клітин гібридами, які потім можуть бути відділені від незлитих лімфоцитів та клітин мієломи. Гібридами, які продукують моноклональні антитіла, специфічно спрямовані проти обраного антигену, як визначають, наприклад, шляхом імунопреципітації, імуноблоттингу або аналізу зв'язування *in vitro* (наприклад, радіоімуноаналізу (RIA); імуноферментного аналізу (ELISA)), потім можуть бути розмножені у культурі *in vitro* з використанням стандартних методів (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986), або *in vivo* у вигляді асцитних пухлин у тварини. Потім моноклональні антитіла можуть бути очищені з культурального середовища або асцитної рідини.

[000146] У якості альтернативи моноклональні антитіла також можуть бути отримані за способами з використанням рекомбінантної ДНК, як описано у патенті США 4816567. Полінуклеотиди, що кодують моноклональне антитіло, виділяють зі зрілих В-клітин або клітин гібридами, наприклад, за допомогою RT-PCR з використанням олігонуклеотидних праймерів, які специфічно ампліфікують гени, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла, а їх послідовність визначають із використанням загальноприйнятих методів. Виділені полінуклеотиди, що кодують важкі та легкі ланцюги, потім клонують у підходящі вектори експресії, які трансфікують у клітини-хазяї, такі як клітини E. coli, клітини COS мавпи, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які у інших випадках не продукують імуноглобуліновий білок, та моноклональні антитіла виробляються клітинами-хазяями. Також рекомбінантні моноклональні антитіла або їх фрагменти бажаних видів можуть бути виділені з бібліотек фагового дисплея, що експресують ділянки CDR бажаних видів, як описано (McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628 та Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[000147] Полінуклеотид (полінуклеотиди), що кодує моноклональне антитіло, може бути додатково модифікований за різними способами з використанням технології рекомбінантної ДНК для одержання альтернативних антитіл. У деяких варіантах реалізації константні домени важких та легких ланцюгів, наприклад, моноклонального антитіла миші, можуть бути замінені 1) на ті ж області, наприклад, антитіла людини для одержання химерного антитіла, або 2)

поліпептид неімуноглобулінової природи для одержання злитого антитіла. У деяких варіантах реалізації константні області усикають або видаляють для одержання бажаного фрагменту моноклонального антитіла. Для оптимізації специфічності, афінності і т.д. моноклонального антитіла можуть бути застосовані сайт-спрямований або високощільний мутагенез варіабельної області.

[000148] У деяких варіантах реалізації моноклональне антитіло до CD37 людини являє собою гуманізоване антитіло. У деяких варіантах реалізації зазначене гуманізоване антитіло являє собою антитіло зі зміненою поверхнею.

[000149] Антитіла людини можуть бути отримані безпосередньо з використанням різних методів, відомих у даній галузі техніки. Можуть бути отримані іморталізованні В-лімфоцити людини, які продукують антитіло, спрямоване проти цільового антигену, імунізовані *in vitro* або виділені від імунізованого особи. (див., наприклад, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 та патент США 5750373). Також антитіло людини може бути обране з фагової бібліотеки, у випадку якщо зазначена фагова бібліотека експресує антитіла людини, як описано, наприклад, у джерелах Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314, Sheets et al., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381, та Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Методи одержання та використання фагових бібліотек антитіл також описані у патентах США №№ 5969108, 6172197, 5885793, 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 та 7264963 та джерелі Rothe et al., 2007, *J. Mol. Bio.*, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018 (кожен з яких включений за допомогою посилання у свій повноті). Стратегії дозрівання афінності та стратегії перестановки ланцюгів (Marks et al., 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, включений за допомогою посилання у свій повноті) відомі у даній галузі техніки та можуть бути застосовані для одержання високоафінних антитіл людини.

[000150] Гуманізовані антитіла також можуть бути отримані у трансгенних мишах, що несуть локуси імуноглобуліну людини, здатних після імунізації продукувати повний спектр антитіл людини за відсутності вироблення ендогенного імуноглобуліну. Цей підхід описаний у патентах США 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 та 5661016.

[000151] У деяких варіантах реалізації запропонований фрагмент антитіла для, наприклад, підвищення проникнення у пухлину. Відомі різні способи для одержання фрагментів антитіл. Традиційно ці фрагменти одержують шляхом протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (наприклад, Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). У деяких варіантах реалізації фрагменти антитіл одержують рекомбінантним способом. Fab, Fv та scFv фрагменти антитіл можуть експресуватися та секретуватися *E. coli* або іншими клітинами-хазяями, забезпечуючи у такий спосіб можливість одержання більших кількостей цих фрагментів. Такі фрагменти антитіл також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл, обговорюваних вище. Фрагмент антитіла також може являти собою лінійні антитіла, як описано, наприклад, у патенті США 5641870, та може бути моноспецифічним або біспецифічним. Інші способи одержання фрагментів антитіл будуть очевидні фахівцям у даній галузі техніки.

[000152] Відповідно до даного винаходу, способи можуть бути адаптовані для одержання одноланцюгових антитіл, специфічних до CD37 (див. патент США № 4946778). Крім цього, способи можуть бути адаптовані для побудови бібліотек експресії Fab (Huse, et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)) для забезпечення швидкої та ефективної ідентифікації моноклональних фрагментів Fab з бажаною специфічністю до CD37 або їх похідних, фрагментів, аналогів або гомологів. Фрагменти антитіл можуть бути отримані за способами у даній галузі техніки, включаючи, але не обмежуючись ними: (a) фрагмент F(ab')₂, отриманий розщепленням молекули антитіла пепсином; (b) фрагмент Fab, отриманий шляхом відновлення дисульфідних містків фрагмента F(ab')₂, (c) фрагмент Fab, отриманий обробкою молекули антитіла папаїном та відновлюючим агентом та (d) фрагменти Fv.

[000153] Для цілей даного опису слід розуміти, що модифіковані антитіла можуть містити варіабельну область будь-якого типу, яка забезпечує зв'язування антитіла з поліпептидами CD37 людини. Щодо цього варіабельна область може містити область будь-якого типу ссавців або бути отримана з будь-якого типу ссавців. Таким чином, варіабельна область модифікованих антитіл може мати походження, наприклад, від людини, миші, приматів, що не є людиною (наприклад, яванських макак (*Macaca monkeys*), макак і т.д.), або вовків. У деяких варіантах реалізації як варіабельна, так і константна області модифікованих імуноглобулінів є людськими. У інших варіантах реалізації варіабельні області сумісних антитіл (звичайно отримані із джерела, відмінного від людини) можуть бути сконструйовані або спеціально адаптовані для поліпшення зв'язуючих властивостей молекули. У зв'язку із цим варіабельні області, придатні

для застосування у даному винаході, можуть бути гуманізовані або іншим способом змінені шляхом включення інших "імпортованих" амінокислотних послідовностей. У деяких варіантах реалізації варіабельні області модифікованих антитіл можуть бути відмінними від людських (наприклад, мишачими), а константні області модифікованих антитіл можуть бути людськими.

5 [000154] У деяких варіантах реалізації варіабельні домени як у важких, так і у легких ланцюгах змінено шляхом щонайменше часткової заміни однієї або більше ділянок CDR і, якщо необхідно, часткової заміни каркасної області та зміни послідовності. Хоча ділянки CDR можуть бути отримані з антитіла того ж класу або навіть підкласу, що і антитіло, з якого отримані каркасні області, припускають, що ділянки CDR будуть отримані з антитіла іншого класу та, можливо, з антитіла інших видів. Не завжди необхідно замінювати всі ділянки CDR на повні ділянки CDR з варіабельної області донора, щоб перенести антиген-зв'язуючу здатність одного варіабельного домену у інший. Скоріше, у деяких випадках необхідно перенести тільки ті залишки, які необхідні для підтримки активності сайту зв'язування антигену.

15 [000155] Незважаючи на зміни у варіабельній області, фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що модифіковані антитіла згідно із даним винаходом будуть містити антитіла (наприклад, повнорозмірні антитіла або їх імунореактивні фрагменти), у яких щонайменше частина одного або більше доменів константної області була вилучена або іншим способом змінена, щоб забезпечити бажані біохімічні характеристики. У деяких варіантах реалізації константна область модифікованих антитіл буде містити константну область людини. Модифікації константної області можуть включати вставки, делеції або заміни однієї або більше амінокислот у одному або більше доменах. Таким чином, модифіковані антитіла, розкриті у даному описі, можуть містити зміни або модифікації у одному або більше із трьох константних доменів важкого ланцюгу (CH1, CH2 або CH3) та/або константному домені легкого ланцюгу (CL). У деяких варіантах реалізації передбачаються модифіковані константні області, де один або більше доменів частково або повністю вилучені. У деяких варіантах реалізації модифіковані антитіла будуть містити конструкції з вилученим доменом або варіанти, де весь домен CH2 був вилучений (конструкції Δ CH2). У деяких варіантах реалізації відсутній домен константної області буде замінений коротким амінокислотним спейсером (наприклад, 10 залишків) який забезпечує деяку молекулярну гнучкість, звичайно забезпечувану відсутньою константною областю.

[000156] У деяких варіантах реалізації модифікації константної області можуть бути застосовані для видалення дисульфідних зв'язків або олігосахаридних фрагментів, що забезпечує поліпшене позиціонування внаслідок підвищення специфічності до антигену або гнучкості антитіла. Модифікації константної області можуть бути легко здійснені з використанням загальновідомих біохімічних способів або способів молекулярної інженерії у межах компетенції фахівця у даній галузі техніки.

[000157] Слід зазначити, що у деяких варіантах реалізації модифіковані антитіла можуть бути сконструйовані для злиття домену CH3 безпосередньо із шарнірною областю відповідних модифікованих антитіл. У інших конструкціях може бути бажане забезпечити наявність пептидного спейсера між шарнірною областю та модифікованими доменами CH2 та/або CH3. Наприклад, можуть бути експресовані сумісні конструкції, де зазначений домен CH2 був вилучений, а домен CH3, що залишився, (модифікований або немодифікований) приєднаний до шарнірної області за допомогою спейсера з 5-20 амінокислот. Такий спейсер може бути доданий, наприклад, щоб гарантувати, що регуляторні елементи константного домену залишаються вільними та доступними або що шарнірна область залишається гнучкою.

45 [000158] Даний опис додатково охоплює варіанти та еквіваленти, які по суті гомологічні мишачим, химерним, гуманізованим та людським антитілам або їх фрагментам, запропонованим у даному описі. Вони можуть включати, наприклад, мутації - консервативні заміни, тобто заміну однієї або більше амінокислот подібними амінокислотами. Наприклад, консервативна заміна відноситься до заміни однієї амінокислоти іншою у межах того ж загального класу, такої як, наприклад, однієї кислотої амінокислоти іншою кислотою амінокислотою, однієї основної амінокислоти іншою основною амінокислотою або однієї нейтральної амінокислоти іншої нейтральною амінокислотою. У даній галузі техніки добре відомо, що мається на увазі під консервативною амінокислотною заміною.

55 [000159] Поліпептиди згідно із даним описом можуть являти собою рекомбінантні поліпептиди, природні поліпептиди або синтетичні поліпептиди, що містять антитіло до CD37 людини або його фрагмент. У даній галузі техніки буде зрозуміло, що деякі амінокислотні послідовності згідно із даним винаходом можуть бути змінені без значного впливу на структуру або функцію білку. Таким чином, даний винахід додатково включає варіації поліпептидів, які проявляють істотну активність або які містять області антитіла до білку CD37 або його

фрагменту. Такі мутанти включають делеції, вставки, інверсії, повтори та заміни типів.

[000160] Виділені поліпептиди, описані у даному описі, можуть бути отримані за будь-яким підходящим способом, відомим у даній галузі техніки. Такі способи варіюють від прямих способів синтезу білку до конструювання послідовності ДНК, що кодує виділені поліпептидні послідовності, та експресії цих послідовностей у підходящому трансформованому хазяїні. У деяких варіантах реалізації послідовність ДНК сконструйована з використанням рекомбінантної технології шляхом виділення або синтезу послідовності ДНК, що кодує білок дикого типу, що представляє інтерес. Зазначена послідовність може бути необов'язково, піддана мутагенезу за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу для одержання її функціональних аналогів. Див., наприклад, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) та патент США № 4588585.

[000161] У деяких варіантах реалізації послідовність ДНК, що кодує поліпептид, що представляє інтерес, може бути сконструйована шляхом хімічного синтезу з використанням олігонуклеотидного синтезатору. Такі олігонуклеотиди можуть бути сконструйовані на основі амінокислотної послідовності бажаного поліпептиду та вибору тих кодонів, які кращі для клітини-хазяїна, у якій буде продукуватися рекомбінантний поліпептид, що представляє інтерес. Для синтезу виділеної поліпептидної послідовності, що кодує виділений поліпептид, що представляє інтерес, можуть бути застосовані стандартні способи. Наприклад, повна амінокислотна послідовність може бути використана для конструювання гену з послідовністю, відновленою по поліпептиду. Додатково може бути синтезований олігомер ДНК, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує конкретний виділений поліпептид. Наприклад, декілька невеликих олігонуклеотидів, що кодують частини бажаного поліпептиду, можуть бути синтезовані та потім лігovanі. Окремі олігонуклеотиди звичайно містять виступаючі 5'- або 3'-кінці для комплементарної зборки.

[000162] Після зборки (шляхом синтезу, сайт-спрямованого мутагенезу або іншим способом) поліпептидні послідовності, що кодують конкретний виділений поліпептид, що представляє інтерес, будуть вбудовані у вектор експресії та функціонально пов'язані з послідовністю контролю експресії, що підходить для експресії білку у бажаному хазяїні. Правильна зборка може бути підтверджена секвенуванням нуклеїнової кислоти, рестрикційним картуванням та експресією біологічно активного поліпептиду у підходящому хазяїні. Як добре відомо у даній галузі техніки, для одержання високих рівнів експресії трансформованого гену у хазяїні ген повинен бути функціонально пов'язаний з послідовностями транскрипційного та трансляційного контролю експресії, які є функціонально активними у обраному хазяїні експресії.

[000163] У деяких варіантах реалізації рекомбінантні вектори експресії використовують для ампліфікації та експресії ДНК, що кодує антибіотика до CD37 людини або їх фрагменти. Рекомбінантні вектори експресії являють собою реплікуємі ДНК-конструкції, які містять синтетичні або отримані із кДНК фрагменти ДНК, що кодують поліпептидний ланцюг антибіотика до CD37 або його фрагменту, функціонально пов'язані з підходящими транскрипційними або трансляційними регуляторними елементами, отриманими з генів ссавців, мікроорганізмів, вірусів або комах. Одиниця транскрипції звичайно містить сукупність (1) генетичного елементу або елементів, що мають регуляторне значення у експресії генів, наприклад, транскрипційних промоторів або енансерів, (2) структурну або кодуючу послідовність, яка транскрибується у мРНК та транлюється у білок, та (3) підходящі послідовності ініціації та термінації транскрипції та трансляції, як докладно описано нижче. Такі регуляторні елементи можуть включати операторну послідовність для контролю транскрипції. Додатково можуть бути введені здатність до реплікації у хазяїні, звичайно забезпечувана точкою початку реплікації, та ген відбору для полегшення розпізнавання трансформантів. Області ДНК є функціонально зв'язаними, коли вони функціонально співвідносяться одна з іншою. Наприклад, ДНК для сигнального пептиду (секреторна лідерна послідовність) функціонально пов'язана із ДНК для поліпептиду, якщо вона експресується як попередник, який бере участь у секреції поліпептиду; промотор функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він контролює транскрипцію послідовності, або сайт зв'язування рибосом функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він розташований таким чином, щоб допускати трансляцію. Структурні елементи, призначені для використання у дріжджових системах експресії, містять лідерну послідовність, що забезпечує позаклітинну секрецію трансльованого білку клітиною-хазяїном. Альтернативно, коли рекомбінантний білок експресується без лідерної або транспортної послідовності, він може містити N-кінцевий залишок метіоніну. Цей залишок згодом може бути необов'язково відщеплений від експресованого рекомбінантного білку з одержанням кінцевого продукту.

[000164] Вибір послідовності контролю експресії та вектору експресії буде залежати від вибору хазяїна. Може бути використаний широкий спектр комбінацій хазяїна/вектору експресії.

Придатні для застосування вектори експресії для еукаріотичних хазяїв включають, наприклад, вектори, що містять послідовності контролю експресії з SV40, вірусу папіломи великої рогатої худоби, аденовірусу та цитомегаловірусу. Придатні для застосування вектори експресії для бактеріальних хазяїв включають відомі бактеріальні плазмідт, такі як плазміді з *Escherichia coli*, включаючи pCR 1, pBR322, pMB9 та їх похідні, плазміді більш широкого діапазону хазяїв, таких як M13 та ниткоподібні фаги, що містять одноланцюгову ДНК.

[000165] Підходящі клітини-хазяї для експресії, що зв'язується з CD37 поліпептиду або антитіла (або білку CD37 для застосування як антиген) включають клітини прокаріот, дріжджів, комах або вищі еукаріотичні клітини під контролем підходящих промоторів. Прокаріоти включають грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *E. coli* або паличкоподібні бактерії. Вищі еукаріотичні клітини включають стійкі лінії клітин ссавців, як описано нижче. Також можуть бути використані безклітинні системи трансляції. Підходящі вектори клонування та експресії для застосування із клітинами-хазяями бактерій, грибів, дріжджів та ссавців описані у джерелі Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), відповідний опис з якого включено у даний опис за допомогою посилання. Додаткова інформація про способи одержання білку, включаючи одержання антитіла, наведена, наприклад, у патентній публікації США № 2008/0187954, патентах США №№ 6413746 та 6660501 та міжнародній патентній публікації № WO 04009823, та кожен із зазначених джерел даним включений у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті.

[000166] Різні системи культур клітин ссавців або комах також ефективно застосовують для експресії рекомбінантного білку. Експресія рекомбінантних білків у клітинах ссавців може бути здійснена, оскільки такі білки звичайно правильно складаються, відповідним чином модифікуються та повністю функціональні. Приклади підходящих ліній клітин-хазяїв ссавців включають лінії клітин нирки мавпи COS-7, описані Gluzman (Cell 23:175, 1981), та інші лінії клітин, здатні експресувати підходящий вектор, включаючи, наприклад, L-клітини, C127, 3T3, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), лінії клітин HeLa та BHK. Вектори експресії ссавців можуть містити нетранскрибуємі елементи, такі як точка початку реплікації, підходящі промотор та енхансер, пов'язані з експресованим геном, та інші 5'- або 3'-фланкуючі нетранскрибуємі послідовності та 5'- або 3'-нетрансльовані послідовності, такі як необхідні сайти зв'язування рибосоми, сайт поліаденілювання, донорні та акцепторні сайти сплайсингу та послідовності термінації транскрипції. Бакуловірусні системи для одержання гетерологічних білків у клітинах комах розглянуті Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

[000167] Білки, які продукуються трансформованим хазяїном, можуть бути очищені відповідно до будь-якого підходящого способу. Такі стандартні способи включають хроматографію (наприклад, іонообмінну, афінну та колонкову хроматографію з розподілом за розмірами), центрифугування, способи, основані на різній розчинності, або будь-який інший стандартний спосіб очищення білку. Для забезпечення легкого очищення шляхом пропускання через підходящу афінну колонку до білку можуть бути приєднані афінні мітки, такі як гексагістидин, мальтоза-зв'язуючий домен, послідовність білку оболонки вірусу грипу та глутатіон-S-трансфераза. Виділені білки також можуть бути фізично охарактеризовані з використанням таких методів як протеоліз, ядерний магнітний резонанс та рентгеноструктурна кристалографія.

[000168] Наприклад, супернатанти із систем, які секретують рекомбінантний білок у культуральне середовище, можуть бути спочатку сконцентровані з використанням фільтру для концентрування білка, що поставляється на ринок, наприклад, ультрафільтраційної установки Amicon або Millipore Pellicon. Після стадії концентрування концентрат може бути нанесений на підходящу матрицю для очищення. У якості альтернативи може бути використана аніонообмінна смола, наприклад, матриця або субстрат, що мають бічні діетиламіноетильні (DEAE) групи. Матриці можуть являти собою акриламід, агарозу, декстран, целюлозу або інші типи, звичайно використовувані для очищення білку. У якості альтернативи може бути використана стадія катіонного обміну. Підходящі катіонообмінники включають різні нерозчинні матриці, що містять сульфопропильні або карбоксиметильні групи. Нарешті, для додаткового очищення агента, що зв'язується з CD37, можуть бути використані одна або більше стадій обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ОФ-ВЕРХ) з використанням гідрофобного середовища для ОФ-ВЕРХ, наприклад, силікагелю, що має бічні метильні або інші аліфатичні групи. Деякі або всі вищевказані стадії очищення у різних комбінаціях також можуть бути використані для одержання гомогенного рекомбінантного білку.

[000169] Рекомбінантний білок, одержуваний у бактеріальній культурі, можна виділити, наприклад, шляхом первісної екстракції з осадів клітин з наступним проведенням однієї або більше стадій концентрування, висалювання, водної іонообмінної або ексклюзійної

хроматографії. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) може бути використана на кінцевих стадіях очищення. Мікробні клітини, використовувані для експресії рекомбінантного білку, можуть бути зруйновані будь-яким зручним способом, включаючи цикли заморожування та відтавання, обробку ультразвуком, механічне руйнування або використання агентів, що лізують клітини.

[000170] Способи, відомі у даній галузі техніки для очищення антитіл та інших білків, також включають, наприклад, описані у патентних публікаціях США №№ 2008/0312425, 2008/0177048 та 2009/0187005, кожна з яких даним включена у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті.

III. Полінуклеотиди

[000171] У деяких варіантах реалізації даний винахід охоплює полінуклеотиди, що містять полінуклеотиди, які специфічно кодують поліпептид, що зв'язується з CD37, або фрагмент такого поліпептиду. Наприклад, у даному винаході запропонований полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло до CD37 людини або що кодує фрагмент такого антитіла. Полінуклеотиди згідно із даним винаходом можуть бути у формі РНК або у формі ДНК. ДНК включає кДНК, геномну ДНК та синтетичні ДНК та може бути двонитковою або одонитковою, та у випадку одониткової може являти собою кодуючу нитку або некодуючу (антисмыслову) нитку. У деяких варіантах реалізації полінуклеотид являє собою кДНК або ДНК, позбавлену одного або більше ендегенних інтронів.

[000172] У деяких варіантах реалізації полінуклеотиди, запропоновані у даному описі, є такими, що не зустрічаються у природі. У деяких варіантах реалізації полінуклеотиди, запропоновані у даному описі, отримані за рекомбінантним способом. У деяких варіантах реалізації полінуклеотиди виділені. У деяких варіантах реалізації полінуклеотиди є по суті чистими.

[000173] У даному описі запропонований полінуклеотид, що кодує поліпептид, містить послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:3-11.

[000174] У деяких варіантах реалізації полінуклеотид містить послідовності, що кодують поліпептиди, представлені SEQ ID NO:3-5. У деяких варіантах реалізації полінуклеотид містить послідовності, що кодують поліпептиди, представлені SEQ ID NO:6-8. У деяких варіантах реалізації полінуклеотид містить послідовності, що кодують поліпептиди, представлені SEQ ID NO:3-5 та SEQ ID NO: 6-8. У деяких варіантах реалізації вектор містить полінуклеотиди, що кодують поліпептиди, представлені SEQ ID NO: 3-8. У деяких варіантах реалізації композиція містить полінуклеотид, що кодує поліпептиди, представлені SEQ ID NO:3-5, та полінуклеотид, що кодує поліпептиди, представлені SEQ ID NO:6-8. У деяких варіантах реалізації композиція містить вектор, що містить полінуклеотиди, що кодують поліпептиди, представлені SEQ ID NO:3-5, та вектор, що містить полінуклеотиди, що кодують поліпептиди, представлені SEQ ID NO:6-8.

[000175] У деяких варіантах реалізації композиція містить полінуклеотид, що кодує поліпептид, представлений SEQ ID NO:9, та полінуклеотид, що кодує поліпептид, представлений SEQ ID NO:10. У деяких варіантах реалізації композиція містить вектор, що містить полінуклеотид, що кодує поліпептид, представлений SEQ ID NO:9, та вектор, що містить полінуклеотид, що кодує поліпептид, представлений SEQ ID NO:10. У деяких варіантах реалізації вектор містить полінуклеотид, що кодує поліпептид, представлений SEQ ID NO:9, та полінуклеотид, що кодує поліпептид, представлений SEQ ID NO:10.

[000176] У даному описі додатково запропонований полінуклеотид, що містить послідовність, вибрану з послідовностей, представлених SEQ ID NO:13 та 14.

Послідовність нуклеїнової кислоти VH muCD37-1B11-2

gaggttcaactgctgcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaaagatacctgcaaggcttctggttactcatttactggc
tactttatgaactgggtgatacagagccatggaaagggccttgagtgattggacgtattaatccttacaatggtgataccttctacaaccagaag
tcaagggcaaggccacattgactgtagacaaatcctctaccacagccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgccgtctatt
attgtggatcccgggggatagtggtctctctaggttctctgatgtctggggcgagggacctcggtcatcgtctcctcagccaaaacgacac
(SEQ ID NO:13)

Послідовність нуклеїнової кислоти VL muCD37-1B11-2

agtattgtgatgacccagactcccaaatcctgctgtatcagcaggagacagggttaccataacctgcaaggccagtcaggggtgtgagt
aatgatgtagattggtaccaacagaagccagggcagctctcctaaactgctgatactatgcacccaatcgctacactggagtcctgatcgctt
cactggcagtggtgatgggacggatttcactttcagcatcagcactgtgcaggctgaagacctggcagtttattctgtcaccaggattatacctct
ccgacgttcggtggaggcaccagaagctggaatcaaacgggctgat (SEQ ID NO:14)

[000177] Також запропонований полінуклеотид, що має послідовність, щонайменше на приблизно 95%, щонайменше на приблизно 96%, щонайменше на приблизно 97%, щонайменше на приблизно 98% або щонайменше на приблизно 99% ідентичну одній з SEQ ID

NO:13 та 14.

[000178] Також запропонована композиція, яка містить полінуклеотид, щонайменше на приблизно 90% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 90% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить полінуклеотид, щонайменше на приблизно 95% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 95% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить полінуклеотид, щонайменше на приблизно 96% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 96% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить полінуклеотид, щонайменше на приблизно 97% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 97% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить полінуклеотид, щонайменше на приблизно 98% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 98% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить полінуклеотид, щонайменше на приблизно 99% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 99% ідентичний SEQ ID NO:14.

[000179] Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотид, щонайменше на приблизно 90% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 90% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотид, щонайменше на приблизно 95% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 95% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотид, щонайменше на приблизно 96% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 96% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотид, щонайменше на приблизно 97% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 97% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотид, щонайменше на приблизно 98% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 98% ідентичний SEQ ID NO:14. Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотид, щонайменше на приблизно 99% ідентичний SEQ ID NO:13, та полінуклеотид, щонайменше на приблизно 99% ідентичний SEQ ID NO:14.

[000180] Також запропонована композиція, яка містить вектор або вектори, які містять полінуклеотидну послідовність, представлену SEQ ID NO:13, та полінуклеотидну послідовність, представлену SEQ ID NO:14.

[000181] У деяких варіантах реалізації полінуклеотиди містять кодуючу послідовність для зрілого поліпептиду, зливу у тій же рамці зчитування з полінуклеотидом, який сприяє, наприклад, експресії та секреції поліпептиду із клітини-хазяїна (наприклад, лідерна послідовність, яка діє як секреторна послідовність для регуляції транспорту поліпептиду із клітини). Поліпептид, що має лідерну послідовність, є білком-попередником, та лідерна послідовність може бути розщеплена клітиною-хазяїном з утворенням зрілої форми поліпептиду. Полінуклеотиди також можуть кодувати пробілок, який являє собою зрілий білок плюс додаткові 5'-амінокислотні залишки. Зрілий білок, що має пропослідовність, є пробілком та являє собою неактивну форму білку. При розщепленні пропослідовності залишається активний зрілий білок.

[000182] У деяких варіантах реалізації полінуклеотиди містять кодуючу послідовність для зрілого поліпептиду, зливу у тій же рамці зчитування з маркерною послідовністю, яка забезпечує можливість, наприклад, для очищення кодуючого поліпептиду. Наприклад, маркерна послідовність може являти собою гексагістидинову мітку, забезпечувану вектором pQE-9, щоб забезпечити очищення зрілого поліпептиду, злитого з маркером, у випадку бактеріального хазяїна, або маркерна послідовність може являти собою гемагглютинінову (HA) мітку, отриману з білку гемагглютиніну вірусу грипу, у випадку використання клітин-хазяїв ссавців (наприклад, клітин COS-7).

[000183] Даний опис також відноситься до варіантів описаних вище полінуклеотидів, що кодують, наприклад, фрагменти, аналоги та похідні.

[000184] Варіанти полінуклеотидів можуть містити зміни у кодуючих областях, некодируючих областях або і у тих, і у інших. У деяких варіантах реалізації варіанти полінуклеотидів містять зміни, які приводять до мовчазних замін, вставок або делецій, але не змінюють властивостей або активностей кодуємого поліпептиду. У деяких варіантах реалізації варіанти полінуклеотидів виникають внаслідок мовчазних замін через вродженості генетичного коду. Варіанти полінуклеотидів можуть бути отримані з ряду причин, наприклад, для оптимізації

експресії кодонів для конкретного хазяїна (зміна кодонів у мРНК людини до тих, які кращі для бактеріального хазяїна, такого як *E. coli*).

[000185] Також запропоновані вектори та клітини, що містять полінуклеотиди, описані у даному описі.

5 IV. Біологічні зразки

[000186] Біологічні зразки часто фіксують за допомогою фіксатора. Звичайно використовують альдегідні фіксатори, такі як формалін (формальдегід) та глутаровий альдегід. Зразки тканин, фіксовані з використанням інших методів фіксації, таких як спиртова імерсія (Battifora and Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095), також є підходящими. Використовувані зразки також можуть бути залиті парафіном. У одному з варіантів реалізації зразки фіксують у формаліні та заливають парафіном (FFPE). У іншому варіанті реалізації блок FFPE забарвлюють гематоксиліном та еозином перед вибором однієї або більше частин для аналізу, щоб вибрати певну область (області) для зразку із центральної частини блоку FFPE. Способи одержання тканинних блоків із цих зразків, що складаються із часток, були використані у попередніх дослідженнях різних прогностичних факторів методом ІГХ та/або добре відомі фахівцям у даній галузі техніки (див., наприклад, Abbondanzo et al., Am J Clin Pathol. 1990 May;93(5):698-702; Allred et al., Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13).

[000187] Коротко, будь-який інтактний орган або тканина можуть бути розрізані на досить дрібні частини та інкубовані у різних фіксаторах (наприклад, формаліні, спирті та т.д.) протягом різних періодів часу доти, поки тканина не буде "фіксована". Зразки можуть являти собою практично будь-яку інтактну тканину, хірургічно вилучену з організму. Зразки можуть бути розрізані на досить дрібні частини, що підходять для обладнання, звичайно використовуваного у лабораторіях гістопатології. Розмір відрізаних частин звичайно становить від декількох міліметрів до декількох сантиметрів. Біологічний зразок також може являти собою рідкі екстракти, кров, плазму, сироватку, спинномозкову рідину, лімфатичну рідину та/або препарат селезінки.

V. Кореляція експресії CD37 та терапевтичної ефективності

[000188] Імунокон'югати до CD37 запропоновані у опублікованій заявці США № 2011/0256153, яка включена у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті. У деяких варіантах реалізації імунокон'югат до CD37 являє собою IMG529. IMG529 містить антитіло huCD37-3 (що містить ділянки CDR, представлені SEQ ID NO:22-27, VH, представлений SEQ ID NO:28, та VL, представлений SEQ ID NO:29), лінкер SMCC та майтанзиноїд DM1. Послідовності антитіла huCD37-3 наведені нижче.

huCD37-3 VH-CDR1: TSGVS (SEQ ID NO:22)
 huCD37-3 VH-CDR2: VIWGDGSTN (SEQ ID NO:23)
 huCD37-3 VH-CDR3: GGYSLAH (SEQ ID NO:24)
 huCD37-3 VL-CDR1: RASENIRSNLA (SEQ ID NO:25)
 huCD37-3 VL-CDR2: VATNLAD (SEQ ID NO:26)
 huCD37-3 VL-CDR3: QHYWGTTWT (SEQ ID NO:27)
 huCD37-3 VH v. 1.0:
 QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSGVSWVRQPPGKFLLEWLGVIWGDGSTNYHPSLK
 SRLSIKDHSHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:28)
 huCD37-3 VH v. 1.1:
 QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSGVSWVRQPPGKFLLEWLGVIWGDGSTNYHSSLK
 SRLSIKDHSHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:32)
 huCD37-3 VL:
 DIQMTQSPSSSLSVSGERVITCRASENIRSNLAWYQQKPKGSPKLLVNVATNLADGVPSRFGSGS
 GSGTDYSLKINSIQPEDFGTYQCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:29)
 Важкий ланцюг (HC) huCD37-3 v. 1.0:
 QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSGVSWVRQPPGKFLLEWLGVIWGDGSTNYHPSLK
 SRLSIKDHSHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:30)
 Важкий ланцюг (HC) huCD37-3 v. 1.1:
 QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSGVSWVRQPPGKFLLEWLGVIWGDGSTNYHSSLK
 SRLSIKDHSHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:33)

5 Легкий ланцюг (LC) huCD37-3:

DIQMTQSPSSLSVSGERVITICRASENIRSNLAWYQQKPGKSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGS
GSGTDYSLKINSIQPEDFGTYQCQHYWGTTWTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

10 [000189] У деяких варіантах реалізації імунокон'югат може містити антитіло до CD37,
отримане з гібридами з позначенням депонування у ATCC PTA-10664, депонованої у
Американській колекції типових культур (ATCC) за адресою 10801 University Boulevard,
Manassas, Virginia 20110 18 лютого 2010 року, або його антиген-зв'язуючий фрагмент. У деяких
варіантах реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить області VH-CDR та
15 VL-CDR антитіла, отриманого з гібридами PTA-10664.

[000190] IMGN529 у цей час проходить клінічні дослідження відносно лікування лейкозів та
лімфом. Способи введення IMGN529 запропоновані у заявці США № 14/710354 (публікація №
2015/0343077) та джерелі Stathis, et al., "Preliminary Findings from a phase I, multi-center, open-
label study of the anti-CD37 antibody-drug conjugate (ADC), IMGN529, in adult patients with relapsed
or refractory non-Hodgkin Lymphoma (NHL)", Abstract Number 8526, ASCO Annual Meeting (2014)),
кожен з яких включений у даний опис за допомогою посилання.

[000191] У деяких варіантах реалізації у даному описі запропонований спосіб ідентифікації
суб'єктів, які можуть позитивно реагувати на націлену на CD37 терапію внаслідок підвищених
рівнів експресії CD37 у суб'єкта, зокрема, із застосуванням антитіл та їх антиген-зв'язуючих
фрагментів, запропонованих у даному описі, за допомогою яких можна виявляти динамічний
25 діапазон рівнів експресії CD37, наприклад, методом ІГХ.

[000192] Оцінка зразків пацієнтів та кореляція з ефективністю *in vivo* з використанням
моделей ксенотрансплантатів демонструє можливості аналізу експресії для відбору суб'єктів,
які більш схильні реагувати на лікування. За допомогою ІГХ одержують значення експресії CD37
у пухлинних клітинах: від 0 (експресія відсутня) до 3 (дуже високі рівні експресії). Зразки зі
значеннями експресії CD37, що становлять 1, 2 або 3 (або 2 або 3), характеризуються
підвищеною ймовірністю реакції на націлену на CD37 протиракову терапію при клінічно
значимих дозах імункон'югатів до CD37 (див., наприклад, WO 2013/149171, який включений у
даний опис за допомогою посилання). Таким чином, ідентифікація осіб, що мають підвищене
значення CD37, допоможе виявити осіб, які можуть реагувати на клінічно значиму дозу. Більше
того, експресія більш однорідних рівнів CD37 забезпечує кращу кореляцію з терапевтичною
користю. Таким чином, гомогенна рівномірність зафарбовування або комбінація більшої
інтенсивності зафарбовування з гетерогенною рівномірністю зафарбовування можуть вказувати
на збільшення експресії CD37. Наприклад, значення, що перевищують 2 гетеро, можуть бути
застосовані у якості критерію відбору пацієнта для лікування із застосуванням націленого на
CD37 терапевтичного агенту. Крім цього, критерії відбору пацієнта можуть бути основані на
процентному вмісті у зразку клітин, що експресують мембранний CD37 на певному рівні, який
відбиває як інтенсивність зафарбовування (наприклад, 1, 2 або 3), так і рівномірність
(наприклад, гетерогенне або гомогенне (див. Таблицю 3)). Наприклад, зразок може бути
охарактеризований як такий, що містить, наприклад, щонайменше 25% клітин, що позитивно
забарвлюються на CD37 зі значенням щонайменше 2 або більше, або щонайменше 75% клітин,
що позитивно забарвлюються на CD37 зі значенням щонайменше 2 або більше. У іншому
прикладі зразок може бути охарактеризований як такий, що містить, наприклад, щонайменше
25% клітин, що позитивно забарвлюються на CD37 зі значенням щонайменше 3, або
щонайменше 75% клітин, що позитивно забарвлюються на CD37 зі значенням 3. У іншому
прикладі експресії CD37 привласнюють Н-значення. Крім цього, імунологічне виявлення (за
допомогою імуногістохімії) CD37 може бути оцінене з використанням Н-значень. Н-значення
поєднують значення інтенсивності зафарбовування зі значеннями рівномірності з
використанням розрахунків, запропонованого у даному описі. Як більш докладно описане
нижче, Н-значення можуть варіювати від 1 до 300.

[000193] Аналіз експресії CD37 також може бути використаний для ідентифікації пацієнтів,
у яких знижені рівні націленої на CD37 протиракової терапії ("низькодозова терапія") можуть
бути ефективні для забезпечення протипухлинних реакцій. Як повинно бути зрозуміло у даній
галузі техніки, сполуки звичайно вводять у найменшій дозі, яка викликає бажану терапевтичну
60 відповідь. Це особливо важливо для терапевтичних засобів, які викликають клінічні та часто

небажані побічні ефекти. Можливість розпізнавання таких суб'єктів з підвищеними рівнями експресії CD37 дозволяє потенційно мінімізувати дозу націленого на CD37 терапевтичного засобу, тим самим зменшуючи можливі побічні ефекти, зберігаючи при цьому терапевтичну ефективність.

5 VI. Способи імунодетекції

[000194] У деяких варіантах реалізації агенти, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти), можуть бути застосовані у способах імунодетекції для ідентифікації зразків та/або суб'єктів з підвищеною експресією або надекспресією CD37. Способи імунодетекції включають, наприклад, імуногістохімію (ІГХ), імуноферментний аналіз (ELISA), вестерн-блоттинг, проточну цитометрію та сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS), якщо згадувати лише деякі з них.

[000195] Як правило, способи імунодетекції включають одержання зразку, що можливо містить CD37, та приведення зазначеного зразку у контакт із першим агентом, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитілом до CD37 або його антиген-зв'язуючим фрагментом) в умовах, що підходять для забезпечення утворення імунокомплексів.

[000196] Щодо виявлення антигену, аналізований біологічний зразок може являти собою будь-який зразок, у якому потрібно виявити CD37, такий як рідкий екстракт, кров, плазма, сироватка, спинномозкова рідина, лімфатична рідина, зріз або ділянка тканини, гомогенізований екстракт тканини, аспірати біопсій, клітина, відділені та/або очищені форми композицій, що містять CD37, або будь-яка біологічна рідина. У деяких варіантах реалізації використовують зразки крові, плазми або лімфи або екстракти.

[000197] Приведення обраного біологічного зразку у контакт із агентом, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитілом до CD37 або його антиген-зв'язуючим фрагментом) у підходящих умовах та протягом періоду часу, достатнього для забезпечення утворення імунних комплексів (первинних імунних комплексів), звичайно полягає у додаванні агенту, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіла до CD37 або його антиген-зв'язуючого фрагменту) до зразка та інкубування суміші протягом періоду часу, достатнього для того, щоб агент, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент) утворював комплекси, тобто зв'язався з будь-яким присутнім CD37. Після закінчення цього часу зразок, такий як зріз тканини або рідкий екстракт, планшет для ELISA або вестерн-блот, звичайно промивають для видалення будь-якого неспецифічно зв'язаного агенту, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіла до CD37 або його антиген-зв'язуючого фрагменту), забезпечуючи виявлення тільки тих агентів, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитіл до CD37 або їх антиген-зв'язуючих фрагментів), які специфічно зв'язані у первинних імунних комплексах.

[000198] Як правило, виявлення утворення імунокомплексів добре відомо у даній галузі техніки та може бути досягнуте шляхом застосування численних підходів. Агент, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент), використовуваний для виявлення, сам може бути пов'язаний з міткою, що виявляється, таким чином, щоб можна було просто виявити цю мітку, визначивши у такий спосіб кількість первинних імунних комплексів у композиції, що підлягає аналізу. У якості альтернативи перший агент, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент), який зв'язується у первинних імунних комплексах, може бути виявлений за допомогою другого зв'язуючого агента (наприклад, антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту), який має зв'язуючу здатність відносно першого агента, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитілу до CD37 або його антиген-зв'язуючого фрагменту). У цих випадках другий зв'язуючий агент може бути пов'язаний з міткою, що виявляється. Коли другий зв'язуючий агент сам по собі є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, він може бути названий "вторинним" антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. Первинні імунні комплекси приводять у контакт із міченим вторинним зв'язуючим агентом у підходящих умовах та протягом періоду часу, достатнього для забезпечення утворення вторинних імунних комплексів. Вторинні імунні комплекси потім звичайно промивають для видалення будь-яких неспецифічно зв'язаних мічених вторинних зв'язуючих агентів, а потім виявляють мітку, що залишилася, у вторинних імунних комплексах.

[000199] Додатково способи включають виявлення первинних імунних комплексів за допомогою двостадійного підходу. Другий зв'язуючий агент (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент), який має зв'язуючу здатність відносно першого агента, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіла до CD37 або його антиген-зв'язуючого фрагменту), використовують для утворення вторинних імунних комплексів, як описано у даному описі. Після промивання вторинні імунні комплекси приводять у контакт із третім зв'язуючим агентом, який має зв'язуючу здатність відносно другого зв'язуючого агента (наприклад, антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту), також у підходящих умовах та протягом періоду часу,

достатнього для забезпечення утворення імунних комплексів (третинних імунних комплексів). Третій зв'язуючий агент пов'язаний з міткою, що виявляється, що дозволяє виявити третинні імунні комплекси, що утворювалися. Ця система може забезпечити посилення сигналу, якщо це бажано.

[000200] У іншому варіанті реалізації біотинільований агент, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент) використовують для виявлення CD37, а другий зв'язуючий агент (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент) потім використовують для виявлення біотину. У цьому способі тестуєми зразок спочатку інкубують у розчині, що містить біотинільований агент, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитіло до CD37 або його антиген-зв'язуючий фрагмент). Якщо CD37 є присутнім, частина зв'язуючого агенту зв'язується з CD37 з утворенням комплексу біотинільований агент, що зв'язується з CD37, - CD37. Потім зазначений комплекс ампліфікують шляхом послідовного інкубування у розчинах стрептавідину (або авідину), біотинільованої ДНК та/або комплексарної біотинільованої ДНК, на кожній стадії додаючи додаткові сайти біотину до комплексу антитіло/антиген. Стадії ампліфікації повторюють до досягнення підходящого рівня ампліфікації, після чого зразок інкубують у розчині, що містить другий зв'язуючий агент (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент), який зв'язується з біотином. Цей другий зв'язуючий агент мітять, наприклад, ферментом, який може бути використаний для виявлення присутності комплексу антитіло/антиген за допомогою гістоензимології з використанням хромогенного субстрату. При підходящій ампліфікації може бути отриманий кон'югат, який є макроскопічно видимим.

[000201] У одному з варіантів реалізації для імунологічного виявлення використовують імуногістохімію (ІГХ). При використанні ІГХ виявлення CD37 у зразку може бути досягнуте за допомогою націлювання на зразок зонда, наприклад, антитіла до CD37 або його антиген-зв'язуючого фрагменту. Зазначений зонд може бути або безпосередньо, або опосередковано пов'язаний з міткою, що виявляється, або може бути виявлений за допомогою іншого зонду, який або безпосередньо, або опосередковано пов'язаний з міткою, що виявляється.

[000202] У деяких варіантах реалізації за допомогою ІГХ можна виявляти відмінності між різними рівнями експресії білку, наприклад, у каліброваному методі ІГХ. У деяких варіантах реалізації за допомогою ІГХ можна розрізняти інтенсивності зафарбовування для зразків, що характеризуються низькою, проміжною або високою експресією CD37.

[000203] У одному з варіантів реалізації імунологічне виявлення (за допомогою імуногістохімії) CD37 оцінюють як за інтенсивністю, так і за рівномірністю (відсоток пофарбованих клітин - тільки мембран). Порівняльні шкали для інтенсивності експресії CD37 співвідносяться як 0 – негативна, 0-1 – дуже слабка, 1 – слабка, 1-2 – від слабкої до помірної, 2 – помірна, 2-3 – від помірної до сильної, 3 – від сильної до дуже сильної. Кількісно значення 0 означає, що зафарбовування не спостерігається або зафарбовування мембрани спостерігається менше ніж у 10% пухлинних клітин. Значення 1 або 1+ показує, що слабе/ледь помітне зафарбовування мембрани виявляється більш ніж у 10% пухлинних клітин. Клітини забарвлюються тільки у частині їх мембран. Значення 1 та 1+ використовуються взаємозамінно. При значенні 2 повне зафарбовування мембран від слабкого до помірного спостерігається більш ніж у 10% пухлинних клітин. Нарешті, значення 3 показує, що повне зафарбовування мембран від помірного до сильного спостерігається більш ніж у 10% пухлинних клітин. Зразки зі значенням 0 або 1 для експресії CD37 можуть бути охарактеризовані як такі, що не мають підвищеної експресії CD37, у той час як зразки зі значеннями 2 або 3 можуть бути охарактеризовані як такі, що мають надекспресію або підвищений рівень CD37. У іншому варіанті реалізації з використанням антитіл, їх антиген-зв'язуючих фрагментів або поліпептидів, запропонованих у даному описі, зразки зі значенням 0 для експресії CD37 можуть бути охарактеризовані як такі, що не мають підвищеної експресії CD37, зразки зі значенням 1 можуть бути охарактеризовані як такі, що мають підвищену експресію CD37, а зразки зі значеннями 2 або 3 можуть бути охарактеризовані як такі, що мають надекспресію або підвищений рівень CD37.

[000204] У деяких варіантах реалізації значення, що становить щонайменше 2, у зразку, отриманому від суб'єкта, ідентифікує суб'єкта як претендента на лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37 (наприклад, IMG529). У деяких варіантах реалізації значення, що становить щонайменше 3, у зразку, отриманому від суб'єкта, ідентифікує суб'єкта як претендента на лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37 (наприклад, IMG529).

[000205] Зразки, що характеризуються надекспресією CD37, також можуть бути оцінені за імуногістохімічними показниками, що відповідають кількості копій молекул CD37, що

експресуються, на клітину або зв'язаних антитіл на клітину (ABC), та можуть бути біохімічно визначені.

[000206] Порівняльні шкали для рівномірності CD37 (відсоток зафарбовування мембран клітин) наступні: негативне = 0%; фокальне = <25%; гетерогенне (гетеро) = 25-75% та гомогенне (гомо) = >75%.

[000207] У деяких варіантах реалізації значення, яке становить щонайменше 2 гетеро у зразку, отриманому від суб'єкта, ідентифікує суб'єкта як претендента на лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37 (наприклад, IMG529). У деяких варіантах реалізації значення, яке становить щонайменше 2 гомо у зразку, отриманому від суб'єкта, ідентифікує суб'єкта як претендента на лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37 (наприклад, IMG529). У деяких варіантах реалізації значення, яке становить щонайменше 3 гетеро у зразку, отриманому від суб'єкта, ідентифікує суб'єкта як претендента на лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37 (наприклад, IMG529). У деяких варіантах реалізації значення, яке становить щонайменше 3 гомо у зразку, отриманому від суб'єкта, ідентифікує суб'єкта як претендента на лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37 (наприклад, IMG529).

[000208] У одному з варіантів реалізації імунологічне виявлення (за допомогою імуногістохімії) CD37 оцінюють із використанням Н-значень. Н-значення поєднують значення інтенсивності зафарбовування (наприклад, значення від 0 до 3, де 0 означає відсутність зафарбовування, а 3 означає сильне зафарбовування) із процентним вмістом клітин, які є позитивними за зафарбовуванням мембран (тобто рівномірності). Н-значення може бути розраховане у такий спосіб:

Н-значення = $[0 \times (\text{процентний вміст клітин, пофарбованих з інтенсивністю 0})] + [1 \times (\text{процентний вміст клітин, пофарбованих з інтенсивністю 1})] + [2 \times (\text{процентний вміст клітин, пофарбованих з інтенсивністю 2})] + [3 \times (\text{процентний вміст клітин, пофарбованих з інтенсивністю 3})]$. Відповідно, Н-значення може варіюватися від 0 (відсутність зафарбовування мембран клітин) до 300 (усі мембрани клітин пофарбовано з інтенсивністю 3).

[000209] Як приклад, Н-значення у суб'єкта, що має рак, може бути наступним:

Н-значення = $(75\% \text{ з інтенсивністю 0}) + (0\% \text{ з інтенсивністю 1}) + (0\% \text{ з інтенсивністю 2}) + (25\% \text{ з інтенсивністю 3}) = 75$ або

Н-значення = $(0\% \text{ з інтенсивністю 0}) + (75\% \text{ з інтенсивністю 1}) + (0\% \text{ з інтенсивністю 2}) + (25\% \text{ з інтенсивністю 3}) = 150$.

У іншому прикладі Н-значення у суб'єкта, що має рак, може бути наступним:

Н-значення = $(75\% \text{ з інтенсивністю 0}) + (0\% \text{ з інтенсивністю 1}) + (25\% \text{ з інтенсивністю 2}) + (0\% \text{ з інтенсивністю 3}) = 50$ або

Н-значення = $(0\% \text{ з інтенсивністю 0}) + (75\% \text{ з інтенсивністю 1}) + (25\% \text{ з інтенсивністю 2}) + (0\% \text{ з інтенсивністю 3}) = 125$.

[000210] У одному з варіантів реалізації імунологічне виявлення (за допомогою імуногістохімії) CD37 оцінюють із використанням відсотку позитивного результату зафарбовування та інтенсивності за зразком. У цьому варіанті реалізації відбір для лікування із застосуванням схеми лікування, націленого на CD37, оснований на процентному вмісті у зразку клітин, що експресують мембранний CD37 на певному рівні, який відбиває як інтенсивність зафарбовування (наприклад, 1, 2 або 3), так і рівномірність (наприклад, гетерогенна або гомогенна (див. Таблицю 3)). Наприклад, зразок, що містить щонайменше 25% (тобто 25-75% або > 75%) клітин, що позитивно забарвлюються на CD37 зі значенням 3, може бути охарактеризований як "3 гетеро" та "3 гомо" або, спільно, як "щонайменше 25% позитивні зі значенням 3".

[000211] ІГХ може бути виконана вручну або з використанням автоматизованої системи (наприклад, з використанням автоматизованого фільтру). ІГХ може бути виконана на клітинах, осадах клітин, тканинах, препаратах із крові, плазмі, сироватці або лімфатичній рідині і т.д. У деяких варіантах реалізації зразки являють собою фіксовані зразки. У деяких варіантах реалізації зразки являють собою залиті парафіном зразки. У деяких варіантах реалізації зразки являють собою фіксовані формаліном та залиті парафіном зразки.

[000212] У одному з варіантів реалізації для імунологічного виявлення використовують імуноферментний аналіз (ELISA). Методологія, що лежить у основі ELISA, добре відома у даній галузі техніки. Див., наприклад, джерело Lequin R, "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", Clin. Chem. 51:2415-2418 (2005), включене у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті. У одному ілюстративному ELISA агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) іммобілізують на обраній поверхні, що проявляє спорідненість до білку, такий як лунка у полістирольному

планшеті для мікротитрування. Потім у лунки додають досліджуваний зразок, такий як клінічний зразок, що містить або передбачувано містить CD37. Після зв'язування та промивання для видалення неспецифічно зв'язаних імунотоксичних комплексів може бути виявлений CD37, що зв'язався. Виявлення звичайно досягають додаванням другого антитіла, специфічного для CD37, або його антиген-зв'язуючого фрагменту, який пов'язаний з міткою, що виявляється. Цей тип ELISA являє собою "сендвіч-ELISA". Виявлення також може бути досягнуте додаванням другого антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту з наступним додаванням третього антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, який має зв'язуючу здатність відносно другого антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, причому третє антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент пов'язаний з міткою, що виявляється. Появу зафарбовування можна реєструвати спектрофотометрично та співвідносити з концентрацією CD37 за допомогою калібрування з використанням калібрувальної кривої. У одному ілюстративному ELISA досліджувані зразки іммобілізують на поверхні лунки та потім приводять у контакт із агентами, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитілами або їх антиген-зв'язуючими фрагментами). Після зв'язування та промивання для видалення неспецифічно зв'язаних імунотоксичних комплексів виявляють CD37, що зв'язався. У випадку, якщо вихідні агенти, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитіла або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) пов'язані з міткою, що виявляється, імунотоксичні комплекси можуть бути виявлені безпосередньо. Знову ж, імунотоксичні комплекси можуть бути виявлені з використанням другого зв'язуючого агента, який має зв'язуючу здатність відносно першого зв'язуючого агента, причому другий зв'язуючий агент пов'язаний з міткою, що виявляється. Інший ELISA, у якому досліджувані зразки іммобілізовані, включає використання конкуренції при виявленні. У цьому ELISA мічені агенти, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитіла або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) додають у лунки, дозволяють зв'язатися з CD37 та виявляють за допомогою їх мітки. Кількість CD37 у зразку потім визначають шляхом змішування зазначеного зразку з міченими агентами, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитілами або їх антиген-зв'язуючими фрагментами) до або під час інкубування у лунках з покриттям. Присутність CD37 у зразку сприяє зменшенню кількості агентів, що зв'язуються з CD37 (наприклад, антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів), доступних для зв'язування з лункою, і у такий спосіб зменшує кінцевий сигнал.

[000213] У одному з варіантів реалізації для імунологічного виявлення використовують вестерн-блоттинг. Для вестерн-блоттингу білки екстрагують зі зразку клітини та піддають електрофорезу (наприклад, у ДНС-ПААГ) та одержують відбиток на мембрані (наприклад, нітроцелюлозі або полівініліденофториді (ПВДФ)). Потім мембрану приводять у контакт із агентом, що зв'язується з CD37 (наприклад, антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом), який може бути або безпосередньо позначений, або надалі підданий дії міченого вторинного зв'язуючого агента. Виявлення може бути здійснене, наприклад, за допомогою авторадіографії, колориметричної реакції або хемілюмінесценції. Цей спосіб забезпечує можливість як кількісної оцінки вмісту субстрату, так і визначення його ідентичності за відносним положенням на мембрані, яке вказує на довжину пробігу у акриламідному гелі під час електрофорезу.

[000214] У одному з варіантів реалізації для імунологічного виявлення використовують проточну цитометрію. Так, наприклад, кількість зв'язаних антитіл на клітину (ABC) може бути оцінена з використанням проточної цитометрії. Велика кількість зв'язаних антитіл до CD37 на клітину може вказувати на високі рівні експресії CD37 та високу ймовірність чутливості до лікування із застосуванням антитіла до CD37 або його імунотоксичного кон'югату.

[000215] У одному з варіантів реалізації для імунологічного виявлення використовують FACS. Аналіз методом FACS дозволяє виявити CD37 на мембранах клітин. Коротко, агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) пов'язані із флуорофорами, та виявлення здійснюють за допомогою апарату для сортування клітин, який зчитує довжину хвилі світла, випромінюваного кожною клітиною, коли вона проходить через світловий пучок. У цьому способі може бути використано два або більше антитіл одночасно.

VII. Агенти для детекції

[000216] Агенти, що зв'язуються з CD37, запропоновані у даному описі, можуть бути пов'язані із щонайменше одним агентом з утворенням кон'югату для детекції. Крім цього, агенти, що зв'язуються з CD37, запропоновані у даному описі, можуть бути виявлені за допомогою агента для детекції, який пов'язаний із щонайменше одним агентом з утворенням кон'югату для детекції. Молекули та фрагменти для детекції добре відомі у даній галузі техніки. Для підвищення ефективності молекул антитіл у якості діагностичних прийнято приєднувати або ковалентно зв'язувати або одержувати комплекс із щонайменше однією бажаною молекулою або фрагментом. Така молекула або фрагмент може являти собою щонайменше одну

репортерну молекулу, але не обмежуючись нею. Репортерна молекула визначена як будь-який фрагмент, який може бути виявлений з використанням аналізу. Необмежуючі приклади репортерних молекул, які були кон'юговані з антитілами, включають ферменти, радіоактивні мітки, гаптени, флуоресцентні мітки, фосфоресцюючі молекули, хемілюмінесцентні молекули, хромофори, люмінесцентні молекули, фотоафінні молекули, пофарбовані частинки та/або ліганди, такі як біотин.

[000217] Кон'югати антитіла або антиген-зв'язуючого фрагменту для детекції, передбачені у даному винаході, включають кон'югати для детекції для застосування *in vitro*, де антитіло або фрагмент зв'язане/ пов'язаний із вторинним зв'язуючим лігандом та/або ферментом (ферментною міткою), який буде утворювати пофарбований продукт при контакті із хромогенним субстратом. Антитіла до CD37 та їх антиген-зв'язуючі фрагменти, запропоновані у даному описі, зокрема придатні для застосування у способах із застосуванням кон'югатів, оскільки, наприклад, вони дозволяють виявляти динамічний діапазон CD37. Приклади підходящих ферментів включають уреазу, лужну фосфатазу, пероксидазу (хрину) та/або глюкозооксидазу. У деяких варіантах реалізації вторинні зв'язуючі ліганди являють собою сполуки біотину та/або авідину та стрептавідину.

[000218] У випадку ферментів інтенсивність розвиненого та вимірюного зафарбовування буде являти собою безпосереднє вимірювання кількості присутнього CD37. Якщо ПХ є міткою, зафарбовування може бути виявлене з використанням субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (TMB), наприклад, за поглинанням при довжині хвилі 450 нм. У якості альтернативи можуть бути використані інші хромогенні субстрати для ПХ, такі як 3,3'-діамінобензидин (DAB) або 2,2'-азинобіс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота) (ABTS). Субстрати, такі як TMB, DAB та ABTS, можуть бути застосовані, наприклад, у способах імунодетекції з використанням ELISA.

[000219] 3,3'-діамінобензидин (DAB) є субстратом для ферментів, таких як ПХ, що утворюють коричневий кінцевий продукт, який дуже мало розчинний у спирті та інших органічних розчинниках. Окиснення DAB також викликає полімеризацію, що приводить до здатності взаємодіяти з тетраоксидом осмію, та у такий спосіб збільшення інтенсивності його зафарбовування та електронної густини. З декількох металів та способів, використовуваних для посилення оптичної густини полімеризованого DAB, хлорид золота у комбінації із сульфідом срібла представляється найбільш ефективним.

[000220] 3-Аміно-9-етилкарбазол (AEC) є субстратом для ферментів, таких як ПХ, та при окисненні утворює рожево-червоний кінцевий продукт, який розчинний у спирті. Тому зразки, оброблені AEC, не слід занурювати у спирт або спиртові розчини (наприклад, гематоксилін Гарріса (Harris)). Замість цього слід використовувати водне середовище для контрастного зафарбовування та фіксування.

[000221] 4-Хлор-1-нафтол (CN) є субстратом для ферментів, таких як ПХ, який випадає у осад у вигляді синього кінцевого продукту. Оскільки CN розчинний у спирті та інших органічних розчинниках, зразок не можна зневоднювати, піддавати дії спиртових контрастних барвників або фіксувати під покривним склом із застосуванням середовищ для фіксування, що містять органічні розчинники. На відміну від DAB, CN має властивість дифундувати від місця осадження.

[000222] п-Фенілендіаміну дигідрохлорид/пірокатехін (реактив Ханкера-Яте (Hanker-Yates)) є субстратом для ферментів, таких як ПХ, який утворює синьо-чорний продукт реакції, нерозчинний у спирті та інших органічних розчинниках. Подібно до полімеризованого DAB, цей продукт реакції може бути оброблений осмієвою кислотою. Були отримані різні результати із застосуванням реактиву Ханкера-Яте у імунопероксидазному методі.

[000223] Можуть бути застосовані хемілюмінесцентні субстрати, такі як ECL. Субстрати, такі як ECL, можуть бути застосовані, наприклад, у способах імунодетекції з використанням вестерн-блоттингу.

[000224] Ілюстративні флуоресцентні мітки, призначені для застосування у кон'югатах зв'язуючого агенту (наприклад, антитіла), включають, наприклад, Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Dylight 488, флуоресцеїну ізотіоціанат (FITC), зелений флуоресцентний білок (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, Phycoerythrin, REG, родамін зелений, родамін червоний, тетраметилродамін (TMR) ренографін, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамін, техаський червоний та похідні цих міток (тобто галогеновані аналоги, модифіковані ізотіоціанатом або іншими лінкерами для кон'югування т. д.). Прикладом радіоактивної мітки є тритій.

[000225] Молекули, що містять азидогрупи, також можуть бути використані для утворення ковалентних зв'язків з білками через реакційноздатні нітренові проміжні сполуки, які

утворюються під дією ультрафіолетового випромінювання низької інтенсивності (Potter & Haley, 1983). Зокрема, 2- та 8-азидо аналоги пуринових нуклеотидів були використані у якості сайт-спрямованих фотозондів для ідентифікації нуклеотид-зв'язуючих білків у неочищених екстрактах клітин (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- та 8-азидонуклеотиди також
 5 були використані для картування нуклеотид-зв'язуючих доменів очищених білків (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989 і Dholakia et al., 1989) та можуть бути використані у якості антитілозв'язуючих агентів.

[000226] У інших варіантах реалізації даного винаходу агенти, що зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти) або вторинні зв'язуючі агенти є
 10 радіоактивно міченими нуклідами, такими як тритій. У додаткових варіантах реалізації застосовують наночастинки золота (такі як розміром від приблизно 0,5 нм до 40 нм) та/або квантові точки (Quantum Dots) (Хейвард, Каліфорнія).

[000227] У деяких варіантах реалізації CD37 виявляють із використанням реагенту Optiview DAB IHC Detection reagent (каталог Ventana # 760-700).

15 [000228] У деяких варіантах реалізації CD37 виявляють із використанням системи зафарбовування BenchMark Ultra.

[000229] У деяких варіантах реалізації CD37 виявляють із використанням системи зафарбовування BenchMark Ultra із застосуванням реагенту Optiview DAB IHC Detection reagent (каталог Ventana # 760-700).

20 VIII. Композиції та набори

[000230] Також у даному описі запропоновані композиції та набори для застосування у практичному здійсненні способів, розкритих у даному описі. Такі набори можуть містити ємності, кожна з яких містить один або більше різних реагентів (звичайно у концентрованій формі), використовуваних у зазначених способах, включаючи, наприклад, один або більше агентів, що
 25 зв'язуються з CD37, (наприклад, антитіло або їх антиген-зв'язуючих фрагментів), буфери та/або реагенти та обладнання для виявлення CD37 для забезпечення практичного застосування даного винаходу. Набір може додатково містити другий зв'язуючий агент, який зв'язується з агентом, що зв'язується з CD37, та необов'язково третій зв'язуючий агент, який зв'язується із другим зв'язуючим агентом. Агент, що зв'язується з CD37, другий зв'язуючий агент або третій зв'язуючий агент можуть бути пов'язані з реагентом для детекції або набір може містити реагенти для приєднання реагенту для детекції до агенту, що зв'язується з CD37, другого зв'язуючого агенту або третього зв'язуючого агенту. Опис мітки або індикатору або набір інструкцій із застосування компонентів набору у способі виявлення ліганду згідно із даним винаходом звичайно також будуть включені, причому інструкції можуть бути у листку-вкладиші
 30 та/або на упакуванні набору або його компонентів.

[000231] У деяких варіантах реалізації набір містить перше антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент, який зв'язується з CD37, друге антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент, який зв'язується з першим антитілом або антиген-зв'язуючим фрагментом, третє антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент, який зв'язується із другим антитілом або антиген-зв'язуючим фрагментом, де зазначене третє антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язане/ пов'язаний з реагентом для детекції (наприклад, ферментною міткою), необов'язково субстрат для реагенту для детекції (наприклад, TMB, DAB або ABTS) та необов'язково білок CD37 або зразок клітин, що містить CD37 (наприклад, залитий парафіном зразок). Набори можуть додатково містити терапевтичний агент для лікування раку, такий як імунокон'югат до
 40 CD37.

[000232] У одному з варіантів реалізації агент, що зв'язується з CD37, являє собою 1B11-2 або його антиген-зв'язуючий фрагмент. У одному з варіантів реалізації агент, що зв'язується з CD37, являє собою антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент, який зв'язується з тим же епітопом CD37, що і 1B11-2. У одному з варіантів реалізації агент, що зв'язується з CD37, являє собою антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент, який містить шість ділянок CDR 1B11-2. У
 50 одному з варіантів реалізації агент, що зв'язується з CD37, являє собою антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент, який містить VH та VL 1B11-2.

[000233] У одному з варіантів реалізації специфічне до CD37 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрації від приблизно 0,1 до приблизно 20 мкг/мл, від
 55 приблизно 0,1 до приблизно 15 мкг/мл, від приблизно 0,1 до приблизно 10 мкг/мл, від приблизно 0,5 до приблизно 20 мкг/мл, від приблизно 0,5 до приблизно 15 мкг/мл, від приблизно 0,5 до приблизно 10 мкг/мл, від приблизно 1 до приблизно 20 мкг/мл, від приблизно 1 до приблизно 15 мкг/мл, від приблизно 1 до приблизно 10 мкг/мл, від приблизно 2 до приблизно 20 мкг/мл, від приблизно 2 до приблизно 15 мкг/мл або від приблизно 2 до приблизно 10 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації специфічне до CD37 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент
 60

включені у концентрації приблизно 1,5 мкг/мл, приблизно 2 мкг/мл, приблизно 3 мкг/мл, приблизно 4 мкг/мл, приблизно 5 мкг/мл, приблизно 6 мкг/мл, приблизно 7 мкг/мл, приблизно 8 мкг/мл, приблизно 9 мкг/мл або приблизно 10 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації специфічне до CD37 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрації приблизно 2 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації специфічне до CD37 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрації приблизно 10 мкг/мл.

[000234] У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації від приблизно 1 до приблизно 20 мкг/мл, від приблизно 1 до приблизно 15 мкг/мл, від приблизно 1 до приблизно 10 мкг/мл, від приблизно 2 до приблизно 20 мкг/мл, від приблизно 2 до приблизно 15 мкг/мл або від приблизно 2 до приблизно 10 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації приблизно 1,5 мкг/мл, приблизно 2 мкг/мл, приблизно 3 мкг/мл, приблизно 4 мкг/мл, приблизно 5 мкг/мл, приблизно 6 мкг/мл, приблизно 7 мкг/мл, приблизно 8 мкг/мл, приблизно 9 мкг/мл або приблизно 10 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації приблизно 2 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації приблизно 2,1 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації приблизно 4,2 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації приблизно 8,4 мкг/мл. У іншому варіанті реалізації антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включені у концентрований розчин з інструкціями щодо розведення для досягнення кінцевої концентрації приблизно 10 мкг/мл. Набір може також містити інструкції з виявлення та оцінки експресії CD37. Набір може також містити контрольні або еталонні зразки. Необмежуючі приклади контрольних або еталонних зразків включають осади клітин або лінії клітин культури тканин, отримані з нормальних (нормальний контроль) або пухлинних (позитивний контроль) зразків. Ілюстративні лінії клітин включають лінії клітин, стабільно або тимчасово трансфіковані вектором експресії, який експресує CD37. Додаткові приклади включають осади клітин та зразки тканин, описані у прикладах. Позитивні лінії клітин включають клітини Дауді (висока експресія), клітини Ramos (помірна експресія) та клітини Намальви (від помірної до низької експресії). Мигдалина людини слугує як позитивною, так і негативною контрольною тканиною, оскільки зародкові центри та мантийні зони демонструють високу експресію, а міжфолікулярна область демонструє відсутність експресії. У деяких варіантах реалізації контрольні або еталонні зразки являють собою залиті парафіном зразки.

[000235] У деяких варіантах реалізації набір являє собою упаковану комбінацію, що включає основні елементи: (a) захоплюючі реагенти, що складаються із моноклональних антитіл проти CD37 людини; та (b) реагенти, які також можуть містити моноклональні антитіла до CD37, але можуть також містити виявлювані (мічені або немічені) антитіла, які зв'язуються з CD37. Ці основні елементи визначені у даному описі.

[000236] У одному з варіантів реалізації набір додатково містить твердий носій для захоплюючих реагентів, який може бути представлений у вигляді окремого елемента або на якому захоплюючі реагенти вже іммобілізовані. Отже, захоплюючі антитіла у наборі можуть бути іммобілізовані на твердому носії або вони можуть бути іммобілізовані на такому носії, який включений у набір або надається окремо від набору.

[000237] У одному з варіантів реалізації захоплюючий реагент наносять на планшет для мікротитрування. Реагент для детекції може являти собою мічені антитіла, що виявляються безпосередньо, або немічені антитіла, які виявляють за допомогою мічених антитіл, спрямованих проти немічених антитіл, отриманих від інших видів. У випадку, коли мітка являє собою фермент, набір буде звичайно містити субстрати та кофактори, необхідні для ферменту, а у випадку, коли мітка являє собою флуорофор - попередник барвника, який забезпечує виявлюваний хромофор. У випадку, коли реагент для детекції є неміченим, набір може додатково містити засіб для виявлення виявлюваних антитіл, такий як мічені антитіла, спрямовані на немічені антитіла, наприклад, у флуориметрично виявлюваній формі. У випадку, коли мітка являє собою фермент, набір буде звичайно містити субстрати та кофактори, необхідні для ферменту, коли мітка являє собою флуорофор - попередник барвника, який забезпечує виявлюваний хромофор, а коли мітка являє собою біотин - авідин, такий як авідин,

стрептавідин або стрептавідин, кон'югований із ПХ або β -галактозидазою разом з 4-метилумбеліферил-бета-D-глюкуронідом (MUG).

[000238] У одному з варіантів реалізації захоплюючий реагент являє собою антитіло 1B11-2 до CD37 або антитіло, яке містить послідовності антитіла 1B11-2. У одному з варіантів реалізації реагент для детекції являє собою антитіло 1B11-2 до CD37 або антитіло, яке містить послідовності антитіла 1B11-2. У іншому варіанті реалізації реагент для детекції 1B11-2 антитіло до CD37 або антитіло, яке містить послідовності антитіла 1B11-2, є біотинільованим.

[000239] У іншому варіанті реалізації набір додатково містить реагент для детекції, вибраний з групи, яка складається з ферменту, флуорофору, радіоактивної мітки та люмінофору. У іншому варіанті реалізації реагент для детекції вибраний з групи, яка складається з біотину, дигоксигеніну, флуоресцеїну, тритію та родаміну.

[000240] Набір може також містити інструкції із проведення аналізу та/або білок CD37 або його фрагменти (наприклад, позаклітинний домен CD37 або позаклітинний домен CD37 з повним доменом зв'язування GPI або його частиною) у якості стандарту антигену, а також інші добавки, такі як стабілізатори, буфери для промивання та інкубування і таке інше. У одному з варіантів реалізації стандарт антигену CD37 являє собою білок CD37, описаний у прикладах у даному описі. Набір може також містити інструкції з виявлення та оцінки експресії CD37.

[000241] Компоненти набору можуть бути представлені у заздалегідь визначених співвідношеннях, при цьому відповідні кількості різних реагентів підходящим чином варіюють для забезпечення концентрацій реагентів у розчині, які суттєво підсилюють чутливість аналізу. Зокрема, реагенти можуть бути представлені у вигляді сухих порошків, звичайно ліофілізованих, включаючи допоміжні речовини, які при розчиненні будуть забезпечувати розчин реагенту, що має підходящу концентрацію для з'єднання з досліджуваним зразком.

[000242] Також запропоновані композиції, що містять антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти, описані у даному описі. У одному з варіантів реалізації композиція містить антитіло до CD37 або антиген-зв'язуючий фрагмент, описані у даному описі, та буфер, наприклад, буфер, який може бути застосований у аналізі на виявлення, такому як ІГХ, ELISA або FACS. Такі буфери відомі середнім фахівцям у даній галузі техніки та включають розріджувачі. Як приклад, буфери для ІГХ можуть містити, наприклад, казеїн, сироватку або альбумін (такі як теляча сироватка, сироватка козла або БСА), Tween або тритон, ФСБ та/або азид натрію або будь-яку їх комбінацію. Буфери для ІГХ також запропоновані у даному описі та відомі середнім фахівцям у даній галузі техніки. Буфери для ELISA також запропоновані у даному описі та відомі середнім фахівцям у даній галузі техніки. Буфери для ELISA можуть містити, наприклад, сироватку або альбумін (такі як теляча сироватка, сироватка козла або БСА), знежирене сухе молоко, казеїн та/або желатин або будь-яку їх комбінацію. Деякі буфери для FACS запропоновані у даному описі, наприклад, у робочих прикладах. Буфери для FACS також можуть містити, наприклад, сироватку або альбумін (такі як теляча сироватка, сироватка козла або БСА) та/або азид натрію. Буфери для FACS також можуть містити ФСБ, EDTA та/або ДНКазу або будь-яку їх комбінацію.

[000243] Варіанти реалізації згідно із даним описом можуть бути додатково визначені за допомогою посилання на наступні необмежуючі приклади, які докладно описують одержання деяких антитіл згідно із даним описом та способів застосування антитіл згідно із даним описом. Фахівцям у даній галузі техніки буде очевидно, що багато модифікацій як матеріалів, так і способів можуть бути здійснені на практиці без відхилення від обсягу даного опису.

IX. ПРИКЛАДИ

[000244] Зрозуміло, що приклади та варіанти реалізації, описані у даному описі, призначені тільки для ілюстративних цілей та що фахівцям у даній галузі техніки будуть запропоновані різні модифікації або зміни у світлі цього, і такі модифікації або зміни повинні бути включені у суть та обсяг даної заявки.

Приклад 1: одержання гібридом CD37

[000245] Гібридами, які продукують моноклональні антитіла до CD37 людини, які підходять для імуногістохімічного (ІГХ) зафарбовування (антитіла згідно із даним описом), були обрані із приблизно 4800 гібридом. Гібридами одержували імунізацією мишей Balb/c дикого типу рекомбінантним антигеном CD37 hCD37-LEL, отриманим у E. coli. Цей антиген містить амінокислоти з 107 по 242 CD37 з 6xHis-міткою, доданою до 3'-кінця для полегшення очищення (SEQ ID NO:15). Імунізацію рекомбінантним білком CD37 проводили за допомогою підшкірної ін'єкції білку, емульгованого у повному ад'юванті Фрейнда (CFA) або неповному ад'юванті Фрейнда для стимуляції (Sigma) або ад'юванті для мишей Magic mouse adjuvant (Creative Diagnostics). Як правило, мишей імунізували п'ять разів із інтервалом у два тижні до одержання остаточної стимуляції за допомогою внутрішньоочеревиної ін'єкції імунізуючої речовини за три

дні до злиття.

[000246] Усього було проведено 5 незалежних злиттів з використанням клітин селезінки, які були отримані від імунізованих мишей Balb/c дикого типу та клітин мишачої мієломи P3X63Ag8.653 (клітини Р3). Злиття клітин проводили з використанням інструмента для електрозлиття ECM200 (BTX Harvard Apparatus) у відповідності зі стандартними протоколами. Кожне злиття приводило до утворення більше 1000 гібридом.

[000247] Антитіла, які продукуються цими гібридомами, піддавали скринінгу та підтверджували за допомогою ELISA з використанням різних рекомбінантних версій антигену CD37. hCD37-LEL містить амінокислоти з 107 по 242 CD37 людини з 6xHis-міткою, доданою до 3'-кінця для полегшення очищення (SEQ ID NO:15), та було отримано у *E. coli*. hCD37-Fc-LAGA містить амінокислоти з 107 по 235 CD37 людини з Fc-доменом IgG1 людини, доданим до 3'-кінця для полегшення очищення (SEQ ID NO:17), та було отримано у клітинах HEK-293T. hCD37-ECD-Fc містить амінокислоти з 107 по 235 CD37 людини з Fc-доменом IgG2a миші, доданим до 3'-кінця для полегшення очищення (SEQ ID NO:16), та було отримано у клітинах HEK-293T.

[000248] Для створення нативних умов рекомбінантні білки розводили безпосередньо у 50 мМ натрій-бікарбонатному буфері для сорбції (Sigma-Aldrich). Для створення денатуруючих умов рекомбінантні білки інкубували у 1% додецилсульфаті натрію (ДСН) з 50 мМ дитіотреїтолом (ДТТ) протягом 30 хвилин при 65°C з наступним інкубуванням з 100 мМ йодацетамідом протягом 30 хвилин при кімнатній температурі та потім розводили у 50 мМ натрій-бікарбонатному буфері для сорбції. Кожен рекомбінантний білок іммобілізували у концентрації приблизно 25-100 нг/лунку у планшетах для мікротитрування шляхом інкубування протягом ночі при 4°C.

[000249] Планшети промивали один раз ФСБ із додаванням 0,05% Tween-20 та блокували ФСБ із додаванням 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Планшети промивали три рази ФСБ із додаванням 0,05% Tween-20 та додавали у планшети супернатанти гібридом. Планшети інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі, промивали три рази, як описано вище, та інкубували з міченим ПХ вторинним антитілом козла до IgG миші (Jackson ImmunoResearch, розведення 1:5000) протягом однієї години при кімнатній температурі. Планшети промивали три рази, як описано вище, та виявляли зв'язане кон'юговане із ПХ антитіло за допомогою додавання субстрату ПХ ТМВ (Bio-FX). Планшети інкубували протягом приблизно 10 хвилин та потім розвиток зафарбовування зупиняли додаванням зупиняючого розчину (Bio-FX). Для кожного планшета вимірювали поглинання при довжині хвилі 450 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра. Супернатант гібридоми від 1B11 обумовлював сильний позитивний сигнал ELISA як у нативних, так і у денатуруючих умовах (див. Фіг. 1А) та був обраний для субклонування. Із клону 1B11 було отримано два субклони: 1B11-2 та 1B11-20. Супернатант гібридоми від обох субклонів обумовлював сильний позитивний сигнал ELISA як у нативних, так і у денатуруючих умовах (див. Фіг. 1В), та клон 1B11-2 був обраний для додаткового аналізу.

Приклад 2: визначення характеристик антитіл до CD37 за допомогою ELISA

[000250] Антитіло з 1B11-2 очищали з використанням стандартної хроматографії на білку А. Для порівняння використовували антитіло до CD37, яке реалізується Leica Biosystems (код продукту NCL-CD37). Зв'язування антитіл до CD37 досліджували за допомогою ELISA з рекомбінантними білками CD37 у якості антигену. Кожен рекомбінантний білок іммобілізували у концентрації приблизно 25-100 нг/лунку у планшетах для мікротитрування у натрій-бікарбонатному буфері для сорбції (Sigma-Aldrich) з використанням або нативних, або денатуруючих умов, як описано вище. Планшети промивали один раз ФСБ із додаванням 0,05% Tween-20 та блокували ФСБ із додаванням 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Планшети промивали три рази ФСБ із додаванням 0,05% Tween-20 та додавали у планшети очищені антитіла. Планшети інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі, промивали три рази, як описано вище, та інкубували з міченим ПХ вторинним антитілом козла до IgG миші (Jackson ImmunoResearch, розведення 1:5000) протягом однієї години при кімнатній температурі. Планшети промивали три рази, як описано вище, та виявляли зв'язане кон'юговане із ПХ антитіло за допомогою додавання субстрату ПХ (Bio-FX). Планшети інкубували протягом приблизно 10 хвилин та потім розвиток зафарбовування зупиняли додаванням зупиняючого розчину (Bio-FX). Для кожного планшета вимірювали поглинання при довжині хвилі 450 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометру. Характерні результати зв'язування з нативними hCD37-Fc-LAGA та hCD37-LEL наведені на Фіг. 2. Антитіло 1B11-2 зв'язується з обома нативними білками CD37 зі значно поліпшеною афінністю у порівнянні з NCL-CD37. Результати зв'язування з денатурованим білком hCD37-LEL наведені на

Фіг. 3. Антитіло 1B11-2 зв'язується з денатурованим білком hCD37-LEL зі значно поліпшеною афінністю у порівнянні з NCL-CD37.

Приклад 3. Визначення характеристик епітопу антигену

[000251] Зв'язування антитіл до CD37 додатково досліджували за допомогою ELISA з рекомбінантним білком CD37 hCD37-ECD-S2-Fc, використовуваним у якості антигену у нативних умовах, як описано вище. (S2 відноситься до другого сегменту великого позаклітинного домену CD37, що містить амінокислоти з 138 по 176). Характерні результати наведені на Фіг. 4. hCD37-ECD-S2-Fc містить амінокислоти з 107 по 109 та з 138 по 235 CD37 людини з Fc-доменом IgG2a миші, доданим до 3'-кінця для полегшення очищення (SEQ ID NO:18), та був отриманий у клітинах HEK-293T. Антитіло 1B11-2 не зв'язується з hCD37-ECD-S2-Fc, у той час як NCL-CD37 зберігає здатність до зв'язування із цим фрагментом білку CD37. Схожі результати спостерігали при аналізі методом вестерн-блоттингу.

Приклад 4. Імуногістохімічна оцінка антитіл до CD37

FFPE CD37 ІГХ

[000252] Очищене антитіло із клону 1B11-2 аналізували та порівнювали з моноклональним антитілом миші NCL-CD37 (Leica) за допомогою ІГХ. Аналіз проводили з використанням автоматизованого пристрою для зафарбовування Leica Bond RX та реагентів та умов, перерахованих у Таблиці 1.

Таблиця 1

Реагенти для ІГХ та умови аналізу

Стадія	Дія/Реагент (Vendor)	Час
Сушка	Температура: 60 °C	30 хвилин
Депарафінізація	розчин Bond Dewax Solution (Leica), 100% етанол чистий для аналізу (Arantik)	Встановлене
Демаскування антигену	розчин Bond Epitope Retrieval 1 (цитратний буфер на основі розчину з pH 6,0)	20 хвилин
Блокування ендогенної пероксидази	Пероксид (Leica)	5 хвилин
Досліджуваний зразок	отримані ImmunoGen, Inc. антитіла у різних концентраціях, отримані розведенням у розчині для розведення антитіл Leica Antibody Diluent	15 хвилин
Виявлення	реагент Post Primary Regent (Leica)	8 хвилин
	Полімер (Leica)	8 хвилин
	Змішаний DAB (Leica)	10 хвилин
Контрастне зафарбовування	Гематоксилін (Leica)	5 хвилин

[000253] Препарати, що містять фіксовані у формаліні та залиті парафіном (FFPE) зразки клітин, нормальні тканини, біоптати пухлин від пацієнтів з дифузійною великоклітинною В-клітинною лімфомою, біоптати пухлин від пацієнтів з фолікулярною лімфомою та біоптати пухлин від пацієнтів із хронічним лімфоцитарним лейкозом/лімфомою з малих лімфоцитів висушували при 60 °C та депарафінізували з використанням розчину Bond Dewax Solution та 100% етанолу. Проводили високотемпературне демаскування епітопу з використанням розчину Bond Epitope Retrieval 1 (цитратний буфер на основі розчину з pH 6,0) протягом 20 хвилин та блокували ендогенну пероксидазу пероксидом протягом 5 хвилин. Препарати інкубували з отриманим ImmunoGen, Inc. антитілом 1B11-2, антитілом NCL-CD37 (клон CT1) (Leica/Novocastra) або контрольним антитілом mIgG1 (Leica/Novocastra) у різних концентраціях протягом 15 хвилин. Зв'язані антитіла виявляли шляхом інкубування із системою виявлення Leica Bond Refine. Після нанесення антитіл препарати інкубували з реагентом Post Primary Regent (IgG кролика до IgG миші) протягом 8 хвилин, полімером (полімер козла до IgG кролика) протягом 8 хвилин та DAB (3,3-діамінобензидину тетрагідрохлорид) протягом 10 хвилин. Це забезпечувало сигнал коричневого кольору. Проводили контрастне зафарбовування препаратів гематоксиліном протягом 5 хвилин.

[000254] FFPE зразки нормальної тканини селезінки та мигдалини одержували із блоків тканин людини, отриманих від Mersey Health Systems та Arda's Corporation, як зазначено нижче. FFPE зразки клітин одержували з ліній клітин Дауді та Ramos, що поставляються DSMZ (Німецька колекція мікроорганізмів та клітинних культур), а лінія клітин Намальви була надана Американською колекцією тканинних культур. Препарати, що містять зрізи зразків, одержували

з FFPE блоків з використанням мікротома, встановленого на 5 мкм, та фіксували під позитивно заряджені предметні стекла. Ці препарати залишали для сушіння на повітрі протягом ночі перед зафарбовуванням. Мікропанелі нормальних тканин людини були придбані у Pantomics, а мікропанелі тканин неходжкінської лімфоми були придбані у TriStar Technology Group LLC.

5

Таблиця 2

FFPE досліджувані зразки

Тип тканини людини	Комерційне джерело
Нормальна селезінка (2)	Mercy Health Systems
Нормальна мигдалина (3)	Mercy Health Systems (2) and Arda's Corporation (1)
Мікропанель нормальних тканин	Pantomics
Мікропанель тканин неходжкінської лімфоми	TriStar Technology Group LLC

[000255] Інтенсивність зафарбовування CD37 та структуру розподілу оцінювали у порівнянні з контрольним зафарбовуванням IgG (неспецифічного), а зафарбовування 1B11-2 порівнювали з зафарбовуванням, спостережуваним для моноклонального антитіла миші NCL-CD37 (Leica). Інтенсивність оцінювали за шкалою від 0 до 3, де 0 = відсутність зафарбовування, 1 = слабе зафарбовування, 2 = помірне зафарбовування та 3 = сильне зафарбовування. Рівномірність зафарбовування оцінювали як негативну (відсутність позитивно пофарбованих клітин), фокальну (<25% пофарбованих клітин), гетерогенну (25-75% пофарбованих клітин) та гомогенну (>75% пофарбованих клітин). Інтенсивність зафарбовування та шкали оцінки описані нижче. Усі зафарбовування були оцінені патологом, що пройшов професійну сертифікацію.

10

15

Таблиця 3

Інтенсивність та рівномірність зафарбовування

Інтенсивність (кількість зафарбовування мембран)		Рівномірність (відсоток позитивних клітин)	
0	Негативна	0	Негативна
1	Слабка	Фокальна	<25%
2	Помірна	Гетерогенна (гетеро)	25-75%
3	Сильна	Гомогенна (гомо)	>75%

Валідація очищеного антитіла 1B11-2 для FFPE CD37 IGH

[000256] Очищене антитіло із клону 1B11-2, розведене до концентрації 8,4 мкг/мл, 4,2 мкг/мл та 2,1 мкг/мл у розчині для розведення антитіл Leica Antibody Diluent (забуферений трисом сольовий розчин, поверхнево-активна речовина та стабілізатор білку з 0,35% ProClin™ 950) використовували для зафарбовування CD37-позитивних контрольних зразків (нормальної мигдалини людини, клітин Дауді, клітин Ramos та клітин Намальви). Антитіло оцінювали за специфічністю до CD37, обумовленою прийнятим зафарбовуванням мембрани та специфічністю у CD37-позитивних зразках. Цей клон також порівнювали з МАТ миші NCL-CD37 (клон СТ1), розведеним до 4,2 мкг/мл у розчині для розведення антитіл Leica Antibody Diluent з використанням тих же CD37-позитивних тканин та клітин людини. Антитіло NCL-CD37 (Leica) забезпечувало прийнятне зафарбовування мембран у кожному з CD37-позитивних осадів клітин та прийнятне зафарбовування мембран у зародкових центрах та мантийних зонах тканини мигдалин (і ті, і інші позитивні по CD37) поряд з до деякої міри низьким ядерним фоном та відсутністю зафарбовування у міжфолікулярній області мигдалини (негативна по CD37). 1B11-2 демонструвало прийнятне зафарбовування мембран у CD37-позитивних зразках та гарну специфічність із додатковою перевагою у вигляді повної відсутності зафарбовування ядерного фону (див. Фіг. 5 для порівняння зображень для 1B11-2 та МАТ миші NCL-CD37 (Leica)). 1B11-2 забезпечувало зафарбовування мембран зі структурою, аналогічною тій, яку спостерігали при застосуванні моноклонального антитіла миші NCL-CD37 (Leica); однак це зафарбовування мембран було більш специфічним та більш чітким, ніж одержуване при застосуванні антитіла NCL-CD37 (Leica). Також важливо відзначити, що 1B11-2 не приводило до зафарбовування у міжфолікулярній області мигдалини (негативна по експресії CD37), що демонструє підвищену специфічність. Для 1B11-2 була експериментально визначена підходяща для зафарбовування концентрація, що становить 4,2 мкг/мл.

20

25

30

35

40

[000257] 1B11-2, розведене до концентрації 4,2 мкг/мл у розчині для розведення антитіл Leica Antibody Diluent, також використовували для зафарбовування мікропанелі нормальних тканин людини (придбаної у Pantomics) та тканин мигдалини та селезінки людини для оцінки специфічності. 1B11-2 знову порівнювали з моноклональним антитілом миші NCL-CD37 (Leica), розведеним до концентрації 4,2 мкг/мл у розчині для розведення антитіл Leica Antibody Diluent, на тих же нормальних тканинах мигдалини та селезінки, а також мікропанелі нормальних тканин людини. У більшості нормальних тканин (за винятком мигдалини та селезінки) моноклональне антитіло миші NCL-CD37 (Leica) демонструвало зафарбовування тільки у розсіяних лімфоцитарних клітинах, залишаючи іншу частину тканин негативною. Спостерігали деяке фонове рожеве зафарбовування у цитоплазмі клітин Панета тонкого кишечника та у острівкових клітинах підшлункової залози (див. Фіг. 6). Антитіло NCL-CD37 (Leica) забезпечувало прийнятне зафарбовування мембран у зародкових центрах та мантийних зонах нормальної мигдалини людини та у крайовій зоні у нормальних тканинах селезінки людини, хоча і з деяким низькорівневим ядерним фоном. Було відсутнє зафарбовування у міжфолікулярній області мигдалини або червоній пульпі селезінки при застосуванні антитіла NCL-CD37 (Leica). 1B11-2 демонструвало прийнятне зафарбовування мембран у зародкових центрах та мантийних зонах нормальної мигдалини людини та у крайовій зоні у нормальних тканинах селезінки людини та зафарбовування тільки у розсіяних лімфоцитах у нормальних тканинах, що залишилися, без якого-небудь фонового зафарбовування (див. Фіг. 6). Було відсутнє зафарбовування у міжфолікулярній області мигдалини або червоній пульпі селезінки. Ці результати показують, що 1B11-2 є кращим з погляду чутливості зафарбовування, специфічності та зниженого фону, усі з яких мають вирішальне значення для високоякісного виконання та аналізу досліджень методом ІГХ.

Приклад 5. Оцінка антитіла 1B11-2 до CD37 за допомогою ІГХ з використанням зразків пухлин людини.

[000258] Зразки пухлин людини, типові для дифузійної великоклітинної В-клітинної лімфому (n=52), фолікулярної лімфому (n=20) та хронічного лімфоцитарного лейкозу/лімфому з малих лімфоцитів (n=8) (усі включені у мікропанель тканин неходжкінської лімфому, придбану у TriStar Technology Group LLC) оцінювали відносно експресії CD37 за допомогою ІГХ із використанням антитіла 1B11-2. Інтенсивність зафарбовування CD37 та розподіл значень підсумовано у Таблиці 4 нижче. На Фіг. 7 показаний приклад зафарбовування тканин дифузійної великоклітинної В-клітинної лімфому та фолікулярної лімфому із застосуванням антитіла 1B11-2. Ці результати демонструють переваги 1B11-2 у якості більш специфічного та чутливого антитіла для застосування у дослідженнях за допомогою ІГХ для оцінки експресії CD37 у тканинах пацієнтів з неходжкінською лімфомою.

Таблиця 4

Розподіл значень (% позитивних результатів)

ТИП ПУХЛИНИ:	ДИФУЗНА ВЕЛИКОКЛІТИННА В-КЛІТИННА ЛІМФОМА n=52	ФОЛІКУЛЯРНА ЛІМФОМА n=20	ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЦИТАРНИЙ ЛЕЙКОЗ/ЛІМФОМА З НЕВЕЛИКИХ ЛІМФОЦИТІВ n=8
Позитивна (будь-яка інтенсивність):	96%	95%	100%
≥ рівня 2 інтенсивність при фарбуванні щонайменше 25% пухлинних клітин:	58%	35%	50%
≥ рівня 3 інтенсивність при фарбуванні щонайменше 25% пухлинних клітин:	60%	100%	100%

[000259] Антитіло 1B11-2 та моноклональне антитіло миші NCL-CD37 (Leica) порівнювали з використанням мікропанелі тканин неходжкінської лімфому (TMA) (придбаної у TriStar Technology Group LLC). При застосуванні антитіла NCL-CD37 у ІГХ аналізі (аналіз CD37) 27% зразків дифузійної великоклітинної В-клітинної лімфому (14 з 52), 85% зразків фолікулярної лімфому (17 з 20) та 37% зразків хронічного лімфоцитарного лейкозу/лімфому з малих лімфоцитів (3 з 8) були віднесені до вищої категорії (рівень 3 інтенсивності зафарбовування на щонайменше 25% пухлинних клітин, Таблиця 5). Навпаки, антитіло 1B11-2 у аналізі ІГХ, описаному вище, з використанням набору Leica Bond Refine Detection Kit на автоматизованому пристрої для зафарбовування препаратів Leica Bond Rx забезпечувало зафарбовування з

підвищеною чутливістю та специфічністю 59% зразків дифузійної великоклітинної В-клітинної лімфоми (31 з 52), 95% зразків фолікулярної лімфоми (19 з 20) та 100% зразків хронічного лімфоцитарного лейкозу/лімфоми з малих лімфоцитів (8 з 8), забезпечуючи зафарбовування, яке було віднесено до вищої категорії (рівень 3 інтенсивності зафарбовування на щонайменше 25% пухлинних кліток, Таблиця 5). Антитіло 1B11-2 також дозволяло виявляти експресію CD37 на низькому рівні у трьох зразках дифузійної великоклітинної В-клітинної лімфоми, тоді як антитіло NCL-CD37 (Leica) не дозволяло виявити цей низький рівень експресії. Ці результати показують, що 1B11-2 є кращим з погляду чутливості та специфічності зафарбовування та забезпечує більший динамічний діапазон зафарбовування CD37.

Таблиця 5

Порівняння поширеності CD37 у TMA неходжкінської лімфоми

Значення	Дифузна великоклітинна В-клітинна лімфома (n=52)		Фолікулярна лімфома (n=20)		Хронічний лімфоцитарний лейкоз/лімфома з невеликих лімфоцитів (n=8)	
	NCL-CD37	1B11-2	NCL-CD37	1B11-2	NCL-CD37	1B11-2
Позитивне (будь-яка інтенсивність)	47 (90%)	50 (96%)	19 (95%)	19 (95%)	8 (100%)	8 (100%)
≥ рівня 1 інтенсивність при фарбуванні щонайменше 25% пухлинних клітин:	26 (50%)	11 (21%)	0	0	0	0
≥ рівня 2 інтенсивність при фарбуванні щонайменше 25% пухлинних клітин:	33 (63%)	30 (58%)	12 (60%)	7 (35%)	7 (88%)	4 (50%)
≥ рівня 3 інтенсивність при фарбуванні щонайменше 25% пухлинних клітин:	14 (27%)	31 (60%)	17 (85%)	19 (95%)	3 (38%)	8 (100%)

Приклад 6. Картування домену

Картування домену за допомогою денатуруючого електрофорезу у ДСН-ПААГ та вестерн-блоттингу

[000260] Здатність розпізнавати різні препарати злитих з Fc CD37-ECD досліджували у денатуруючому електрофорезі у ДСН-ПААГ з наступним вестерн-блоттингом для 1B11-2 (ліва панель) при прямому порівнянні з антитілом, що поставляється на ринок, до CD37 (Leica; права панель). Препарати злитих з Fc CD37-ECD денатурували шляхом інкубування у буфері Леммлі (Laemmli), що містить 70 mM β-меркаптоетанолу, при 100 °C протягом 10 хвил. та розділяли електрофорезом у поліакриламідному гелі, що містить ДСН, з наступним електрофоретичним переносом на мембрани із ПВДФ. Мембрани блокували 5% знежиреним молоком у забуференому трисом сольовому розчині з 0,1% Tween-20 (TBST) протягом 1 години при кімнатній температурі. Первинні антитіла застосовували протягом ночі з наступним виявленням за допомогою вторинного F(ab)₂ до IgG миші, кон'югованого з пероксидазою хрину, протягом 1 год. при кімнатній температурі. Блоти проявляли з використанням посиленого виявлення хемілюмінесценції після застосування стандартних технік. Результати показані на Фіг. 8. У той час як антитіло Leica розпізнає всі три препарати Fc-CD37 ECD, антитіло 1B11-2 згідно із даним винаходом розпізнає тільки hCD37-ECD-Fc та hCD37-Fc-LAGA, але не hCD37-ECD-S2-Fc. Конструкція hCD37-ECD-S2-Fc не містить сегмента S1 (амінокислоти 110-137) CD37 ECD. Таким чином, область амінокислот 110-137 має критичне значення для розпізнавання епітопу із застосуванням 1B11-2, але не антитіла Leica.

Картування домену за допомогою нативного електрофорезу у ПААГ та вестерн-блоттингу

[000261] Здатність розпізнавати різні препарати злитих з Fc CD37-ECD досліджували у нативному електрофорезі у ПААГ з наступним вестерн-блоттингом для 1B11-2. Препарати злитих з Fc CD37-ECD завантажували у буфер для зразків для нативного електрофорезу та розділяли електрофорезом SDS у поліакриламідному гелі з наступним електрофоретичним переносом на мембрани із ПВДФ або зафарбовуванням гелю Кумассі діамантовим блакитним. Мембрани із ПВДФ блокували 5% знежиреним молоком у забуференому трисом сольовому розчині з 0,1% Tween-20 (TBST) протягом 1 години при кімнатній температурі. Первинне

антитіло застосовували протягом ночі з наступним виявленням за допомогою вторинного F(ab)₂ до IgG миші, кон'югованого з пероксидазою хрину, протягом 1 год при кімнатній температурі. Блот проявляли з використанням посиленого виявлення хемілюмінесценції після застосування стандартних технік. Результати показані на Фіг. 9. Відповідно до даних денатуруючого електрофорезу у ДСН-ПААГ (Фіг. 8) та експериментів ELISA (див. Фіг. 4) антитіло 1B11-2 згідно із даним винаходом розпізнає тільки hCD37-ECD-Fc та hCD37-Fc-LAGA, але не hCD37-ECD-S2-Fc. Ці дані показують, що сегмент S1 (амінокислоти 110-137) CD37 ECD або його частина має критичне значення для розпізнавання епітопу 1B11-2 (ліва панель Фіг. 9). Зафарбовування гелю Кумассі діамантовим блакитним (права панель Фіг. 9) показує, що білок hCD37-ECD-S2-Fc був присутній у достатніх для виявлення із застосуванням 1B11-2 кількостях.

Приклад 7. Клонування та секвенування областей VL та VH антитіла до CD37 людини

[000262] Загальну кількість клітинної РНК одержували з 5×10^6 клітин гібридами проти CD37 людини 1B11-2, описаної вище, з використанням набору RNeasy kit (QIAgen) відповідно до протоколу виробника. Потім синтезували кДНК із першого ланцюга загальної РНК із використанням набору для синтезу кДНК SuperScript III (Invitrogen).

[000263] Процедури ПЛР для ампліфікації кДНК варіабельної області антитіла, отриманої із клітин гібридами, були основані на способах, описаних Wang et al. ((2000) J Immunol Methods. 233:167-77) та Co et al. ((1992) J Immunol. 148:1149-54). Послідовності варіабельної області легкого ланцюгу (VL) та варіабельної області важкого ланцюгу (VH) ампліфікували за допомогою вироджених праймерів на 5'-кінці та специфічних до константної області мишачого каппа або IgG1 праймерів на 3'-кінці. Реакційні суміші після ПЛР потім піддавали електрофорезу у гелі з 1% легкоплавкої агарози, потім вирізали зони амплікону від 300 до 400 п.о., які потім очищали з використанням міні-колонок Zymo DNA. Очищені амплікони відправляли у Beckman Coulter Genomics для секвенування з використанням тих же 5'- та 3'-праймерів реакцій ПЛР для одержання послідовності кДНК варіабельної області у обох напрямках.

[000264] Вироджені праймери, використовувані для клонування послідовностей кДНК VL та VH, змінюють 5'-кінець, тому були необхідні додаткові дії щодо секвенування для перевірки повних послідовностей кДНК варіабельної області. Попередні послідовності були введені у пошуковий запит сайту NCBI IgBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) для ідентифікації послідовностей мишачих зародкових ліній, з яких були отримані послідовності антитіл. Праймери для ПЛР потім були сконструйовані таким чином, щоб відпал відбувався на пов'язаний із зародковою лінією лідерній послідовності мишачого антитіла, щоб ця нова реакція ПЛР приводила до повної послідовності кДНК варіабельної області, не зміненої праймерами для ПЛР. Реакції ПЛР, очищення зон та секвенування виконували, як описано вище.

[000265] Послідовності кДНК варіабельних областей, отримані для антитіла до CD37 людини, поєднували з послідовностями константних областей зародкової лінії, щоб одержати послідовності кДНК повнорозмірного антитіла. Молекулярні маси важкого та легкого ланцюгів потім обчислювали за допомогою трансляцій послідовностей кДНК та порівнювали з молекулярними масами, отриманими аналізом методом LC/MS очищеного мишачого антитіла до CD37 людини. Спостережувані молекулярні маси для легкого та важкого ланцюгів мишачого 1B11-2 відповідали очікуваним значенням, підтверджуючи правильність послідовностей кДНК.

[000266] Послідовності CDR VH та VL наведено у Таблицях 1 та 2, відповідно. Послідовності VH та VL наведено у Таблицях 3 та 4, відповідно. Повнорозмірні послідовності важкого ланцюгу та легкого ланцюгу наведено у Таблицях 5 та 6, відповідно. Полінуклеотидні послідовності VH та VL наведено у Таблиці 8.

[000267] Усі публікації, патенти, заявки на патенти, інтернет-сайти та номери доступу/послідовності баз даних (включаючи як полінуклеотидні, так і поліпептидні послідовності), які цитуються у даному описі, даним включені за допомогою посилання у всій їх повноті у всіх відношеннях тією самою мірою, як якби кожна окрема публікація, патент, заявка на патент, інтернет-сайт або номер доступу/послідовність баз даних була конкретно та індивідуально позначена як включена за допомогою посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 <110> IMMUNOGEN, INC.
 <120> АНТИТІЛА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ CD37
 <130> 2921.075PC02
 10 <150> 62/212,183
 <151> 2015-08-31
 <150> 62/211,455
 <151> 2015-08-28
 15 <160> 34
 <170> PatentIn, версія 3.5
 20 <210> 1
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 1
 Met Ser Ala Gln Glu Ser Cys Leu Ser Leu Ile Lys Tyr Phe Leu Phe
 1 5 10 15
 30 Val Phe Asn Leu Phe Phe Phe Val Leu Gly Ser Leu Ile Phe Cys Phe
 20 25 30
 Gly Ile Trp Ile Leu Ile Asp Lys Thr Ser Phe Val Ser Phe Val Gly
 35 35 40 45
 Leu Ala Phe Val Pro Leu Gln Ile Trp Ser Lys Val Leu Ala Ile Ser
 50 55 60
 40 Gly Ile Phe Thr Met Gly Ile Ala Leu Leu Gly Cys Val Gly Ala Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Arg Cys Leu Leu Gly Leu Tyr Phe Gly Met Leu Leu Leu
 85 90 95
 45 Leu Phe Ala Thr Gln Ile Thr Leu Gly Ile Leu Ile Ser Thr Gln Arg
 100 105 110
 Ala Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Gln
 115 120 125
 50 Lys Tyr Gly Thr Asn Pro Glu Glu Thr Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp
 130 135 140
 Tyr Val Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp
 55 145 150 155 160
 Trp Phe Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg
 165 170 175

	Val	Pro	Cys	Ser	Cys	Tyr	Asn	Leu	Ser	Ala	Thr	Asn	Asp	Ser	Thr	Ile	
				180					185					190			
5	Leu	Asp	Lys	Val	Ile	Leu	Pro	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu	Gly	His	Leu	Ala	
			195					200					205				
	Arg	Ser	Arg	His	Ser	Ala	Asp	Ile	Cys	Ala	Val	Pro	Ala	Glu	Ser	His	
		210					215					220					
10	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Cys	Ala	Gln	Gly	Leu	Gln	Lys	Trp	Leu	His	Asn	
	225					230					235					240	
	Asn	Leu	Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ile	Cys	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Leu	Glu	
					245					250					255		
15	Leu	Gly	Phe	Met	Thr	Leu	Ser	Ile	Phe	Leu	Cys	Arg	Asn	Leu	Asp	His	
				260					265					270			
	Val	Tyr	Asn	Arg	Leu	Ala	Arg	Tyr	Arg								
20			275					280									
	<210>	2															
	<211>	843															
	<212>	ДНК															
25	<213>	Homo sapiens															
	<400>	2															
	atgtcagccc	aggagagctg	cctcagcctc	atcaagtact	tcctcttcgt	tttcaacctc										60	
30	ttctttcttcg	tcctcggcag	cctgatcttc	tgcttcggca	tctggatcct	cattgacaag										120	
	accagcttcg	tgtcctttgt	gggcttggcc	ttcgtgcctc	tgcagatctg	gtccaaagtc										180	
	ctggccatct	caggaatctt	caccatgggc	atcgccctcc	tgggttggtg	gggggccctc										240	
35	aaggagctcc	gctgcctcct	gggcctgtat	tttgggatgc	tgctgctcct	gtttgccaca										300	
	cagatcaccc	tgggaatcct	catctccact	cagcgggccc	agctggagcg	aagcttgagg										360	
40	gacgtcgtag	agaaaacat	caaaaagtac	ggcaccaacc	ccgaggagac	cgcggccgag										420	
	gagagctggg	actatgtgca	gttccagctg	cgctgctgcg	gctggcacta	cccgcaggac										480	
	tggttccaag	tcctcatcct	gagaggtaac	gggtcggagg	cgcaccgcgt	gccctgctcc										540	
45	tgctacaact	tgctggcgac	caacgactcc	acaatcctag	ataaggtgat	cttgccccag										600	
	ctcagcaggc	ttggacacct	ggcgcgggtc	agacacagtg	cagacatctg	cgctgtccct										660	
50	gcagagagcc	acatctaccg	cgagggtgct	gcgcagggcc	tccagaagtg	gctgcacaac										720	
	aaccttattt	ccatagtggg	catttgccctg	ggcgtcggcc	tactcgagct	cgggttcctg										780	
	acgtctctga	tattcctgtg	cagaaacctg	gaccacgtct	acaaccggct	cgctcgatac										840	
55	cgt															843	
	<210>	3															
	<211>	5															

```

    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

    <220>
5    <223> muCD37-1B11-2 VH-CDR1

    <400> 3

    Gly Tyr Phe Met Asn
10   1           5

    <210> 4
    <211> 17
    <212> PRT
15   <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (Кабат)

20   <400> 4

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

25   Gly

    <210> 5
    <211> 12
30   <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> muCD37-1B11-2 VH -CDR3
35   <400> 5

    Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val
    1           5           10

40   <210> 6
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
45   <220>
    <223> muCD37-1B11-2 VL-CDR1

    <400> 6
50   Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp Val Asp
    1           5           10

    <210> 7
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

    <220>

```

<223> muCD37-1B11-2 VL-CDR2

<400> 7

5 Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> muCD37-1B11-2 VL-CDR3

15 <400> 8

Cys His Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Thr
1 5

20 <210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

25 <220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга (VH) muCD37-1B11-2

<400> 9

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
35 20 25 30

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

40 Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Gly Ser Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val Trp Gly
50 100 105 110

Ala Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser
115 120

55 <210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга mCD37-1B11-2

<400> 10

5

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

10

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

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

15

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

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

20

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

25

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

<210> 11

<211> 444

<212> PRT

30

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Повний важкий ланцюг mCD37-1B11-2

35

<400> 11

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

40

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

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

45

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

50

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

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

55

Gly Ser Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	
	130						135					140					
5	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	145				150						155					160	
	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
					165					170					175		
10	Val	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	
15			195					200					205				
	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	
	210						215					220					
20	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	
	225				230						235					240	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	
				245					250						255		
25	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
				260				265						270			
	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	
30			275					280					285				
	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	
	290						295					300					
35	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	
	305				310						315					320	
	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	
				325						330					335		
40	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	
				340				345						350			
	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	
45			355					360					365				
	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	
	370						375					380					
50	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	
	385				390						395					400	
	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	
				405				410						415			
55	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	
				420				425					430				
	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys					

435 440

<210> 12
 <211> 213
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Повний легкий ланцюг mCD37-1B11-2
 10 <400> 12

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
 20 20 25 30
 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 20 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ser Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Thr
 85 90 95
 30 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110
 Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 115 120 125
 35 Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 130 135 140
 40 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 45 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 50 Asn Arg Asn Glu Cys
 210

55 <210> 13
 <211> 376
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> VH muCD37-1B11-2

<400> 13
 5 gaggttcaac tgctgcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatctact ggctacttta tgaactgggt gatacagagc 120
 catggaaagg gccttgagtg gattggacgt attaatcctt acaatgggtga taccttctac 180
 10 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctctac cacagcccac 240
 atggagctcc tgagcctgac atctgaggac tctgccgtct attattgtgg atcccggggg 300
 15 atagtggctt cctctagggt cttcgatgac tggggcgagc ggacctcggc catcgtctcc 360
 tcagccaaaa cgacac 376

<210> 14
 20 <211> 327
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 25 <223> VL muCD37-1B11-2

<400> 14
 agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc 60
 30 ataacctgca aggccagtca ggggtgtgagt aatgatgtag attggtacca acagaagcca 120
 gggcagctctc ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccttgat 180
 cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttactttca gcatcagcac tgtgcaggct 240
 35 gaagacctgg cagtttattt ctgtcaccag gattatacct ctccgacgtt cgggtggaggc 300
 accaagctgg aaatcaaacg ggctgat 327

<210> 15
 40 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 45 <223> hCD37-LEL

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

	50		55		60	
	Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr					
	65		70		75	80
5	Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu					
		85		90		95
10	Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala					
		100		105		110
	Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys					
		115		120		125
15	Ala Gln Gly Leu Gln Lys Trp Leu His Asn Asn Leu Ser Phe Leu Glu					
		130		135		140
	Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His					
	145		150		155	160
20	His His His His					
	<210> 16					
25	<211> 368					
	<212> PRT					
	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
30	<223> hCD37-ECD-Fc					
	<400> 16					
35	Gly Pro Glu Phe Leu Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gln Leu Glu Arg Ser					
	1		5		10	15
	Leu Arg Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro					
		20		25		30
40	Glu Glu Thr Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu					
		35		40		45
	Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile					
	50		55		60	
45	Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr					
	65		70		75	80
	Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu					
50		85		90		95
	Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala					
		100		105		110
55	Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys					
		115		120		125
	Ala Gln Gly Leu Gln Gly Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro					
	130		135		140	

	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	145	150	155	160
5	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	165	170	175	
	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	180	185	190	
10	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	195	200	205	
	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	210	215	220	
15	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	225	230	235	240
	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	245	250	255	
	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	260	265	270	
25	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	275	280	285	
	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	290	295	300	
30	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	305	310	315	320
	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	325	330	335	
	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	340	345	350	
40	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys	355	360	365	
	<210>	17																		
45	<211>	361																		
	<212>	PRT																		
	<213>	Штучна послідовність																		
	<220>																			
50	<223>	hCD37-Fc-LAGA																		
	<400>	17																		
	Gly	Pro	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Thr	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu	Glu	Arg	Ser	1	5	10	15
55	Leu	Arg	Asp	Val	Val	Glu	Lys	Thr	Ile	Gln	Lys	Tyr	Gly	Thr	Asn	Pro	20	25	30	

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
355 360

5 <210> 18
<211> 340
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> hCD37-ECD-S2-Fc
<400> 18

15 Gly Pro Glu Phe Leu Ile Ser Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val
1 5 10 15
Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe
20 20 25 30
Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro
35 40 45
Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp
25 50 55 60
Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser
65 70 75 80
30 Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr
85 90 95
Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu Gln Gly Ser Glu Pro Arg Gly Pro
100 105 110
35 Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu
115 120 125
Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
40 130 135 140
Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
145 150 155 160
45 Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
165 170 175
Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
180 185 190
50 Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
195 200 205
Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
55 210 215 220
Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
225 230 235 240

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
245 250 255

5 Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
260 265 270

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
275 280 285

10 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
290 295 300

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
305 310 315 320

15 Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
325 330 335

Thr Pro Gly Lys
20 340

<210> 19
<211> 129
<212> PRT
25 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> hCD37

30 <400> 19

Leu Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asp Val
1 5 10 15

35 Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro Glu Glu Thr Ala
20 25 30

Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly
35 40 45

40 Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn
50 55 60

Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala
45 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser
85 90 95

50 Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala
100 105 110

Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu
115 120 125

55 Gln

<210> 20

<211> 136
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> hCD37
 <400> 20
 10 Leu Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asp Val
 1 5 10 15
 Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro Glu Glu Thr Ala
 20 25 30
 15 Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly
 35 40 45
 20 Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn
 50 55 60
 Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 25 Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser
 85 90 95
 Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala
 100 105 110
 30 Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu
 115 120 125
 Gln Lys Trp Leu His Asn Asn Leu
 35 130 135
 <210> 21
 <211> 101
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> hCD37
 45 <400> 21
 Leu Ile Ser Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu
 1 5 10 15
 50 Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile
 20 25 30
 Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr
 35 40 45
 55 Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu
 50 55 60
 Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala

	65		70		75		80									
	Asp	Ile	Cys	Ala	Val	Pro	Ala	Glu	Ser	His	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Cys
				85						90					95	
5	Ala	Gln	Gly	Leu	Gln											
				100												
	<210>	22														
10	<211>	5														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
15	<223>	VH-CDR1	huCD37-3													
	<400>	22														
	Thr	Ser	Gly	Val	Ser											
20	1			5												
	<210>	23														
	<211>	9														
	<212>	PRT														
25	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	VH-CDR2	huCD37-3													
	<400>	23														
30																
	Val	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn							
	1				5											
35	<210>	24														
	<211>	7														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
40	<223>	VH-CDR3	huCD37-3													
	<400>	24														
45	Gly	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	His									
	1			5												
	<210>	25														
	<211>	11														
50	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	VL-CDR1	huCD37-3													
55	<400>	25														
	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Leu	Ala					
	1			5						10						

```

    <210> 26
    <211> 7
    <212> PRT
5   <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> VL-CDR2 huCD37-3

10  <400> 26

Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1           5

15  <210> 27
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

20  <220>
    <223> VL-CDR3 huCD37-3

    <400> 27

25  Gln His Tyr Trp Gly Thr Thr Trp Thr
1           5

    <210> 28
    <211> 115
30  <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> VH huCD37-3 v. 1.0

35  <400> 28

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

40  Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
           20           25           30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Ser Leu Lys
           50           55           60

50  Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65           70           75           80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
           85           90           95

55  Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100          105          110

Val Ser Ser

```

115

<210> 29
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> VL huCD37-3
 10
 <400> 29

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

 <210> 30
 35 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 40 <223> Важкий ланцюг (HC) huCD37-3 v. 1.0

 <400> 30

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
5 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

10 <210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Легкий ланцюг huCD37-3
<400> 31

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

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

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

Asn Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
30 50 55 60

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

35 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp Gly Thr Thr Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

40 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
45 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

50 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

55 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 32
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> VH huCD37-3 v. 1.1

<400> 32

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 444
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Важкий ланцюг (HC) huCD37-3 v. 1.1

<400> 33

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

5 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

10 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 34
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> VH-CDR2 muCD37-1B11-2 (AbM)
 20 <400> 34

Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe
 1 5 10
 25

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла, що специфічно зв'язується з CD37, де зазначене антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка містить послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну SEQ ID NO: 9, і відрізняється від SEQ ID NO: 9 лише консервативними амінокислотними замінами за межами CDR, та варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка містить послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну SEQ ID NO: 10, і відрізняється від SEQ ID NO: 10 лише консервативними амінокислотними замінами за межами CDR.
2. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла за п. 1, де зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент являє собою антитіло миші або його антигензв'язуючий фрагмент, гуманізоване, химерне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент або антитіло людини чи його антигензв'язуючий фрагмент.
3. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла за будь-яким з пп. 1-2, що являє собою повнорозмірне антитіло.
4. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла за будь-яким з пп. 1-2, що являє собою антигензв'язуючий фрагмент.
5. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла за п. 4, де зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить Fab, Fab', F(ab')₂, одноланцюговий Fv або scFv, стабілізований дисульфідним зв'язком Fv, IgGΔCH2, F(ab')₃, DVD-Ig, mAb2, (scFv)₂ або scFv-Fc.
6. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла за будь-яким з пп. 1-5, що зв'язується з CD37 людини зі значенням K_d, що становить 1,0 нМ, або краще.
7. Антитіло або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла за будь-яким з пп. 1-5, де зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент помічено міткою з можливістю виявлення.
8. Спосіб виявлення експресії CD37 у зразку, який включає приведення зазначеного зразку у контакт з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом зазначеного антитіла за будь-яким з пп. 1-7.
9. Спосіб за п. 8, де експресію CD37 визначають за допомогою імуногістохімічного (ІГХ) аналізу.
10. Застосування терапевтично активного агента, що містить антитіло до CD37 або антигензв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла, для підвищення ефективності терапії лікування раку, де зазначене застосування включає введення вказаного терапевтично активного агента суб'єкту, який має рак, при цьому у зразку пухлини від зазначеного суб'єкта

виявляють підвищену експресію CD37 із застосуванням антитіла або антигензв'язуючого фрагмента зазначеного антитіла за будь-яким з пп. 1-7.

11. Застосування за п. 10, де зазначене виявлення здійснюють методом імуногістохімії (ІГХ).

12. Застосування за п. 10 або 11, де зазначений рак являє собою лейкоз або лімфому.

5 13. Застосування за будь-яким з пп. 10-12, де зазначений рак вибраний з групи, яка складається з В-клітинних лімфом, неходжкінської лімфоми (НХЛ), В-клітинного лімфобластного лейкозу/лімфоми з клітин-попередників та новоутворень зі зрілих В-клітин, В-клітинного хронічного лімфоцитарного лейкозу (ХЛЛ)/лімфоми з невеликих лімфоцитів (ЛМЛ), В-клітинного пролімфоцитарного лейкозу, лімфоплазмочитарної лімфоми, мантийноклітинної лімфоми (МКЛ), фолікулярної лімфоми (ФЛ), ФЛ низького ступеня злоякісності, середнього ступеня злоякісності та високого ступеня злоякісності, шкірної лімфоми з клітин фолікулярного центра, В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони, MALT-типу В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони, вузлового типу В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони, В-клітинної лімфоми з клітин маргінальної зони селезінки, волосатоклітинного лейкозу, дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми, лімфоми Беркітта, плазмочитоми, плазмочітинної мієломи, посттрансплантаційного лімфопроліферативного захворювання, макроглобулінемії Вальденстрема та анапластичної великоклітинної лімфоми (АВКЛ).

14. Застосування за п. 10, де зазначений рак являє собою дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому.

20 15. Застосування за будь-яким з пп. 10-14, де терапевтично активний агент являє собою кон'югат антитіло-майтанзиноїд, що містить антитіло до CD37, що містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить послідовність SEQ ID NO: 28, та варіабельну область легкого ланцюга, яка містить послідовність SEQ ID NO: 29.

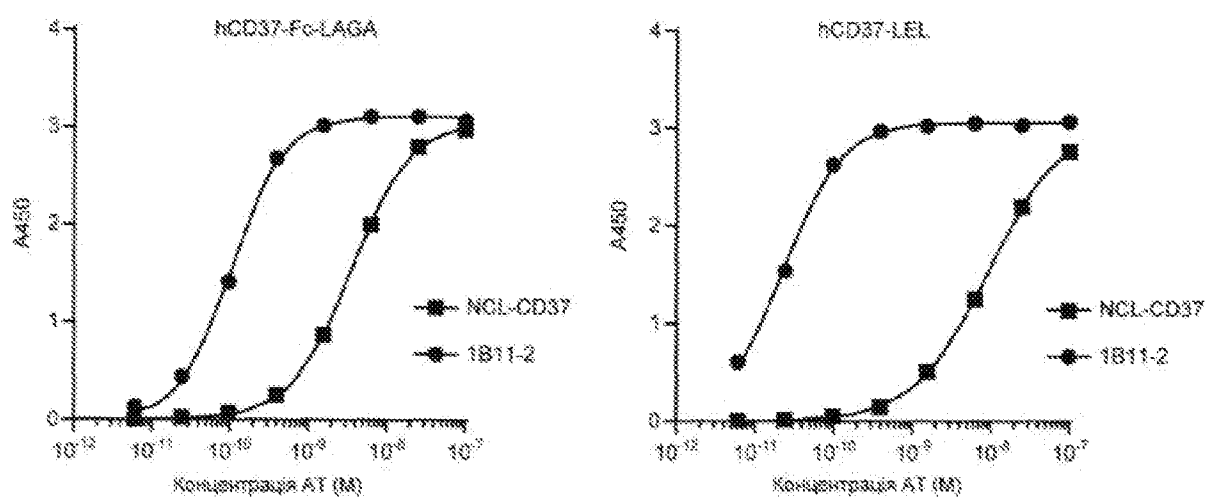
25 16. Застосування за п. 15, де терапевтично активний агент містить мایتанзиноїд DM1 та нерозщеплюваний SMCC лінкер, причому антитіло до CD37 містить повнорозмірний важкий ланцюг, який містить SEQ ID NO: 30, та повнорозмірний легкий ланцюг, який містить SEQ ID NO: 31.

Антитіло	Концентрація	hCD37-Fc-LAGA		hCD37-ECD-Fc		hCD37-LEL	
		нативне	денатуро-ване	нативне	денатуро-ване	нативне	денатуро-ване
1B11	супернатант	3,0	3,1	3,0	3,1	3,0	1,7
Leica NCL-CD37	10 мг/мл	2,8	3,2	2,7	3,1	3,0	2,8
	5 мг/мл	2,8	3,1	2,4	3,1	3,0	2,0
	2,5 мг/мл	2,4	3,1	2,2	3,1	3,0	1,8

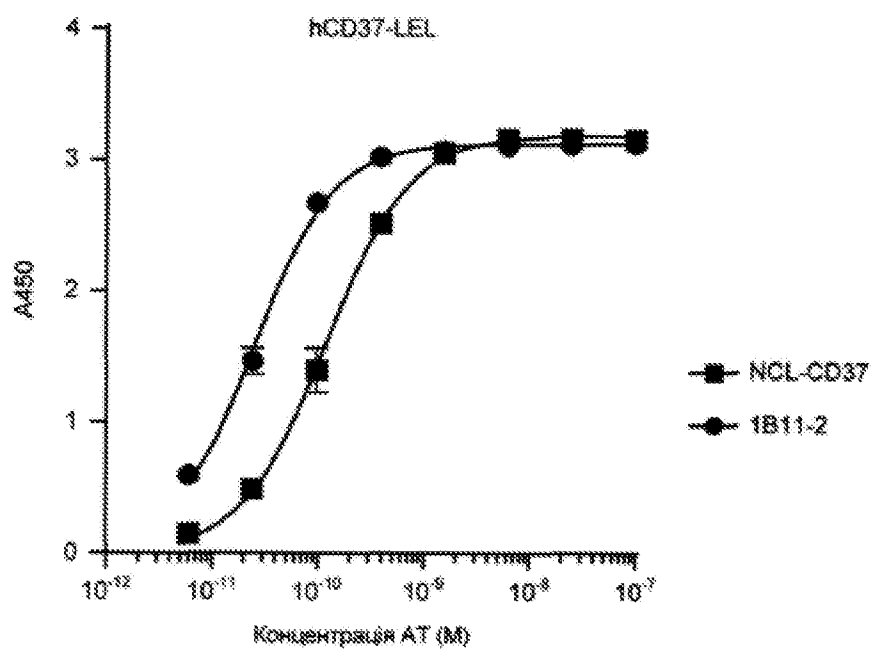
Фіг. 1А

Антитіло	Концентрація	hCD37-Fc-LAGA		hCD37-LEL	
		Напівне	Денатур.-Відновл.	Напівне	Денатур.-Відновл.
1B11-2	супернатант	3,3	3,3	3,2	3,3
1B11-20	супернатант	3,2	3,2	3,2	3,2
Leica NCL-CD37	10 мкг/мл	2,9	3,3	2,7	3,3
	5 мкг/мл	2,5	3,2	2,4	3,2
	2,5 мкг/мл	2,1	3,2	2,0	3,2

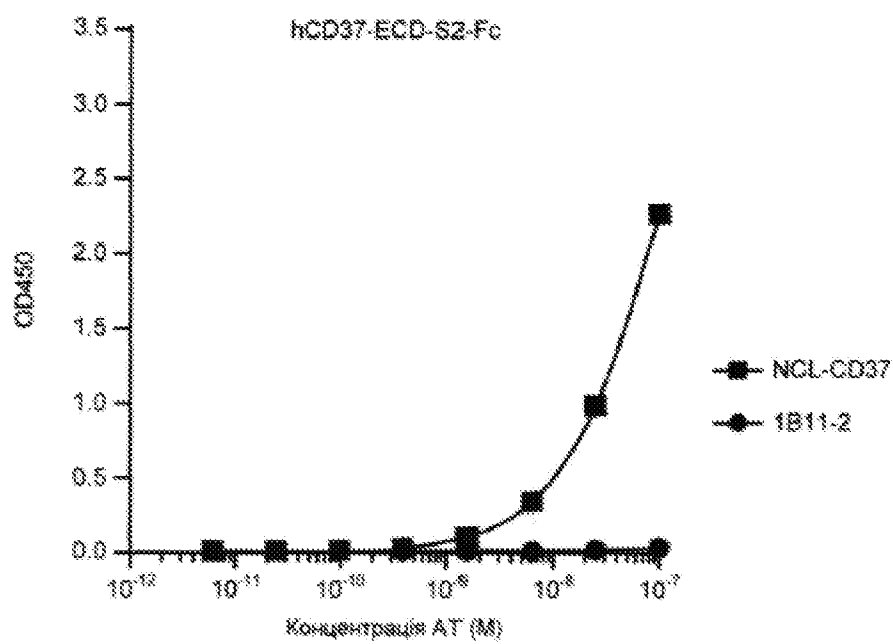
Фіг. 1В



Фіг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

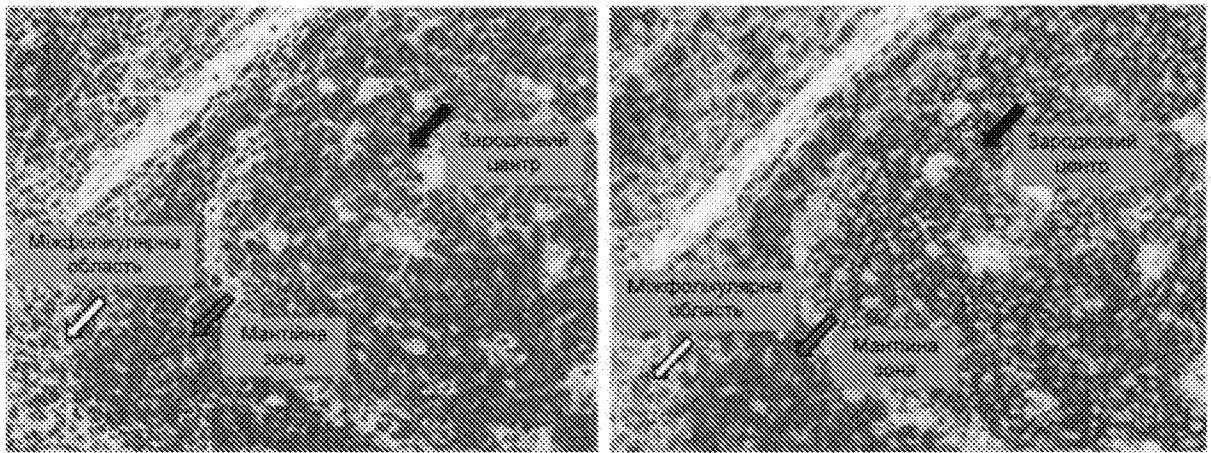


Fig. 5

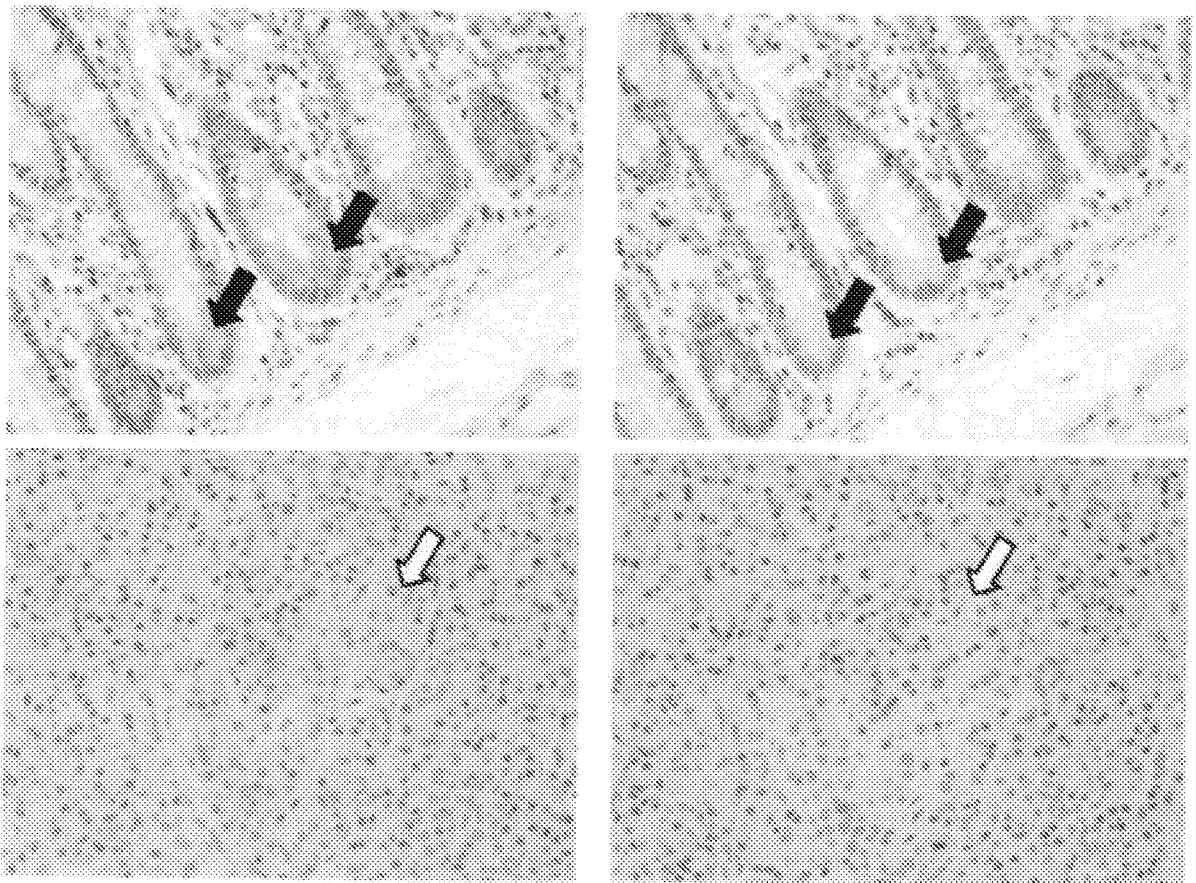
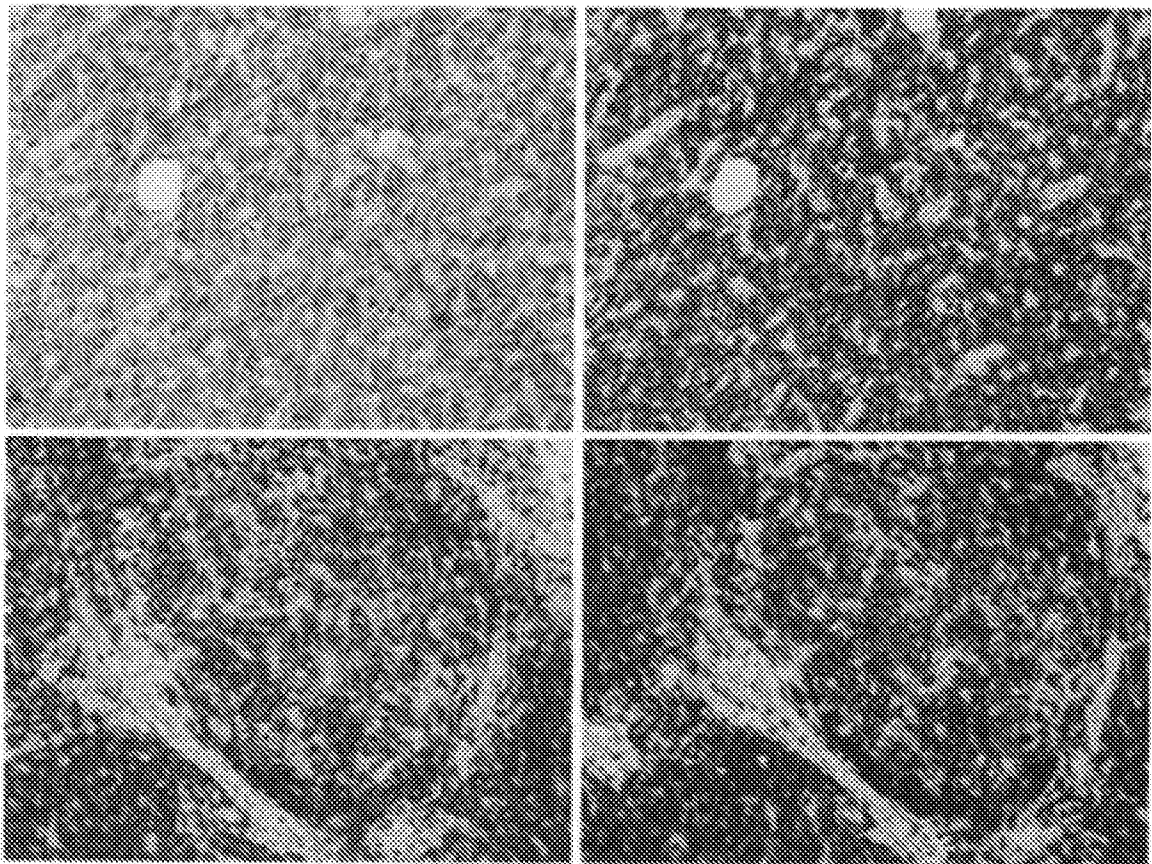
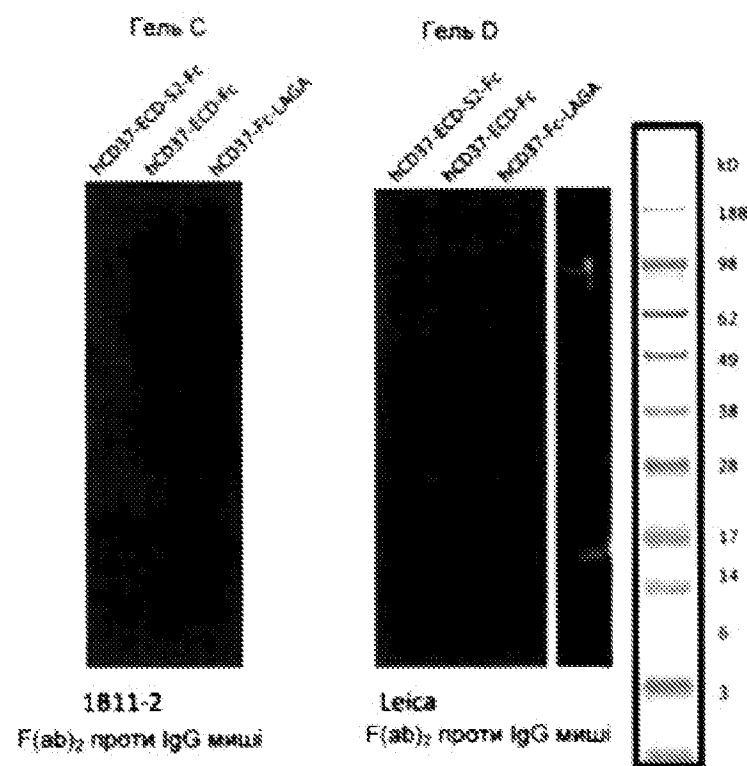


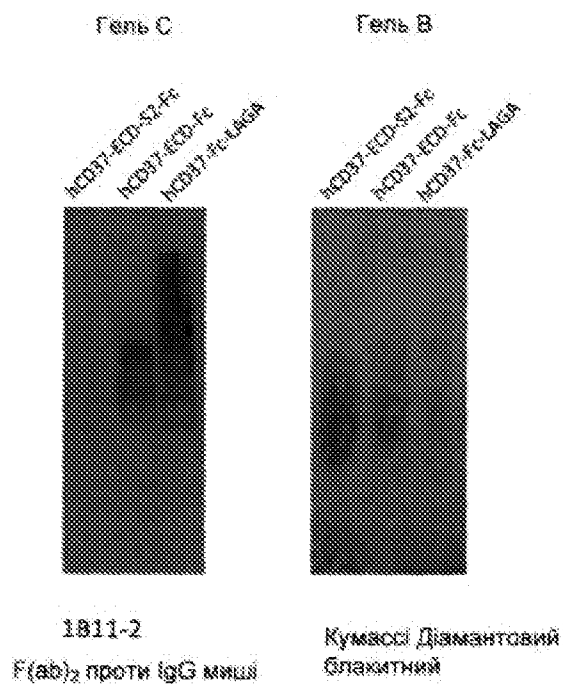
Fig. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9