

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11)

027499

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: 2017.08.31

(21) Номер заявки: 201000274

(22) Дата подачи: 2008.08.08

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 35/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD37

(31) 07114128.7

(32) 2007.08.09

(33) EP

(43) 2010.10.29

(86) PCT/EP2008/060464

(87) WO 2009/019312 2009.02.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Хайдер Карл-Хайнц, Боргес Эрик,
Остерманн Элинборг (DE)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н.,
Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б., Каксис
Р.А., Комарова О.М., Белоусов Ю.В. (RU)

(56) WO-A-2005017148

DATABASE BIOSIS [Online], BIOSCIENCES
INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA,
PA, US; 1984, BOULIANNE G.L. ET AL.:
"PRODUCTION OF FUNCTIONAL CHIMERIC
MOUSE-HUMAN ANTIBODY", XP001084103,
Database accession no. PREV198528056203,
the whole document, & NATURE (LONDON),
vol. 312, no. 5995, 1984, pages 643-646, ISSN:
0028-0836

US-B1-6548640

WO-A-2007041635

WO-A-2007014278

(57) В изобретении описаны химерные и гуманизированные антитела к CD37 и содержащие их фармацевтические композиции, предназначенные для лечения В-клеточных злокачественных заболеваний и аутоиммунных и воспалительных болезней, в патологии которых участвуют В-клетки.

B1

027499

027499

B1

Введение

Изобретение относится к иммунотерапии, основанной на В-клеточном истощении. В частности, настоящее изобретение относится к молекулам антител к CD37, предназначенным для применения в указанной терапии, например для лечения В-клеточных злокачественных и аутоиммунных состояний.

Иммунотерапия на основе моноклональных антител (МАт) представляет собой безопасный и избирательный метод лечения рака и других заболеваний. В частности, роль моноклональных антител в различных терапиях, направленных на В-клеточное истощение, которые предназначены, например, для лечения В-клеточных злокачественных заболеваний, повысилась с появлением ритуксимаба (Rituxan®), антитела к антигену CD20, присутствующему на В-клеточной поверхности. В многочисленных исследованиях подтверждена эффективность ритуксимаба при его применении в качестве индивидуального агента и в качестве компонента комбинированной терапии при неходжкинской лимфоме (NHL) низкой степени злокачественности (Hiddemann et al., 2005a; Hiddemann et al., 2005b; Hainsworth, 2004; McLaughlin et al., 1998), лимфомы из клеток зоны мантии (Forstpointner et al., 2004; Kahl et al., 2006; Foran et al., 2000; Howard et al., 2002; Romaguera et al., 2005), диффузной крупноклеточной лимфомы (DLCL) (Coiffier et al., 1998; Feugier et al., 2005), и лейкоза/лимфомы Беркитта (Thomas et al., 2006). Однако ответ на терапию был выявлен только у подпопуляции пациентов и у большинства из них обнаружен рецидив после лечения ритуксимабом. Таким образом, рассматривается возможность применения новых терапевтических средств, мишенью которых являются В-клетки, потенциально более эффективных, чем терапия, направленная на CD20, которые предназначены для лечения В-клеточных злокачественных заболеваний (Zhao et al., 2007).

Антиген CD37 представляет собой антиген клеточной поверхности, который до настоящего времени не рассматривался в качестве мишени при В-клеточных злокачественных заболеваниях в такой же степени, как и антиген CD20.

CD37, который является представителем суперсемейства тетраспанинов, представляет собой высокогликозилированную молекулу клеточной поверхности, характеризующуюся наличием 4 трансмембранных доменов и 2 внеклеточных петель. CD37 экспрессируется практически исключительно на зрелых В-клетках, при этом установлено, что наиболее высокий уровень экспрессии имеет место на В-клетках периферической крови, более низкие уровни характерны для плазматических клеток и невыявляемые уровни для CD10⁺-В-клеток-предшественников в костном мозге. Обнаружен также низкий уровень экспрессии CD37 на покоящихся и активированных Т-клетках, гранулоцитах и моноцитах. При В-клеточном неоплазме экспрессия CD37 обнаружена в основном при агрессивной неходжкинской лимфоме (NHL) и хроническом лимфолейкозе (CLL). Высокий уровень экспрессии CD37 обнаружен также при лимфоме из клеток зоны мантии (MCL). Указанная схема экспрессии делает CD37 привлекательной мишенью для опосредуемой антителом терапии рака.

CD37 впервые описан в 1986 г. и охарактеризован с использованием мышиного моноклонального антитела MB-1 (Link et al., 1986).

Физиологическая роль CD37 остается неизвестной. У мышей с дефицитом CD37 не обнаружено изменений в развитии и составе клеток лимфоидных органов, но они имеют пониженные уровни IgG1 и ослабленные опосредуемые Т-клетками иммунные ответы (Knobeloch et al., 2000). Исследования CD37^{-/-}-Т-клеток позволяют предположить участие CD37 в пролиферации Т-клеток (van Spriel et al., 2004).

Описано, что CD37 экспрессируется на злокачественных В-клетках при различных заболеваниях. CD37 экспрессируется при большинстве связанных с зрелыми В-клетками злокачественных заболеваний типа лимфомы Беркитта, фолликулярной лимфомы и лимфоцитарной лимфомы (Link et al., 1986). Высокие уровни экспрессии CD37 обнаружены при волосовоклеточном лейкозе и в образцах, полученных из организма пациентов, страдающих хроническим лимфолейкозом (CLL) и различными подтипами неходжкинской лимфомы (NHL), включая лимфому из клеток зоны мантии (MCL) (Schwartz-Albiez et al., 1988; Barrena et al., 2005). В одном из исследований описано применение микромассива антител для иммунофенотипирования CD37, при этом было установлено, что CD37 является хорошим средством дискриминации злокачественных CLL-клеток (высокий уровень экспрессии CD37) и здоровых лимфоцитов периферической крови (PB) (низкий уровень экспрессии CD37) (Belov et al., 2001).

Связывание специфического в отношении CD37 МАт с раковыми клетками может "запускать" различные механизмы действия: во-первых, после связывания антитела с внеклеточным доменом антигена CD37 оно может активировать каскад комплемента, что приводит к лизису клетки-мишени. Во-вторых, антитело к CD37 может приводить к антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC) в отношении клетки-мишени, что имеет место после того, как Fc-фрагмент связанного антитела распознается соответствующими рецепторами на цитотоксических клетках иммунной системы.

В-третьих, антитело может изменять способность В-клеток реагировать на антиген или другие стимулы. И, наконец, антитело к CD37 может инициировать запрограммированную гибель клеток (апоптоз).

МАт к CD37 MB-1 оценивали в двух опытах с использованием радиоиммунотерапии на страдающих В-NHL пациентах (В-клеточная неходжкинская лимфома; Press et al., 1989; Kaminski et al., 1992). В одном опыте вводили в терапевтических дозах ¹³¹I-MB-1 6 пациентами с рецидивом NHL, и при этом у всех 6 пациентов выявлена клиническая полная ремиссия (CR), медианная продолжительность которой

составляла 7 месяцев. Следует отметить, что у двух из шести пациентов клинический регресс обнаружен уже при введении MB-1 с применением только следовых количеств радиоактивного изотопа (в качестве метки), что позволяет предположить наличие непосредственного противоопухолевого действия самого антитела. Во втором опыте меченное радиоактивным изотопом MB-1 применяли для лечения пациентов, страдающих рефракторной NHL, и при у 3 из изучаемых 9 пациентов обнаружены объективные ответы ограниченной продолжительности (Kaminski et al., 1992). В обоих опытах обнаружено быстрое и кратковременное истощение периферических В-клеток после инъекции меченного следовыми количествами радиоактивной метки антитела MB-1. Эти данные позволяют сделать заключение о цитотоксической активности, присущей самому антителу MB-1. В целом, эти клинические опыты подчеркивают возможность целенаправленного воздействия на CD37 с целью лечения В-клеточных злокачественных заболеваний и свидетельствуют о потенциальной клинической пригодности терапии на основе антител к CD37.

Получено экспериментальное доказательство с использованием CD37-специфических напоминающих антитело одноцепочечных молекул ("Small Modular ImmunoPharmaceutical", SMIP) того, что лечение с помощью этих молекул индуцирует апоптоз *in vitro* и замедляет рост лимфомы Беркитта на модели ксенотрансплантата *in vivo*. В настоящее время описана антиапоптотная активность рекомбинантной анти-CD37 SMIP Tru16.4 фирмы Trubiony (Zhao et al., 2004). Tru 16.4 индуцирует независимый от каспаз апоптоз первичных CLL-клеток, полученных из организма страдающих опухолью пациентов. Индукция апоптоза этих клеток оказалась выше, чем при применении ритуксимаба, и сопоставима с индукцией апоптоза, вызываемой антагонистом CD52 алемтузумабом. Степень индукции апоптоза была прямо пропорциональна уровню экспрессии CD37 на клеточной поверхности, и ее можно было повышать сшиванием с антителом к человеческому IgG. Корреляция экспрессии CD37 и ADCC продемонстрирована на клеточных линиях *in vitro*. При оценке на мышиной модели лимфомы Беркитта (Raji) обработка scFv к CD37 обладала приемлемой терапевтической эффективностью (Zhao et al., 2007). Эти данные являются первым доказательством того, что направленное воздействие на CD37 представляет собой перспективный подход для целенаправленной противоопухолевой терапии, связанной с индукцией апоптоза и ADCC.

Таким образом, было установлено, что антиген CD37 часто экспрессируется на опухолевых клетках при некоторых человеческих В-клеточных злокачественных состояниях и на зрелых здоровых В-лимфоцитах и что терапия, основанная на применении антител к CD37, может представлять собой перспективный подход к лечению В-клеточных злокачественных состояний. Истощение CD37-позитивных здоровых В-клеток не рассматривается в качестве имеющего решающее значение, поскольку клинические данные, полученные для многочисленных пациентов, свидетельствуют о том, что даже пролонгированное В-клеточное истощение вплоть до 6 месяцев при применении МАт к CD20 не приводило к существенному снижению уровней IgG в сыворотке или к повышению риска возникновения инфекций (Van der Kolk et al., 2002).

Хотя установлено, что антитела к CD37 и описанные выше напоминающие антитела молекулы (MB-1 и SMIP Tru16.4) обладают противоопухолевой эффективностью в отношении В-клеточных злокачественных заболеваний и могут оказывать целенаправленное воздействие на CD37, все еще существует потребность в альтернативных ингибиторах CD37 с целью повышения эффективности терапии, основанной на В-клеточном истощении.

Краткое изложение сущности изобретения

Объектом изобретения являются новые антагонисты CD37, предназначенные для лечения В-клеточных злокачественных заболеваний и других нарушений, которые реагируют на истощение CD37-позитивных В-клеток.

Кроме того, объектом изобретения являются антитела к CD37 с улучшенными эффекторными функциями. В частности, изобретение относится к МАт к CD37, обладающим антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC).

Для решения задачи, лежащей в основе изобретения, применяли мышиное моноклональное антитело к CD37 в качестве исходного антитела для создания химерных и гуманизированных антител к CD37, которые можно применять для лечения человека.

Первым объектом настоящего изобретения является молекула антитела, которая связывается с человеческим CD37 и которая выведена из

а) мышиного моноклонального антитела, характеризующегося тем, что оно содержит

I) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; и

II) вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; или которая выведена из

б) нечеловеческого антитела, которое распознает такой же эпитоп человеческого CD37, что и антитело, указанное в подпункте а), или распознает эпитоп, который расположен вблизи (примыкает) или перекрывает указанный эпитоп;

где молекула антитела представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

Как будет понятно из изложенного ниже, антитело, "выведенное" из другого антитела, т.е. исходное антитело, означает, что антитело создано с помощью модификации исходного антитела согласно описанному ниже методу.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула антитела представляет собой молекулу химерного или гуманизированного антитела, выведенную из исходного антитела, указанного в подпункте а). Антитело, имеющее родственную последовательность, обозначено как G28.1, и оно описано в WO 2005/017148.

Исходное антитело категории, описанной в подпункте б), можно, например, выбирать из CD37-специфических антител, типа антитела G28.1, антигеном которого является CD37, характеристики которых описаны в трудах третьей рабочей группы по HLDA (человеческие лейкоцитарные дифференцировочные антигены); эти антитела обозначены как HD28, HH1, BI14, F97-3G6 (Ling и MacLennan, 1987). Другие описанные CD37-специфические антитела включают RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 и IPO-24. Согласно данным Moldenhauer, 2000 и Schwartz-Albiez et al., 1988, все эти антитела (включая G28.1) распознают одинаковый или близкий, или перекрывающийся эпитоп CD37. Schwartz-Albiez et al., 1988, установили, что этот эпитоп расположен в углеводном фрагменте CD37. Некоторые из вышеуказанных антител поступают в продажу, например, HH1 (фирма SantaCruz), RFB-7 (фирма Biodesign), Y29/55 (фирма Biogenesis), M-B371 (фирма BD Biosciences), M-B372 (фирма SantaCruz) и IPO-24 (фирма AbCam).

К другим CD37-специфическим антителам относятся S-B3 (фирма Biosys), NMN46 (фирма Chemicon) и ICO-66 (фирма Bioprobe). Распознает ли антитело такой же эпитоп, что и G28.1, можно определять с помощью конкурентных анализов связывания или радиоиммуноанализов перекрестного ингибирования, описанных у Moldenhauer et al., 1987 и Moldenhauer, 2000.

Конкурентное связывание можно определять, например, с помощью ELISA, с использованием планшетов, сенсibilизированных белком CD37 или пептидами CD37 или CD37-позитивными клетками (клеточный ELISA), и оценки связывания биотинилированного антитела в присутствии конкурентного антитела-кандидата. В присутствии конкурентного антитела или полученного из антитела фрагмента связывание биотинилированного G28.1 (или другого антитела, для которого известно, что оно распознает такой же эпитоп) уменьшается в случае, когда антитела распознают общий эпитоп. Для идентификации пептидного эпитопа G28.1 фрагменты или короткие полипептиды или рекомбинантные белки, полученные из последовательности CD37, можно синтезировать или получать и оценивать связывание G28.1 с указанными пептидами/полипептидами с помощью ELISA. Конкурентное связывание можно оценивать также с помощью FACS-анализов, описанных в примерах.

Антитело, указанное в подпункте б), можно применять аналогично G28.1 в качестве исходного антитела с целью создания химерных или гуманизированных молекул антител.

Исходное антитело категории, указанной в подпункте б), можно создавать также *de novo* с использованием пептидов или белковых фрагментов, содержащих соответствующий эпитоп, или молекул ДНК, кодирующих указанные пептиды/фрагменты соответственно, для иммунизации с получением антител, обладающих реактивностью в отношении того же эпитопа, что и G28.1.

Исходное антитело, указанное в подпункте б), можно получать также путем иммунизации целыми клетками, несущими соответствующий эпитоп; полученные для этой цели клетки гибридомы затем можно подвергать скринингу в отношении конкурентного связывания секретируемых антител.

Понятие "молекула антитела к CD37" относится к антителам к CD37 и фрагментам антител к CD37, а также к конъюгатам, включающим молекулы антител. Согласно настоящему изобретению антитела включают химерные моноклональные и гуманизированные моноклональные антитела. Понятие "антитело", которое используют взаимозаменяемо с понятием "молекула антитела", включает полноразмерные иммуноглобулины (в том виде, в котором они продуцируются лимфоцитами и, например, присутствуют в сыворотке крови), моноклональные антитела, секретируемые клеточными линиями гибридом, полипептиды, продуцируемые путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, которые характеризуются специфичностью связывания иммуноглобулинов или моноклональных антител, и молекулы, которые выведены из антител путем модификации или дополнительного процессинга с сохранением их специфичности связывания.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела к CD37 представляет собой химерное антитело, характеризующееся тем, что оно содержит:

I) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; и

II) вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

III) константные области тяжелой и легкой цепей человеческого происхождения.

Конструирование и получение химерных мышиных/человеческих антител хорошо известно в данной области (Boulianne et al., 1984). Как правило, вариабельные области нечеловеческого антитела связывают по меньшей мере с частью (Fc) константной области человеческого иммуноглобулина. Последовательности ДНК человеческих константных областей можно выделять согласно методам, хорошо из-

вестным в данной области, из различных человеческих клеток, предпочтительно из immortalized В-клеток (см. Kabat et al., 1991; и WO 87/02671). Молекулы антитела могут содержать всю константную область или ее часть, если они обладают специфичностью связывания с антигеном CD37 и Fc-рецепторами. Выбор типа и длины константной области зависит от того, требуются ли эффекторные функции типа фиксации комплемента или антитело-обусловленной клеточнозависимой токсичности, и от требуемых фармакологических свойств молекулы антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, предлагаемая в изобретении, представляет собой химерное CD37-специфическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи нечеловеческого антитела, указанного в подпункте а) или б), слитую с константной областью тяжелой цепи человеческого IgG1, и вариабельную область легкой цепи нечеловеческого антитела, указанного в подпункте а) или б), слитую с человеческой константной областью легкой каппа-цепи.

Согласно другому варианту осуществления изобретения молекула антитела представляет собой химерное CD37-специфическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 2, слитую с константной областью тяжелой цепи человеческого IgG1, которая представляет собой молекулу IgG1, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 24 (кодирующая последовательность ДНК: SEQ ID NO: 23), или выведенную из нее мутантную молекулу IgG1, и которая содержит вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 4, слитую с человеческой константной областью легкой каппа-цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 26 (кодирующая последовательность ДНК: SEQ ID NO: 25).

Другие человеческие константные области, применяемые для создания химерного нечеловеческого исходного антитела, указанного в подпункте а) или б), известны специалистам в данной области, например, можно использовать IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE или IgM (вместо IgG1) или лямбда-цепь (вместо каппа-цепи). Константные области могут быть химерными, например, представлять собой химеру тяжелой цепи IgG1/IgG2 или IgG1/IgG3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела к CD37 представляет собой гуманизированное антитело, для которого характерно следующее:

I) CDR, входящие в вариабельную область тяжелой цепи, имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и

II) CDR, входящие в вариабельную область легкой цепи, имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4,

III) каркасные участки, поддерживающие указанные CDR, выведены из человеческого антитела,

IV) константные области тяжелой и легкой цепей получены из человеческого антитела.

Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных, крысиных или кроличьих) антител представляют собой иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие молекулы, несущие подпоследовательности антител), которые содержат минимальные последовательности, выведенные из нечеловеческого иммуноглобулина.

Гуманизированные антитела включают иммуноглобулины (из антитела-реципиента), в которых остатки из гипервариабельных участков (CDR) антитела-реципиента заменены остатками из CDR антител из видов кроме человека (антитело-донор), таких как мышиное, крысиное или кроличье антитело, обладающее требуемой специфичностью, аффинностью и потенциалом. В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие нечеловеческие остатки.

В гуманизированных антителах, предлагаемых в изобретении, последовательности, кодирующие CDR нечеловеческого исходного антитела, указанного в подпункте а) или б), трансплантируют в соответствующие гены тяжелых и легких цепей человеческого иммуноглобулина.

Под "гипервариабельными участками" (CDR) моноклонального антитела подразумевают аминокислотные последовательности, участвующие в специфическом связывании антигена согласно номенклатуре Кэбота (Kabat et al., 1991), которые согласуются с номенклатурой Chothia и Lesk, 1987. Из последовательностей вариабельных областей, представленных в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, последовательность CDR определяют общепринятыми методами на основе поиска на основе особенностей последовательностей с использованием базы данных последовательностей Кэбота.

Методы получения гуманизированных антител хорошо известны специалистам в данной области, в том числе описаны в US 5225539; US 6548640 и US 6982321.

Соответствующие остатки каркасного участка антитела с трансплантированным CDR можно превращать в мышиные остатки с целью повышения аффинности к связыванию. Как описано выше, на основе известных в данной области методов эксперта должно быть очевидно, как получать CDR из конкретного нечеловеческого антитела, как выбирать и получать соответствующие гены человеческих иммуноглобулинов, трансплантировать CDR в эти гены, модифицировать отобранные каркасные участки, экспрессировать антитело с трансплантированным CDR в соответствующих клетках-хозяевах, например, клетках яичника китайского хомячка (CHO), и как оценивать полученные рекомбинантные антитела в отношении аффинности к связыванию и специфичности.

Для получения гуманизированного антитела вырезают антигенсвязывающие сайты, которые образованы из CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи, из ДНК клеток, секретирующих моноклональное антитело грызуна (мыши) и трансплантируют в ДНК, кодирующую каркасный участок человеческого антитела.

Альтернативно методу трансплантации CDR нечеловеческие, в частности мышинные, антитела к CD37 можно гуманизировать с помощью так называемой технологии "шлифовки", при которой каркасные участки грызунов оставляют в неизменном виде за исключением выставленных на поверхности остатков, как описано в US 5639641.

Следующим объектом изобретения являются гуманизированные антитела, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых представлена в SEQ ID NO: 6, последовательность вариабельной области легкой цепи выбрана из группы последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22.

Следующим объектом изобретения являются гуманизированные антитела, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность вариабельной области легкой цепи выбрана из группы последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22.

Следующим объектом изобретения являются гуманизированные антитела, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых представлена в SEQ ID NO: 10, последовательность вариабельной области легкой цепи выбрана из группы последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22.

Описанные выше гуманизированные антитела представлены в табл. 1.

В определенных вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело несет константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 и константную область человеческой легкой каппа-цепи. Как описано выше для химерных антител, константные области можно выбирать из других классов и подклассов антител.

В определенных вариантах осуществления изобретения в гуманизированных антителах, предлагаемых в изобретении, константная область тяжелой цепи человеческого IgG1 представляет собой молекулу IgG1, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 24, или выведенную из нее мутантную молекулу IgG1, а константная область человеческой легкой каппа-цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

Молекулы антител к CD37, предлагаемые в изобретении, могут представлять собой также варианты антител, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в перечне последовательностей. С помощью доступных общепринятых методов специалист в данной области может получать, оценивать и использовать функциональные варианты указанных выше антител. Примерами являются варианты антител, у которых изменено по меньшей мере одно положение в CDR и/или каркасном участке, варианты антител с заменами одной аминокислоты в каркасном участке, что представляет собой отклонение от последовательности зародышевой линии, антитела с консервативными аминокислотными заменами, антитела, которые кодируются молекулами ДНК, гибридизующимися в строгих условиях с молекулами ДНК, представленными в перечне последовательностей, которые кодируют вариабельные области цепей антитела.

С учетом свойств индивидуальных аминокислот можно осуществлять рациональные замены с получением вариантов антител, которые сохраняют общую молекулярную структуру исходного антитела. Аминокислотные замены, т.е. "консервативные замены", можно осуществлять, например, на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобной, гидрофильной и/или амфипатической природы соответствующей аминокислоты. Специалисту в данной области известны общепринятые аминокислотные замены, что описано, например, в WO 2007/042309, и методы получения указанных модифицированных антител. На основе генетического кода и методов рекомбинации и синтеза ДНК можно с использованием общепринятых методов создавать молекулы ДНК, кодирующие варианты антител с одной или несколькими консервативными аминокислотными заменами, и легко получать соответствующие антитела.

По сравнению с антителом, которое имеет вариабельные области цепей, последовательность которых представлена в перечне последовательностей, варианты антител, предлагаемых в изобретении, могут иметь последовательности, которые идентичны последовательностям CDR-участков по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70% или 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%. В предпочтительных антителах последовательность CDR-участков характеризуется сходством по меньшей мере на уровне 80%, более предпочтительно 90% и наиболее предпочтительно 95%. У предпочтительных вариантов антител последовательности вариабельных областей идентичны по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70 или 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%. У предпочтительных антител последовательности вариабельных областей характеризуется сходством по меньшей мере на уровне 80%, более предпочтительно 90% и наиболее предпочтительно 95%.

"Идентичность последовательностей" двух полипептидных последовательностей характеризуют процентом аминокислот, которые являются идентичными в последовательностях. "Сходство последовательностей" характеризуют процентом аминокислот, которые либо являются идентичными, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены.

Вариант можно получать также, используя антитело, которое имеет конкретную последовательность, представленную в перечне последовательностей, в качестве исходной точки для оптимизации и диверсификации одного или нескольких аминокислотных остатков, предпочтительно аминокислотных остатков в одном или нескольких CDR, и последующего скрининга образовавшейся библиотеки вариантов антител в отношении вариантов с улучшенными свойствами. Установлено, что можно использовать диверсификацию одного или нескольких аминокислотных остатков в CDR3 вариательной области легкой цепи, CDR3 вариательной области тяжелой цепи, CDR1 вариательной области легкой цепи и/или CDR2 вариательной области тяжелой цепи. Для осуществления диверсификации можно применять методы, известные в данной области, например, так называемую TRIM-технологии, описанную в WO 2007/042309.

В другом варианте осуществления изобретения молекула антитела к CD37 представляет собой антитело с "созревшей аффинностью".

Антитела к CD37 с "созревшей аффинностью" представляет собой антитело к CD37, выведенное из антитела, которое имеет последовательность, представленную в перечне последовательностей, которое имеет одно или несколько изменений в одном или нескольких CDR, которое(ые) приводи(ят) к улучшению аффинности к антигенам по сравнению с соответствующим исходным антителом с не созревшей аффинностью (не созревшим антителом). Одна из методик создания указанных мутантов антител включает метод фагового дисплея (Hawkins et al., 1992; и Lowman et al., 1991). В целом, метод состоит в следующем: несколько сайтов гипервариабельных участков (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом мутанты антител презентуют в одновалентной форме на частицах нитчатого фага таким образом, что продукт гена III фага M13 оказывается упакованным в каждой частице. Затем презентуемые фагом мутанты подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности к связыванию) с использованием методов, представленных в настоящем описании.

Антитела с созревшей аффинностью можно получать также методами, описанными, например, у Marks et al., 1992 (созревание аффинности путем перестановки вариабельных областей тяжелой цепи (VH) и вариабельных областей легкой цепи (VL)) или у Barbas, et al., 1994; Shier et al., 1995; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995 и Hawkins et al., 1992 (случайный мутагенез остатков CDR и/или каркасного участка). Аффинность предпочтительных антител с созревшей аффинностью в отношении антигена-мишени должна характеризоваться значениями, находящимися на наномолярном или даже пикомолярном уровне.

В другом варианте осуществления изобретения молекула антитела к CD37, предлагаемая в изобретении, представляет собой "деиммунизированное" (неиммунное) антитело.

"Деиммунизированное" антитело к CD37 представляет собой антитело, выведенное из гуманизированного или химерного антитела, последовательность которого представлена в перечне последовательностей, имеющее одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности, которое(ые) приводит(ят) к снижению иммуногенности антитела по сравнению с соответствующим исходным недегуманизированным антителом. Один из методов создания указанных мутантов антител предусматривает идентификацию и удаление Т-клеточных эпитопов молекулы антитела (Baker и Jones, 2007). На первой стадии можно определять иммуногенность молекулы антитела различными методами, например, путем выявления *in vitro* Т-клеточных эпитопов или предсказания указанных эпитопов анализом *in silico* (молекулярное моделирование), которые известны из литературы (Jones et al., 2004; Jones et al., 2005; Reche et al., 2004; Hertz et al., 2006). После идентификации имеющих решающее значение для функциональной активности остатков Т-клеточных эпитопов, можно осуществлять мутации с целью устранения иммуногенности и сохранения активности антитела (Jones et al., 2005; Tangri et al., 2005). Методы интродукции мутаций в белки хорошо известны в данной области, например, включают методику перекрывающей ПЦР.

Поскольку Fc-фрагмент антитела взаимодействует с несколькими Fc-рецепторами, что приводит к нескольким важным функциональным свойствам (которые называют "эффекторными функциями"), в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело или антитело, которое содержит часть Fc-фрагмента, последнее имеет место в случае, если антитело обладает способностью к специфическому связыванию и с соответствующей областью антигена, и с Fc-рецепторами. Выбор типа и длины константной области зависит от того, какая из следующих эффекторных функций является желательной: либо эффекторная функция типа фиксации комплемента, либо антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность, и от требуемых фармакологических свойств белка антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к CD37 представляет собой химерное или гуманизированное антитело, которое содержит Fc-фрагмент или его соответствующую часть, соз-

данные для модуляции эффекторных функций, прежде всего для повышения способности к связыванию антитела с одним или несколькими Fc-рецепторами, что усиливает эффекторную функцию типа ADCC. Создание Fc-фрагмента приводит к тому, что эффекторная функция антитела в присутствии эффекторных клеток является более эффективной по сравнению с родительским антителом, не имеющим созданный Fc-фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный вариант антитела опосредует более высокую ADCC по сравнению с ADCC, опосредуемой родительским антителом. (Ниже, если специально не указано иное, понятие "родительское" в контексте молекулы антитела или в контексте IgG или Fc-фрагмента относится к несконструированной молекуле антитела, Fc-фрагмента или IgG соответственно, из которой выводят мутантную (сконструированную) молекулу).

Различные модификации Fc-области известны в данной области, и они описаны как в научной литературе, так и в патентных документах, например в EP 0307434, WO 93/04173, WO 97/34631, WO 97/44362, WO 98/05787, WO 99/43713, WO 99/51642, WO 99/58572, WO 02/060919, WO 03/074679, WO 2004/016750, WO 2004/029207, WO 2004/063351, WO 2004/074455, WO 2004/035752, WO 2004/099249, WO 2005/077981, WO 2005/092925, WO 2006/019447, WO 2006/031994, WO 2006/047350, WO 2006/053301, WO 2006/088494 и WO 2007/041635.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой Fc-варианты с аминокислотными заменами в положениях 332 и/или 239, и/или 236. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, имеют мутации в Fc-фрагменте, выбранные из группы, включающей:

- I) одну замену в положении 332, предпочтительно I332E;
- II) комбинацию замен в положениях 239 и 332, предпочтительно S239D/I332E;
- III) комбинацию замен в положениях 236 и 332, предпочтительно G236A/I332E;
- IV) комбинацию замен в положениях 236, 239 и 332, предпочтительно G236A/S239D/I332E.

Указанные выше замены описаны, например, у Lazar et al., 2006, в WO 2004/029207 и WO 2007/041635.

Fc-варианты антител, предлагаемых в настоящем изобретении, обозначают по аминокислотным модификациям, которые входят в них. Так, например, I332E представляет собой Fc-вариант с заменой I332E относительно родительского Fc-полипептида. Аналогично этому, S239D/I332E обозначает Fc-вариант с заменами S239D и I332E, а S239D/I332E/G236A обозначает Fc-вариант с заменами S239D, I332E и G236A относительно родительского Fc-полипептида.

Нумерация дана согласно схеме нумерации EU (Kabat et al., 1991), которая соответствует нумерации антитела EU (Edelman et al., 1969). Специалисту в данной области должно быть очевидно, что эти согласованные обозначения предусматривают непоследовательную нумерацию в конкретных областях последовательности иммуноглобулина, что позволяет осуществлять стандартизованную ссылку на консервативные положения в семействах иммуноглобулинов.

В указанных выше антителах положения 236, 239 и 332, в которых имеются замены, соответствуют положениям 119, 122 и 215 соответственно тяжелой цепи IgG1, представленной в SEQ ID NO: 24. (В полноразмерных последовательностях тяжелых цепей антител A2, A4, B2 и B4, представленных в SEQ ID NO: 28, 32, 36 и 40, замененные аминокислоты находятся в положениях 235, 238 и 331).

В некоторых вариантах осуществления изобретения основой Fc-вариантов, предлагаемых в изобретении, является последовательность человеческого IgG, и поэтому последовательности человеческого IgG используют в качестве "основных" последовательностей, с которыми сравнивают другие последовательности. В антителах, предлагаемых в настоящем изобретении, сконструированный Fc-фрагмент предпочтительно представляет собой IgG, в частности IgG1, но может представлять собой также IgG2 или варианты последовательностей из других классов иммуноглобулинов, таких как IgA, IgE, IgD, IgM или химерных версий двух или большего количества классов иммуноглобулинов (например, IgG2/IgG1) и т.п. Хотя Fc-варианты, предлагаемые в настоящем изобретении, конструируют в контексте одного родительского IgG, эти варианты можно конструировать в контексте другого вторичного родительского IgG или "переносить" в него. Для этой цели определяют "эквивалентные" или "соответствующие" остатки и замены между первым и вторым IgG, как правило, на основе гомологии последовательностей или структур для последовательностей первого и второго IgG. Для определения степени гомологии аминокислотную последовательность первого IgG, представленную в настоящем описании, непосредственно сравнивают с последовательностью второго IgG. После выравнивания последовательностей с помощью одной или нескольких программ определения гомологии, известных в данной области, которые позволяют определять инсерции и делеции, необходимые для осуществления сравнительного анализа первичной структуры (т.е. позволяют избегать элиминации консервативных остатков в результате произвольной делеции и инсерции), определяют остатки, эквивалентные конкретным аминокислотам в первичной последовательности первого Fc-варианта. Отсутствие зависимости от того, определены ли эквивалентные или соответствующие остатки, и отсутствие зависимости от идентичности родительского IgG, из которого созданы IgG, означает, что Fc-варианты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно конструировать в любом втором родительском IgG, для которого характерна существенная гомология последовательности или структуры с Fc-вариантом. Так, например, если создают вариант антитела, для которого

родительским антителом является человеческий IgG1, с помощью описанных выше методов или других методов определения эквивалентных остатков, то вариант антитела можно конструировать, например, в человеческом IgG2, используя его в качестве родительского антитела, человеческом IgA, используя его в качестве родительского антитела (см. WO 2007/041635).

Мишенью антител, предлагаемых в изобретении, является антиген CD37, что может иметь преимущество с точки зрения целенаправленного воздействия на CD20, при заболеваниях, при которых уровень экспрессии CD37 выше, чем CD20, например, при хроническом лимфолейкозе, если в образцах обнаружен высокий уровень экспрессии мРНК CD37 по сравнению с низким уровнем экспрессии мРНК CD20.

Установлено, что антитела, предлагаемые в изобретении, превосходят ритуксимаб, зарегистрированное антитело к CD20, с точки зрения ADCC-активности при оценке на клетках линии Ramos, В-клеточного истощения при оценке в цельной крови и истощения клеток линии Ramos при лимфоме Беркитта. В экспериментах, проведенных при создании изобретения, установлено, что антитела, предлагаемые в изобретении (как с несконструированным Fc, так и со сконструированным Fc) обладают активностью в отношении В-клеточного истощения, превышающей активность ритуксимаба. Антитела с мутантным Fc-фрагментом обладают примерно в 10 раз более высокой способностью вызывать В-клеточное истощение по сравнению с ритуксимабом (фиг. 11 Б).

Репрезентативные антитела к CD37, предлагаемые в изобретении, обладают выраженной проапоптотной активностью без введения перекрестных сшивок; в этом плане антитела превышают по этому виду активности антитело к CD37 SMIP Tru16.4, которое не вызывает апоптоз без введения перекрестных сшивок (Zhao et al., 2007). Индукция апоптоза без введения перекрестных сшивок, что является характерным как для антител, предлагаемых в изобретении, которые имеют как сконструированный, так и для антител, не имеющих его, является их преимуществом в случае отсутствия перекрестно сшивающего агента *in vivo* (например, в случае эффекторных клеток, несущих Fcγ-рецепторы) или в случае низкой плотности антигена-мишени CD37 (например, в случае опухолевых клеток, для которых характерен низкий уровень экспрессии CD37). Антитело, которое индуцирует апоптоз без введения перекрестных сшивок, все еще может вызывать клеточную гибель, в то время как антитело, зависящее от введения перекрестных сшивок, не обладает указанной способностью.

Согласно другому объекту изобретения молекула антитела к CD37, предлагаемая в изобретении, представляет собой фрагмент антитела, выведенного из гуманизированного или химерного CD37-специфического антитела, предлагаемого в настоящем изобретении. Для получения фрагментов антитела, например, Fab-фрагментов, можно осуществлять расщепление с помощью общепринятых методов, например, с использованием папаина. Примеры продуктов расщепления папаином описаны в WO 94/29348 и US 4342566. При расщеплении папаином антител, как правило, образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, так называемые Fab-фрагменты, каждый из которых содержит один антигенсвязывающий сайт, при этом сохраняется Fc-фрагмент. Обработка пепсином приводит к получению F(ab')₂-фрагмента, который несет два антигенсвязывающих сайта и все еще обладает способностью к перекрестному сшиванию с антигеном.

Fab-фрагменты, полученные расщеплением антитела, содержат также константные области легкой цепи и первый домен константной области (CH₁) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что они содержат дополнительные остатки на карбоксильном конце CH₁-домена тяжелой цепи, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела. В контексте настоящего описания Fab'-SH обозначает Fab', в котором остаток(и) цистеина константных областей несет(ут) свободную тиольную группу. F(ab')₂-фрагменты антител исходно получали в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми находятся цистеина шарнирной области. Фрагменты антител можно создавать также методами молекулярной биологии, с помощью которых получают соответствующие кодирующие ДНК-фрагменты.

Молекула антитела, как правило, представляет собой тетрамер, состоящий из двух пар легких цепей/тяжелых цепей, но она также может представлять собой димер, т.е. состоять из пары легкая цепь/тяжелая цепь, например представлять собой Fab- или Fv-фрагмент, или она может представлять собой мономерное одноцепочечное антитело (scFv; Johnson и Bird, 1991), мини-антитело или двойное антитело.

Молекула антитела к CD37 может также иметь форму конъюгата, т.е. молекула антитела может быть химически связана с цитотоксическим агентом, в частности цитотоксическим агентом, который индуцирует цитотоксичность (например, апоптоз или прекращение митоза) в отношении опухолевых клеток. В результате механизмов нормального клиренса фармакологических средств антитело, применяемое в виде конъюгата с лекарственным средством ("иммуноконъюгат"), приходит в контакт и связывается с клетками-мишенями лишь в ограниченных количествах. Поэтому цитотоксический агент, входящий в состав конъюгата, должен обладать высокой цитотоксической активностью, достаточной для того, что уничтожение клеток имело терапевтическое действие. Как описано в US 2004/0241174, примерами указанных цитотоксических агентов являются таксаны (см., например, WO 01/38318 и WO 03/097625), ДНК-алкилирующие агенты (например, аналоги CC-1065), антрациклины, аналоги тубулизина, аналоги дуокармицина, доксорубина, ауристатин Е, токсин рицина А и цитотоксические агенты, содержащие реактивный полиэтиленгликольный остаток (см., например, Sasse et al., 2000;

реактивный полиэтиленгликольный остаток (см., например, Sasse et al., 2000; Suzawa et al., 2000; Ichimura et al., 1991; Francisco et al., 2003; US 5475092; US 6340701; US 6372738 и US 6436931; US 2001/0036923; US 2004/0001838; US 2003/0199519 и WO 01/49698).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, т.е. производное майтанзина (CAS 35846538), майтанзиноиды, известные в данной области, включают майтанзин, майтанзиол, сложные С-3-эфиры майтанзинола и другие аналоги, и производные майтанзинола (см., например, US 5208020 и US 6441163).

Содержащие антитело к CD37 иммуноконъюгаты можно создавать и синтезировать согласно методу, описанному в WO 2007/077173 для иммуноконъюгатов антител к FAP.

В другом варианте осуществления изобретения молекулу антитела к CD37, предлагаемая в изобретении, можно метить радиоактивным изотопом с образованием радиоиммуноконъюгата, этот подход предложен для антитела к CD37 MB-1 (Buchsbaum et al., 1992, см. выше). Радионуклиды, обладающие наиболее предпочтительной активностью излучения, известны в данной области, и к ним относятся, например, фосфор-32, стронций-89, иттрий-90, йод-131, самарий-153, эрбий-169, иттербий-175, рений-188, которые можно успешно и стабильно сшивать с МАт. Молекулы антител к CD37, предлагаемые в изобретении, можно метить различными радионуклидами, используя методы прямого мечения или косвенного мечения, описанные в US 6241961. Обзор технологий создания и применения новых радиоактивно-меченных конъюгатов антител, которые можно применять согласно настоящему изобретению, представлен у Goldenberg и Sharkey, 2007.

Молекула антитела, предлагаемого в изобретении, либо со сконструированным Fc, либо с несконструированным Fc, может также быть биспецифической, т.е. представлять собой молекулу антитела, которая связывается с двумя различными мишенями, одной из которых является CD37, а другая представляет собой одну из мишеней, выбранных, например, из поверхностных антигенов, экспрессируемых Т-клетками, например CD3, CD16 и CD56.

Настоящее изобретение относится также к молекулам ДНК, которые кодируют химерные или гуманизированные молекулы антител к CD37, предлагаемые в изобретении. Последовательности, которые кодируют переменные области тяжелых цепей молекул антител, предлагаемых в изобретении, представлены в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9. Последовательности, которые кодируют переменные области легких цепей молекул антител, предлагаемых в изобретении, представлены в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют легкую цепь и тяжелую цепь, можно синтезировать химически и ферментативно (ПЦР-амплификация) стандартными методами. Во-первых, можно синтезировать приемлемые олигонуклеотиды с помощью методов, известных в данной области (см., например, Gait, 1984), которые можно применять для получения синтетического гена. Методы создания синтетических генов на основе олигонуклеотидов известны в данной области (см., например, Stemmer et al., 1995; Ye et al., 1992; Hayden и Mandecki, 1988; Frank et al., 1987).

Молекулы ДНК, предлагаемые в изобретении, включают, но не ограничиваясь только ими, молекулы ДНК, последовательности которых представлены в перечне последовательностей. Таким образом, настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновых кислот, которые гибридизуются с молекулами ДНК, последовательности которых представлены в перечне последовательностей, в строгих условиях связывания и отмывки, которые описаны в WO 2007/042309, где указанные молекулы нуклеиновых кислот кодируют антитело или его функциональный фрагмент, которое/который обладают свойствами, эквивалентными или превышающими активность антитела, кодируемого последовательностью, представленной в перечне последовательностей. Предпочтительными молекулами (касательно перспективности мРНК) являются молекулы, последовательности которых по меньшей мере на 75 или 80% (предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%) гомологичны или идентичны последовательностям молекул ДНК, представленных в настоящем описании.

Еще один класс вариантов ДНК, которые подпадают под объем изобретения, может определяться кодируемым им полипептидом. Эти молекулы ДНК различаются по их последовательности от представленных в перечне последовательностей, но кодируют в результате вырожденности генетического кода, антитела, имеющие идентичные аминокислотные последовательности. Например, с позиций экспрессии антител в эукариотических клетках последовательности ДНК, представленные в перечне последовательностей, созданы так, чтобы соответствовать по частоте встречаемости кодонов эукариотическим клеткам. Если требуется экспрессировать антитела в *E.coli*, то эти последовательности можно изменять, так чтобы они соответствовали по частоте встречаемости кодонов *E.coli*. Варианты молекул ДНК, предлагаемых в изобретении, можно конструировать несколькими различными путями, например, описанными в WO 2007/042309.

Для получения рекомбинантных молекул антител к CD37, предлагаемых в изобретении, молекулы ДНК, кодирующие полноразмерные легкие и тяжелые цепи или их фрагменты, встраивают в экспрессионный вектор таким образом, чтобы функционально связывать последовательности с контролирующими

транскрипцию и трансляцию последовательностями.

Для создания антител, предлагаемых в изобретении, специалист в данной области может любую систему экспрессии из большого разнообразия известных в данной области систем экспрессии, например, перечисленных в обзоре Kipriyanow и Le Gall, 2004.

Экспрессионные векторы представляют собой плазмиды, ретровирусы, космиды, выведенные из EBV эписомы и т.п. Экспрессионные векторы и контролирующие экспрессию последовательности выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в различные векторы. В некоторых вариантах осуществления изобретения обе последовательности ДНК встраивают в один и тот же экспрессионный вектор. Приемлемыми являются векторы, которые кодируют обладающую полной функциональной активностью последовательность CH или CL человеческого иммуноглобулина, с соответствующими сконструированными сайтами рестрикции, что позволяет легко встраивать и экспрессировать любую описанную выше последовательность VH или VL. Константная область цепи, как правило, относится в случае легкой цепи антитела к каппа- или лямбда-типу, а в случае тяжелой цепи антитела может относиться, но, не ограничиваясь только ими, к любому IgG-изотипу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) или к другим иммуноглобулинам, включая аллельные варианты.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать также сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. ДНК, кодирующую цепь антитела, можно клонировать в векторе таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с аминоконцом ДНК цепи зрелого антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный пептид из белка, не относящегося к иммуноглобулинам. В альтернативном варианте последовательность ДНК, кодирующей цепь антитела, может уже включать последовательность сигнального пептида.

Помимо последовательностей ДНК, кодирующих цепь антитела, рекомбинантные экспрессионные векторы несут регуляторные последовательности, такие как промоторы, энхансеры, сигналы терминирования и полиаденилирования и другие контролирующие экспрессию элементы, которые контролируют экспрессию цепей антитела в клетке-хозяине. Примерами промоторных последовательностей (например, предназначенных для экспрессии в клетках млекопитающих) являются промоторы и/или энхансеры, выведенные из цитомегаловирусов (CMV) (таких как CMV, представляющий собой обезьяний вирус 40 (SV40) (например, промотор/энхансер SV40), аденовирусов (например, главный поздний промотор аденовирусов (AdMLP)), промоторы полиомы и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы иммуноглобулинов и промоторы актина. Примерами сигналов полиаденилирования являются полиА BGH, поздний или ранний полиА SV40; в альтернативном варианте можно использовать 3'UTR генов иммуноглобулинов.

Рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести также последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, сайты инициации репликации) и гены селективируемых маркеров. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий фрагмент и/или легкую цепь или ее антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD37, и векторы, содержащие указанные молекулы ДНК, можно интродуцировать в клетки-хозяева, например клетки бактерий или клетки высших эукариотических организмов, например клетки млекопитающих, с помощью методов трансфекции, которые хорошо известны в данной области, включая опосредуемую липосомами трансфекцию, опосредуемую поликатионами трансфекцию, слияние протопластов, микроинъекции, осаждение фосфатом кальция, электропорацию или перенос с помощью вирусных векторов.

Предпочтительно молекулы ДНК, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, присутствуют в двух векторах, которыми совместно трансфектируют клетку-хозяина, предпочтительно клетку млекопитающего.

Пригодные в качестве хозяев для экспрессии линии клеток млекопитающих хорошо известны в данной области и представляют собой среди прочего клетки яичника китайского хомячка (CHO, CHO-DG44), клетки NSO, клетки SP2/0, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки человеческой карциномы (например, Нер G2), клетки A549, клетки 3T3 или производные/потомство любой из указанных линий клеток. К другим клеткам млекопитающих относятся, но не ограничиваясь только ими, человеческие, мышьи, крысиные, обезьяньи и полученные из организма грызунов клеточные линии или другие эукариотические клетки, включая, но не ограничиваясь только ими, клетки дрожжей, насекомых и растений, или можно применять прокариотические клетки, такие как бактериальные клетки. Молекулы антител к CD37, предлагаемые в изобретении, получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для того, чтобы произошла экспрессия молекулы антитела в клетках-хозяевах.

Молекулы антител предпочтительно выделяются из культуральной среды в виде секретируемого полипептида, или их можно выделять из лизатов клеток-хозяев, если, например, они экспрессируются без секреторного сигнала. Необходимо очищать молекул антител с помощью стандартных методов очистки белков, применяемых для очистки рекомбинантных белков и белков клеток-хозяев, с целью получения практически гомогенных препаратов антител. Например, принятые в данной области методы очистки

ки, которые можно применять для получения молекулы антител к CD37, предлагаемых в изобретении, включают в качестве первой стадии удаление клеток и/или частиц клеточного дебриса из культуральной среды или лизата. Затем антитело очищают от растворимых загрязнителей, таких как белки, полипептиды и нуклеиновые кислоты, например, фракционированием на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждением этанолом, ЖВХР с обращенной фазой, хроматографией на сефадексе, хроматографией на силикагеле или на катионообменной смоле. На конечной стадии процесса получения препаратов молекул антител к CD37 очищенную молекулу антитела можно сушить, например лиофилизировать, согласно описанному выше методу с целью применения в терапии.

Следующим объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве действующего вещества молекулу антитела к CD37, предлагаемую в изобретении.

Для применения в терапии антитело к CD37 включают в фармацевтические композиции, предназначенные для облегчения введения животным или человеку. Типичные лекарственные формы молекул антител к CD37 можно получать смешением молекулы антитела к CD37 с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в виде лиофилизированных или высушенных иным образом форм или водных растворов или водных или неводных суспензий. Носители, эксципиенты, модификаторы или стабилизаторы являются нетоксичными в применяемых дозах и концентрациях. Они включают буферные системы, такие как фосфат, цитрат, ацетат и другие неорганические или органические кислоты и их соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид, бензетонийхлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль (ПЭГ); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды, олигосахариды или полисахариды или другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу, декстрины или декстраны; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или ионогенные или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™ (полисорбаты), PLURONICS™ или эфиры жирных кислот, простые эфиры жирных кислот или сложные эфиры сахаров. В лекарственную форму антитела могут входить также органические растворители, такие как этанол или изопропанол. Эксципиенты могут обладать также модифицирующей высвобождение или модифицирующей абсорбцию функцией.

Молекулы антител к CD37 можно также сушить (сушка вымораживанием, сушка распылением, спрей-сублимационная сушка, сушка с помощью близких к суперкритическим или суперкритических газов, вакуумная сушка, сушка на воздухе), осаждать или кристаллизовать или заключать в микрокапсулы, которые получают, например, методами коацервации или с помощью межфазной полимеризации, используя, например, гидроксиметилцеллюлозу или желатин и поли(метилметакрилат) соответственно, в коллоидные системы для введения лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микро-сферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы), в микроэмульсии или их можно осаждать или имобилизовывать на носителях или поверхностях, например, с помощью rsmc-технологии (нанесение белкового покрытия на микрорекристаллы). Указанные методики описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21-е изд., под ред. Hendrickson R.

Естественно, лекарственные формы, которые можно применять для введения *in vivo*, должны быть стерильными; для стерилизации можно использовать общепринятые методики, например, фильтрацию через стерильные фильтрационные мембраны.

Для повышения применяемой концентрации антитела к CD37 его можно включать в так называемые высококонцентрированные жидкие формы (HCLF); известны различные пути получения указанных HCLF.

Молекулы антител к CD37 можно применять также в виде препарата с пролонгированным высвобождением. Указанные препараты включают твердые, полутвердые и жидкие матрицы из гидрофобных или гидрофильных полимеров, и они могут представлять собой изделия определенной формы, например пленки, стики или микрокапсулы, и их можно применять с помощью предназначенного для введения устройства. Примерами матриц с пролонгированным высвобождением являются сложные полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или ацетатбутират сахарозы) или поли(виниловый спирт), полилактиды (US 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразложимый этиленвинилацетат, разложимые сополимеры молочной кислоты - гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъектируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты - гликолевой кислоты и ацетата леупролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. Такие полимеры, как этилен-винилацетат и сополимеры молочной кислоты - гликолевой кислоты обладают способностью высвобождать молекулы в течение 100 дней, в то время как некоторые гидрогели обладают способностью высвобождать белки в течение более коротких периодов времени. При длительном сохранении капсулированных антител в организме может происходить их денатурация или агрегация в

результате воздействия влажности при 37°C, что приводит к снижению биологической активности и возможно изменениям иммуногенности. Для стабилизации в зависимости от участвующего механизма можно применять различные рациональные стратегии. Например, если известно, что механизм агрегации приводит к образованию межмолекулярной S-S-связи посредством взаимных тиодисульфидных обменов, то для достижения стабилизации можно применять модификацию сульфгидрильных остатков, лиофилизацию (например, как описано в WO 89/011297) из кислых растворов, контроль содержания влаги, использование соответствующих добавок и создание специфической композиции полимерной матрицы.

Для молекул антител к CD37, предлагаемых в изобретении, можно применять также лекарственные формы, которые описаны в US 7060268 и US 6991790.

Молекулу антитела к CD37 можно включать также в другие формы применения, такие как дисперсии, суспензии или липосомы, таблетки, капсулы, порошки, спреи, трансдермальные или интрадермальные пластыри или кремы, в сочетании с повышающими проникновение устройствами или без них, облатки, лекарственные формы для назального, трансбуккального или легочного введения, или их можно получать с помощью имплантированных клеток или - после генной терапии - с помощью собственных клеток пациента.

Молекулу антитела к CD37 можно также дериватизировать с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), метильная или этильная группа или углеводная группа. Эти группы можно применять также для улучшения биологических характеристик антитела, например для удлинения времени полужизни в сыворотке или для повышения аффинности к связыванию с тканью.

Предпочтительным путем введения является парентеральный, путем инфузии или инъекции (внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, интрадермальный), но можно применять также другие пути введения, такие как введение путем ингаляции, трансдермально, введение в нос, трансбуккально, орально.

Соответствующая доза антитела, предназначенная для предупреждения или лечения заболевания, должна зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли антитело с целью профилактики или лечения, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, и от предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или в виде серии обработок.

В зависимости от типа и серьезности заболевания начальная возможная доза, в которой применяют антитела для введения пациенту, может составлять от примерно 0,01 мкг/кг до 40 мг/кг (например, 0,1-20 мкг/кг) с использованием, например, либо однократного, либо нескольких отдельных введений, либо непрерывной инфузии. При применении повторных введений в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают до достижения требуемого подавления симптомов заболевания. Однако можно использовать другие схемы лечения. Прогресс при применении указанной терапии легко отслеживать с помощью общепринятых методик и анализов, например, определяя уровень В-клеточного истощения (например, с помощью проточной цитометрии).

"Терапевтически эффективное количество", в котором следует вводить антитело, представляет собой минимальное количество, необходимое для предупреждения, облегчения симптомов или лечения заболевания или нарушения.

Молекулу антитела к CD37, предлагаемую в изобретении, и содержащие ее фармацевтические композиции применяют для истощения В-клеток, на поверхности которых экспрессируется CD37, и которые вызывают раковое или аутоиммунное/воспалительное заболевание.

Согласно одному из объектов изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую изобретении, можно применять для лечения различных видов рака, в частности любых CD37-позитивных злокачественных заболеваний.

В-клеточные злокачественные заболевания включают, но не ограничиваясь только ими, В-клеточные лимфомы (например, различные формы болезни Ходжкина, В-клеточная неходжкинская лимфома (NHL) и родственные лимфомы (например, Вальденстрема макроглобулинемия (которую называют лимфоплазмочитарной лимфомой или иммуноцитомой) или лимфомы центральной нервной системы), лейкозы (например, острый лимфолейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL; который называют также В-клеточным хроническим лимфолейкозом, BCLL), волосковоклеточный лейкоз и хронический миелобластный лейкоз) и миеломы (например, множественная миелома). Другие В-клеточные злокачественные заболевания включают мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны селезенки, миелому из плазматических клеток, солитарную плазмацитому кости, экстраоссальную плазмацитому, экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), нодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантии, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, медиастинальную (тимусную) крупноклеточную В-клеточную лимфому, интраваскулярную крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную лимфому серозных оболочек, лимфому/лейкоз Беркитта, лимфому "серой" зоны, В-клеточные пролиферативные заболевания с неясным злокачественным потенциалом, лимфоматоидный грануломатоз и лимфоопролиферативное нарушение после трансплантации.

Согласно другому объекту изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую изобретению, которая содержит антитела к CD37, можно применять для лечения аутоиммунных и воспалительных заболеваний, в патологии которых принимают участие В-клетки.

Такие заболевания включают, но не ограничиваясь только ими, артрит, ревматоидный артрит, юношеский ревматоидный артрит, остеоартрит, полихондрит, псориатический артрит, псориаз, дерматит, полимиозит/дерматомиозит, миозит телец включений, воспалительный миозит, токсический эпидермальный некролиз, системную склеродермию и склероз, CREST-синдром, ответы, ассоциированные с воспалительным заболеванием кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, респираторный дистресс-синдром, респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), менингит, энцефалит, увеит, колит, гломерулонефрит, аллергические состояния, экзему, астму, состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток, и хронические воспалительные ответы, атеросклероз, аутоиммунный миокардит, синдром недостаточной адгезии лейкоцитов, системную красную волчанку (SLE), подострую кожную красную волчанку, дискоидную красную волчанку, волчаночный миелит, волчаночный церебрит, юношеский диабет, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит, оптический нейромиелит, ревматическую лихорадку, хорею Сиденгама, иммунные ответы, ассоциированные с острой гиперчувствительностью и гиперчувствительностью замедленного типа, опосредуемые цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, включая гранулематоз Вегенера и болезнь Черджа-Стросса, агранулоцитоз, васкулит (включая гиперчувствительный васкулит/ангиит, ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические антитела)-ассоциированный васкулит и ревматоидный васкулит), апластическую анемию, анемию Даймонда-Блекфена, иммунную гемолитическую анемию, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА), пернициозную анемию, эссенциальную апластическую анемию (РКА), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную нейтропению, панцитопению, лейкопению, болезни, включающие диapedез лейкоцитов, воспалительные нарушения центральной нервной системы (ЦНС), синдром повреждения нескольких органов, тяжелую псевдопаралитическую миастению, болезни, опосредуемые комплексом антиген-антитело, болезнь, связанную с антигломерулярными антителами к базальной мембране, синдром, связанный с антителом к фосфолипидам, аллергический нейрит, болезнь Бехчета, синдром Кастлемана, синдром Гудпасчера, миастенический синдром Лэмберта-Итона, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, отторжение трансплантата плотных органов, реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD), буллезный пемфигоид, пузырчатку, аутоиммунные полиэндокринопатии, серонегативные спондилоартропатии, болезнь Рейтера, синдром "негнувшегося человека", артерит гигантских клеток, нефрит, связанный с иммунными комплексами, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полинейропатии или опосредуемую IgM нейропатию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), пурпуру Геноха-Шенлейна, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунное заболевание яичек и яичника, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз; аутоиммунные эндокринные заболевания, включая аутоиммунный тиреоидит, хронический тиреоидит (тиреоидит Хасимото), подострый тиреоидит, идиопатический гипотериоз, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, аутоиммунные полигландулярные синдромы (или синдромы полигландулярной эндокринопатии), диабет типа I, который называют также инсулинзависимым сахарным диабетом (IDDM) и синдром Шихена; аутоиммунный гепатит, лимфоидный интерстициальный пневмонит (ассоциированный с ВИЧ), облитерирующий бронхиолит (несвязанный с трансплантацией) по NSIP, синдром Гийена-Барре, васкулит крупных сосудов (включая ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный артериит (болезнь Такаясу), васкулит средних сосудов (включая болезнь Кавасаки и нодозный полиартериит), нодозный полиартериит (PAN), анкилозирующий спондилит, болезнь Берже (связанная с IgA нефропатией), быстро прогрессирующий гломерулонефрит, первичный билиарный цирроз, спру брюшной полости (глутеновая энтеропатия), криоглобулинемию, криоглобулинемию, ассоциированную с гепатитом, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь коронарной артерии, семейную средиземноморскую лихорадку, микроскопический полиангиит, синдром Когана, синдром Вискотта-Олдрича и облитерирующие тромбоангииты (см. WO 2007/014278).

В зависимости от подлежащего лечению нарушения молекулу антитела к CD37, предлагаемую в изобретении, можно применять индивидуально или в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, в частности выбранными из числа вызывающих повреждение ДНК или тубулинсвязывающих агентов, или терапевтическими действующими веществами, которые ингибируют ангиогенез, пути трансдукции сигналов или чекпойнты митоза в раковых клетках.

Дополнительные терапевтические средства можно вводить одновременно, необязательно в виде компонента одного и того же фармацевтического препарата, или до или после введения молекулы антитела к CD37.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент может представлять собой, но, не ограничиваясь только ими, один или несколько ингибиторов, выбранных из группы, включающей ингибиторы семейства EGFR, семейства VEGFR, IGF-1R, рецепторов инсулина, киназ AuroraA, AuroraB, PLK и PI3, FGFR, PDGFR, Raf, KSP или PDK1.

Другими примерами дополнительных терапевтических агентов являются ингибиторы CDK, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, антагонисты белка hedgehog, ингибиторы JAK/STAT,

Mek, mTor, NFκappaB, ингибиторы протеосомы, Rho, ингибитор пути передачи сигнала Wnt или пути передачи сигнала Notch или ингибитор пути убиквитинизации.

Примерами ингибиторов Аюгоа-киназы являются, но, не ограничиваясь только ими, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 и ENMD-2076.

Примером ингибиторов PLK является GSK-461364.

Примерами ингибиторов raf-киназы являются BAY-73-4506 (является также ингибитором VEGFR), PLX-4032, RAF-265 (является также ингибитором VEGFR), сорафениб (является также ингибитором VEGFR), XL-281 и невавар (Nevavar) (является также ингибитором VEGFR).

Примерами ингибиторов KSP являются испинесиб, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355 и EMD-534085.

Примерами ингибиторов src и/или bcr-abl являются дасатиниб, AZD-0530, босутиниб, XL-228 (является также ингибитором IGF-1R), нилотиниб (является также ингибитором PDGFR и cKit), иматиниб (является также ингибитором cKit), NS-187, KX2-391, AP-24534 (является также ингибитором EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 и LS-104 (является также ингибитором Flt3, Jak2).

Примером ингибитора PDK1 является AR-12.

Примером ингибитора Rho является BA-210.

Примерами ингибиторов PI3-киназы являются PX-866, PX-867, BEZ-235 (является также ингибитором mTor), XL-147 и XL-765 (является также ингибитором mTor), BGT-226, CDC-0941.

Примерами ингибиторов cMet или HGF являются XL-184 (является также ингибитором VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (является также ингибитором VEGFR), MGCD-265 (является также ингибитором VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMab, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060 и E-7050.

Примером ингибитора c-Мус является CX-3543.

Примерами ингибиторов Flt3 являются AC-220 (является также ингибитором cKit и PDGFR), KW-2449, LS-104 (является также ингибитором bcr-abl и Jak2), MC-2002, SB-1317, лестауртиниб (является также ингибитором VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (является также ингибитором JAK2), XL-999 (является также ингибитором cKit, FGFR, PDGFR и VEGFR), сунитиниб (является также ингибитором PDGFR, VEGFR и cKit) и тандутиниб (является также ингибитором PDGFR и cKit).

Примерами ингибиторов HSP90 являются танеспимицин, алвеспимицин, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024 и SNX-5422.

Примерами ингибиторов JAK/STAT являются CYT-997 (взаимодействует также с тубулином), TG-101348 (является также ингибитором Flt3) и XL-019.

Примерами ингибиторов Mek являются ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119 и XL-518.

Примерами ингибиторов mTor являются темсиrolimus, дефоролimus (является также ингибитором VEGFR), эверолимус (является также ингибитором VEGF), XL-765 (является также ингибитором PI3-киназы) и BEZ-235 (является также ингибитором PI3-киназы).

Примерами ингибиторов Akt являются перифозин, GSK-690693, RX-0201 и трицирибин.

Примерами ингибиторов cKit являются маситиниб, OSI-930 (является также ингибитором VEGFR), AC-220 (является также ингибитором Flt3 и PDGFR), тандутиниб (является также ингибитором Flt3 и PDGFR), акситиниб (является также ингибитором VEGFR и PDGFR), сунитиниб (является также ингибитором Flt3, PDGFR, VEGFR) и XL-820 (является также ингибитором VEGFR и PDGFR), иматиниб (является также ингибитором bcr-abl), нилотиниб (является также ингибитором bcr-abl и PDGFR).

Примерами антагонистов белка hedgehog являются IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926 и XL-139.

Примерами ингибиторов CDK являются селициклиб, AT-7519, P-276, ZK-CDK (является также ингибитором VEGFR2 и PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125 и SCH-727965.

Примерами ингибиторов протеосомы являются бортезомиб, карфилзомиб и NPI-0052 (является также ингибитором NFκappaB).

Примерами ингибиторов протеосомы/ингибиторов пути NFκappaB являются бортезомиб, карфилзомиб, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680 и SPC-839.

Примером ингибитора пути убиквитинизации является HBX-41108.

Примерами антиангиогенных средств являются ингибиторы FGFR, PDGFR и VEGF(R) и талидомида, указанные средства выбирают из группы, включающей, но не ограничиваясь только ими, бевацизумаб, мотесаниб, CDP-791, SU-14813, телатиниб, KRN-951, ZK-CDK (является также ингибитором CDK), АВТ-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD, талидомид, CC-4047, леналидомид, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, бриваниб, цедирианиб, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (является также ингибитором Flt3), сунитиниб (является также ингибитором cKit и Flt3), акситиниб (является также ингибитором cKit), лестауртиниб (является также ингибитором Flt3 и PKC), ваталаниб, тандутиниб (является также ингибитором Flt3 и cKit), пазопаниб, PF-337210, афлиберцепт, E-7080, CHIR-258, сора-

фениба тозилат (является также ингибитором Raf), вандетаниб, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (является также ингибитором EGFR и Her2), BAY-57-9352 (является также ингибитором Raf), BAY-73-4506 (является также ингибитором Raf), XL-880 (является также ингибитором cMet), XL-647 (является также ингибитором EGFR и EphB4), XL-820 (является также ингибитором cKit), нилотиниб (является также ингибитором cKit и bcr-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, довитиниб, CY-2401401 и ENMD-2976.

Дополнительный терапевтический агент можно выбирать также из ингибиторов EGFR, он может представлять собой низкомолекулярный ингибитор EGFR или антитело к EGFR. Примерами антител к EGFR являются, но не ограничиваясь только ими, цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб, залутумумаб; примерами низкомолекулярных ингибиторов EGFR являются гефитиниб, эрлотиниб и вандетаниб (является также ингибитором VEGFR). Другим примером модулятора EGFR является слитый с токсином EGF.

Другими ингибиторами EGFR и/или Her2, которые можно применять в сочетании с молекулой антитела к CD37, предлагаемой в изобретении, являются лапатиниб, трастузумаб, пертузумаб, XL-647, нератиниб, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (является также ингибитором VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, земаб, TAK-285, AZD-4769.

Дополнительное лекарственное средство можно выбирать также из агентов, мишенью которых являются IGF-1R и пути инсулинового рецептора. К таким агентам относятся антитела, которые связываются с IGF-1R (например, CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, ВПВ-022, SCH-717454, rhu Mab IGF1R и новые химические субстанции, мишенью которых является киназный домен IGF1-R (например, OSI-906 или BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Другие агенты, которые целесообразно объединять с молекулой антитела к CD37, предлагаемой в изобретении, являются молекулы, мишенью которых является CD20, в том числе такие специфические для CD20 антитела, как ритуксимаб, LY-2469298, окрелизумаб, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, офатумумаб, меченные радиоактивным изотопом антитела к CD20 типа тоситумумаба и ибритумумаба тиуксетана или другие белки, мишенью которых является CD20, типа SMIP Tru015, PRO-131921, FBT-A05, велтузумаба, R-7159.

Антитела к CD37 можно объединять с ингибиторами других расположенных на поверхности антигенов, которые экспрессируются на лейкоцитах, в частности антителами или напоминающими антитела молекулами, например, с антителом к CD2 (сиплизумаб), антителом к CD4 (занолимумаб), антителом к CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), антителом к CD22 (эпратузумаб), антителом к CD23 (лумиликсимаб), антителом к CD30 (иратумумаб), антителом к CD32B (MGA-321), антителом к CD38 (HuMax-CD38), антителом к CD40 (SGN40), антителом к CD52 (алемтузумаб), антителом к CD80 (галиксимаб). Антитело, предлагаемое в изобретении, можно объединять также с другим антагонистом CD37, например с TRU-016.

Другие агенты, которые можно объединять с антителами к CD37, представляют собой иммунотоксины, такие как BL-22 (иммунотоксин к CD22), инотузумаба озогамидин (конъюгат антитело к CD23 - калихеамицин), RFT5.dgA (конъюгат А цепь токсина рицина - антитело к CD25), SGN-35 (конъюгат антитело к CD30 - ауристатин Е) и гемтузумаба озогамидин (конъюгат антитело к CD33 - калихеамицин), MDX-1411 (конъюгат антитела к CD70) или меченные радиоактивным изотопом антитела типа ⁹⁰Y-эпратузумаб (радиоиммуноконъюгат антитела к CD22).

Кроме того, антитела к CD37 можно объединять с иммуномодуляторами, агентами, например антителами, которые индуцируют апоптоз или модифицируют пути трансдукции сигналов, такими как модуляторы TRAIL-рецептора, например мапатумумаб (агонист TRAIL-1-рецептора), лексатумумаб (агонист TRAIL-2-рецептора), тигатузумаб, апомаб, AMG-951 и AMG-655; антитело к HLA-DR (типа 1D09C3), антитело к CD74, ингибитор лиганда фактора дифференцировки остеокластов (типа деносумаба), антагонист BAFF (типа AMG-623a) или агонист Toll-подобного рецептора (например, TLR-4 или TLR-9).

Другие лекарственные средства, которые можно применять в сочетании с молекулами антител, предлагаемыми в настоящем изобретении, выбирают из группы, включающей, но не ограничиваясь только ими, гормоны, аналоги гормонов и антигормональные средства (например, тамоксифен, торемифен, ралоксифен, фулвестрант, мегестрола ацетат, флутамид, нилутамид, бикалутамид, ципротерона ацетат, финастерид, бусерелина ацетат, флудрокортизон, флуоксиместерон, медроксипрогестерон, гидроксипрогестерона капроат, диэтилстилбестрол, тестостерона пропионат, флуоксиместерон/его эквиваленты, остреотид, арзоксифен, пасиреотид, вапреотид, адренкортикостероиды/их антагонисты, преднизон, дексаметазон, аминоклутетимид), ингибиторы ароматазы (например, анастрозол, летрозол, лиарозол, эксеместан, атаместан, форместан), агонисты и антагонисты LHRH (например, госсерелина ацетат, леупролид, абареликс, цертореликс, деслорелин, гистрелин, трипторелин), антиметаболиты (например, антифолаты типа метотрексата, триметрексата, пеметрекседа, аналоги пиримидина типа 5-фторурацила, флуорорезоксидиуридина, капецитабина, децитабина, неларабина, 5-азациитидина и гемцитабина, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурин, тиогуанин, азатиоприн, кладрибин и пентостатин, цитарабин, флударабин, клофарабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины, такие как доксорубин, даунорубин, эпирубин и идарубин, митомицин-С, блеомицин дактиномицин,

пликамицин, актиномицин D, митоксантрон, митоксантронидарубицин, пиксантрон, стрептозоцин, афидиколин); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, лобоплатин, сатраплатин); алкилирующие средства (например, эстрамустин, семустин, мехлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, гидроксимочевина, темозоломид, нитрозомочевина, такие как кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические средства (например, алкалоиды барвинка типа винбластин, виндесина, винорелбина, винфлунина и винкристина; и таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел и их препаративные формы, ларотаксел; симотаксел и эпотилоны типа иксабепилона, патупилона, ZK-EPO); ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподифиллотоксины, такие как этопосид и этопос, тенипосид, амсакрин, топотекан, иринотекан, баноксантрон, камптотецин) и химиотерапевтические агенты разного типа, такие как производные ретиноевой кислоты, амифостин, анагелид, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерлейкин-2, прокарбазин, N-метилгидразин, митотан и порфирин, бексаротен, цеlexоксид, этиленимин/метилмеламин, триэтиленмеламин, триэтилентифосфорамид, гексаметилмеламин, и ферменты, такие как L-аспарагиназа, L-аргиназа, и метронидазол, мисонидазол, десметилмисонидазол, пимонидазол, этанидазол, ниморазол, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, никотинамид, 5-бромдезоксисуридин, 5-йоддезоксисуридин, бромдезоксцитидин, эритрогидроксиниладенин, антраценедион, GRN-163L (конкурентный антагонист матрицы теломеразы), SDX-101 (агонист PPAR), талабостат (ингибитор DPP), фородезин (ингибитор PNP), атаццепт (растворимый рецептор представителей семейства TNF BLyS и APRIL), агенты, нейтрализующие TNF-альфа (энбрел, хумира, ремикад), XL-844 (ингибитор CHK1/2), VNP-40101M (ДНК-алкилирующий агент), SPC-2996 (антисмысловый ингибитор bcl2), обатоклас (ингибитор bcl2), энзастаурин (модулятор PKC-бета), воринистат (ингибитор HDAC), ромидепсин (ингибитор HDAC), AT-101 (ингибитор Bcl-2/Bcl-xL), плитидепсин (многофункциональный депсипептид), SL-11047 (модуляторы метаболизма полиаминов).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулу антитела к CD37 применяют в сочетании с "CHOP" (комбинация циклофосфамида, доксорубина, винкристина и преднизона).

Молекулу антитела к CD37, предлагаемую в изобретении, можно применять также в сочетании с другими путями лечения, включая хирургию, лучевую терапию, эндокринную терапию, лечение с помощью биологических модификаторов ответа, гипертермию и криотерапию, и лечение с помощью средств, предназначенных для снижения каких-либо побочных действий (например, противорвотные средства), G-CSF, GM-CSF, фотосенсибилизирующие средства, такие как производные гематопротопорфирина, Photofrin®, производные бензопорфирина, Нреб, этиопорфирин олова, феоборид-а, бактериохлорофилла, нафталоцианины, фталоцианины, фталоцианины цинка.

Моноклональные антитела характеризуются высокой специфичностью в отношении антигена и часто взаимодействуют только с человеческим антигеном-мишенью, но не взаимодействуют с гомологичными белками из различных видов животных. Для разработки терапевтических антител требуются соответствующие созданные на животных модели для оценки *in vivo* токсичности и фармакодинамического поведения. В качестве одной из моделей *in vivo* можно применять трансгенных мышей, в организме которых эндогенный антиген-мишень заменен на человеческий гомолог (мышь типа "knock-out/knock-in"). В частности, для разработки терапевтических антител к CD37 мышинный ген CD37 можно заменить, а человеческий ген CD37. Для этой цели можно конструировать обеспечивающий направленный перенос вектор, который содержит кодирующую геномную последовательность человеческого гена CD37, фланкированную нетранслируемыми последовательностями. Этот обеспечивающий направленный перенос вектор можно применять для гомологичной рекомбинации, используя мышинные ES-клетки. Трансгенных животных, гомозиготных в отношении экспрессии человеческого CD37, можно применять для оценки фармакодинамического действия антител в отношении человеческого CD37, например, путем мониторинга количества периферических В-клеток после обработки антителами. В альтернативном варианте указанных мышей можно применять для изучения возможных токсических действий специфических для человеческого CD37 антител после внутривенного (*i.v.*) введения.

Другим вариантом в случае отсутствия перекрестной реакции моноклональных антител в организме животных является создание так называемых суррогатных антител. Суррогатное антитело представляет собой антитело, которое взаимодействует с гомологичным белком различных видов животных, которое является уместным и которое можно применять для изучения фармакодинамических действий, например на мышах или макаках-крабоедах (яванский макак). В случае CD37 создают моноклональные антитела, которые являются специфическими для CD37 макака или CD37 мыши соответственно. В идеальном варианте суррогатное антитело должно обладать аналогичной способностью к связыванию и функциональными свойствами, что и созданное антитело. Это можно исследовать, применяя системы анализа, в которых используют экспрессирующие CD37 клетки макака или мыши в качестве клеток-мишеней, например, для оценки связывания, FACS с использованием анализа Скэтчарда, анализа ADCC и апоптоза. В конце концов суррогатное антитело можно выбирать на основе его способности вызывать В-клеточное истощение в крови макака или мышей *in vitro*.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

- на фиг. 1 - данные, полученные с помощью конкурентного FACS-анализа, которые свидетельствуют о том, что химерное антитело A0 специфически распознает антиген CD37;
- на фиг. 2 - данные о связывании гуманизированных версий A0 с клеточным антигеном CD37, полученные с помощью FACS-анализа;
- на фиг. 3 - данные о связывании гуманизированных версий A0 с клеточным антигеном CD37, полученные с помощью FACS-анализа;
- на фиг. 4 - данные об аффинности гуманизированных версий A0 к клеточному антигену CD37, полученные с помощью FACS с использованием анализа Скэтчарда;
- на фиг. 5 - данные о ADCC-активности гуманизированных версий A0 в отношении Ramos-клеток;
- на фиг. 6- данные о проапоптозной активности гуманизированных версий A0 в отношении Ramos-клеток;
- на фиг. 7 - данные о ADCC-активности версий МАт A0 со сконструированным Fc в отношении Ramos-клеток;
- на фиг. 8 - данные об ADCC-активности версий МАт B0 со сконструированным Fc в отношении Ramos-клеток;
- на фиг. 9 - данные о проапоптозной активности МАт A0 и B0;
- на фиг. 10 - данные о проапоптозной активности версий МАт A0 со сконструированным Fc;
- на фиг. 11А - данные об истощении здоровых человеческих В-клеток при анализе цельной крови с использованием версий антител A2 и B2 со сконструированным Fc в сравнении с ритуксимабом;
- фиг. 11Б - данные, свидетельствующие о повышенной по сравнению с ритуксимабом способности версий антител со сконструированным Fc вызывать В-клеточное истощение;
- на фиг. 11В - данные, свидетельствующие о том, что антитела A2 и B2 не обладают способностью истощать Т-клетки и моноциты при анализе цельной крови;
- на фиг. 12 - данные, свидетельствующие о повышенной по сравнению с ритуксимабом ADCC-активности антител со сконструированным Fc;
- на фиг. 13 - данные об истощении Ramos-клеток из лимфомы Беркитта с помощью версий антител A2 и B2 со сконструированным Fc при анализе цельной крови в сравнении с ритуксимабом;
- на фиг. 14 - данные об ингибировании *in vivo* роста опухолей у бестимусных мышей при оценке на модели ксенотрансплантата опухолевых Ramos-клеток с помощью версий антител A2 и B2 со сконструированным Fc;
- на фиг. 15 - данные об экспрессии CD37 на клетках множественной миеломы;
- на фиг. 16 - данные об ADCC-активности антител A2 и B2 в отношении клеток множественной миеломы;
- на фиг. 17 - данные о проапоптозной активности антител A2 и B2 в отношении полученных из организма пациента CLL-клеток.

Пример 1. Создание химерных и гуманизированных антител к CD37.

а) Создание химерного антитела A0.

На основе аминокислотных последовательностей варьируемых областей тяжелой и легкой цепи, представленных в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO:4, синтезировали соответствующие последовательности ДНК, применяя частоту встречаемости кодонов, оптимальную для клеток млекопитающих (фирма GeneArt, Регенсбург, Германия), добавляя на 5'-конец сайт клонирования HindIII и на 3'-конец сайт клонирования BamHI. Синтезированные молекулы ДНК расщепляли HindIII и BamHI и образовавшиеся ДНК-фрагменты (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3 плюс сайты рестрикции) клонировали в экспрессионных векторах, основой которых является pcDNA3.1, кодирующих константную область человеческого IgG1 и константную область человеческой легкой каппа-цепи соответственно (SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 26). Получали плазмидные препараты EndoFree (фирма Qiagen) и плазмидами тяжелой и легкой цепи совместно трансфектировали HEK293-клетки линии FreeStyle (фирма Invitrogen), используя каждую плазмиду в концентрации 1 мг/л, согласно протоколу поставщика. Через 72 ч супернатант собирали и определяли концентрацию IgG с помощью ELISA. Образовавшееся химерное антитело к CD37 (обозначенное A0) очищали на колонке с модифицированным белком А (фирма GE Healthcare), элюировали цитратным буфером, после чего подвергали диализу в противотоке 3ФР.

б) Создание гуманизированных версий химерного антитела A0.

Гуманизацию химерного МАт A0, полученного согласно методу, описанному в разделе а), осуществляли на основе подхода трансплантации CDR, который описан, например, в US 5225539; US 6548640; US 6982321.

Для создания структурной модели VL-области МАт A0 выбирали структурную матрицу из базы данных банка белков (Protein Data Bank (PDB)) национальной лаборатории Брукхавена (Brookhaven National Laboratory). Выбирали VL-область мышиного моноклонального антитела, обозначенного как "1KB5", последовательность которой характеризовалась идентичностью на уровне 88%/схождением на уровне 81% при разрешении 2,5 Å. Для создания VH-области МАт A0 в качестве основной модели мат-

рицы выбирали структуру того же мышиногo моноклонального антитела "1KB5", последовательность которой характеризовалась идентичностью на уровне 90% и сходством на уровне 91%. Установлено, что "наилучшим подбором" для человеческого консенсусного каркасного участка является человеческая V κ appa1 (hVK1) и человеческая VH1 (hVH1). В качестве альтернативного пути конструирования выбирали трансплантацию в наиболее стабильные человеческие консенсусные области hVK3 и hVH3. Для трансплантации модели МАт A0_VL и МАт A0_VH объединяли с моделями человеческой консенсусной области hVK1, hVK3, hVH1A и hVH3 с получением Fv-моделей. Трансплантацию в петлю осуществляли путем погружения CDR-участков мышиногo МАт A0 в каркасные участки человеческого антитела и синтезировали молекулы ДНК-конструкций гуманизированных цепей.

Соответствующие гуманизированные вариabельные области синтезировали и клонировали в кодирующих иммуноглобулин экспрессионных векторах и осуществляли кратковременную экспрессию в системе экспрессии HEK293 FreeStyle (фирма Invitrogen), описанной в разделе а), используя сочетания последовательностей тяжелых и легких цепей, которые представлены в табл. 1, и очищали на колонках с белком А.

Таблица 1
Последовательности вариabельных областей
тяжелых и легких цепей химерных и гуманизированных
антител к CD37, которые использовали в примерах

Антитело	Тяжелая цепь SEQ ID NO: ак/ДНК	Легкая цепь SEQ ID NO: ак/ДНК
A (=A0)	seq 2/1	seq 4/3
B	seq 6/5	seq 12/11
C	seq 6/5	seq 14/13
D	seq 6/5	seq 16/15
H	seq 8/7	seq 18/17
I	seq 8/7	seq 20/19
J	seq 8/7	seq 22/21
K	seq 10/9	seq 18/17
L	seq 10/9	seq 20/19
M	seq 10/9	seq 22/21

в) Создание химерных и гуманизированных антител к CD37 со сконструированным Fc.

Для создания Fc-мутантов использовали метод, описанный у Lazar et al., 2006. Полученную последовательность тяжелой цепи со сконструированным Fc интродуцировали в экспрессионный вектор pAD-CMV1 (описанный в EP 393438) и осуществляли с использованием этого вектора совместно с плазмидой, содержащей кодирующую последовательность, трансфекцию клеток CHO-DG44. Антитело выделяли из культуральных сред через 5-7 дней после трансфекции и очищали с помощью хроматографии на белке А, элюировали цитратным буфером, после чего подвергали диализу в противотоке ЗФР. Содержание белка в образцах определяли с помощью ЖХВР на белке А, содержание эндотоксина определяли с помощью хромогенного анализа с использованием набора Kinetic-QCL (фирма Lonza). Содержание мономеров в образце определяли с помощью HP-SEC (гель фильтрация высокого разрешения), во всех применяемых для оценки функциональной активности образцах содержание мономеров >95%.

Табл. 2: последовательности вариabельных областей тяжелых и легких цепей (колонки III и IV) и Fc-мутантов (колонка II) химерных и гуманизированных антител к CD37 (антитело A0, B0, C0 и т.д. идентичны антителам А и В, С и т.д. в табл. 1).

Полноразмерные последовательности тяжелых и легких цепей представлены в колонках V и VI.

(Последовательности в колонке V, помеченные *, обозначают последовательность IgG1, представленную в SEQ ID NO: 24 и 23 (последовательности дикого типа), которые модифицированы таким образом, что включают замену(ы), соответствующую(ие) указанным в колонке II, и соответствующую(ие) мутацию(и) в кодирующей ДНК).

Таблица 2

I	II	III	IV	V	VI
Ат	Замена(ы) в Fc- (нумерация по Кэботу)	SEQ ID NO: v тяжелой цепи ак/ДНК	SEQ ID NO: v легкой цепи ак/ДНК	SEQ ID NO: Полная тяжелая цепь ак/ДНК	SEQ ID NO: Полная легкая цепь ак/ДНК
A0	-	seq 2/1	seq 4/3	2/1 слита с 24/23	4/3 слита с 26/25
A1	I332E	seq 2/1	seq 4/3	2/1 слита с 24*/23*	4/3 слита с 26/25
A2	S239D/I332E	seq 2/1	seq 4/3	28/27	30/29
A3	I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	2/1 слита с 24*/23*	4/3 слита с 26/25
A4	S239D/I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	32/31	34/33
B0	-	seq 6/5	seq 12/11	6/5 слита с 24/23	12/11 слита с 26/25
B1	I332E	seq 6/5	seq 12/11	6/5 слита с 24*/23*	12/11 слита с 26/25
B2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 12/11	36/35	38/37
B3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	6/5 слита с 24*/23*	12/11 слита с 26/25
B4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	40/39	42/41
C0	-	seq 6/5	seq 14/13	6/5 слита с 24/23	14/13 слита с 26/25
C1	I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 слита с 24*/23*	14/13 слита с 26/25
				6/5 слита с 24*/23*	14/13 слита с 26/25
C2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 14/13		
C3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 слита с 24*/23*	14/13 слита с 26/25
C4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 слита с 24*/23*	14/13 слита с 26/25
D0	-	seq 6/5	seq 16/15	6/5 слита с 24/23	16/15 слита с 26/25
D1	I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 слита с 24*/23*	16/15 слита с 26/25
D2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 слита с 24*/23*	16/15 слита с 26/25
D3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 слита с 24*/23*	16/15 слита с 26/25
D4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 слита с 24*/23*	16/15 слита с 26/25
H0	-	seq 8/7	seq 18/17	8/7 слита с 24/23	18/17 слита с 26/25
H1	I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
H2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
H3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
H4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25

Ат	Замена(ы) в Фс- (нумерация по Кэботу)	SEQ ID NO: в тяжелой цепи ак/ДНК	SEQ ID NO: в легкой цепи ак/ДНК	SEQ ID NO: Полная тяжелая цепь ак/ДНК	SEQ ID NO: Полная легкая цепь ак/ДНК
I-0	-	seq 8/7	seq 20/19	8/7 слита с 24/23	20/19 слита с 26/25
I-1	I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
I-2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
I-3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
I-4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
J0	-	seq 8/7	seq 22/21	8/7 слита с 24/23	22/21 слита с 26/25
J1	I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
J2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
J3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
J4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
K0	-	seq 10/9	seq 18/17	10/9 слита с 24/23	18/17 слита с 26/25
K1	I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
K2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
K3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
K4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 слита с 24*/23*	18/17 слита с 26/25
L0	-	seq 10/9	seq 20/19	10/9 слита с 24/23	20/19 слита с 26/25
L1	I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
L2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
L3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
L4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 слита с 24*/23*	20/19 слита с 26/25
Ат	Замена(ы) в Фс- (нумерация по Кэботу)	SEQ ID NO: в тяжелой цепи ак/ДНК	SEQ ID NO: в легкой цепи ак/ДНК	SEQ ID NO: Полная тяжелая цепь ак/ДНК	SEQ ID NO: Полная легкая цепь ак/ДНК
M0	-	seq 10/9	seq 22/21	10/9 слита с 24/23	22/21 слита с 26/25
M1	I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
M2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
M3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25
M4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 слита с 24*/23*	22/21 слита с 26/25

Пример 2. Химерное МАт А0 специфически распознает антиген CD37.

Специфичность МАт А0 в отношении клеточного CD37 оценивали с помощью конкурентного FACS-анализа с использованием клеток Ramos из лимфомы Беркитта (ATCC № CRL-1596). Клетки выращивали в колбах для культуры ткани (175 см²) с использованием в качестве культуральной среды RPMI-1640 + GlutaMAX, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной бычьей сыворотки, 12,5 мМ HEPES, 1 мМ пируватом натрия, 1% среды MEM, содержащей заменимые аминокислоты. Клетки культивировали с начальной плотностью 3×10^5 клеток/мл при 37°C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере в течение 3 дней. В культурах поддерживали концентрацию клеток на уровне от 3×10^5 до $1,8 \times 10^6$ /мл путем пересева в соотношении 1:6 в свежую среду 2-3 раза в неделю. Для конкурентных FACS-анализов CD37-специфическое МАт НН1 (фирма Santa Cruz), непосредственно меченное фикоэритрином (ФЭ), использовали в концентрации 1 мкг/мл. Антитело предварительно инкубировали с немеченым конкурентным антителом А0 в течение 10 мин при 4°C в указанном молярном соотношении. Затем инкубировали 1×10^5 клеток Ramos со смесью антител в течение 30 мин на льду. После этого клетки отмывали дважды забуференным фосфатом физиологическим раствором (ЗФР), ресуспендировали в FACS-буфере и оценивали с помощью устройства типа BD FACS Canto. Результаты указанного анализа представлены на фиг. 1. Добавление контрольного человеческого антитела в виде IgG1 (фирма Sigma, IgG1-каппа) в 20-кратном молярном избытке не снижало существенно среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) клеток Ramos. Добавление либо немеченого антитела НН1, либо антитела А0 в 20-кратном молярном избытке почти полностью аннулировало связывание непосредственно меченого антитела НН1. Этот результат свидетельствует о том, что антитела А0 и НН1 распознают идентичные или сходные эпитопы на клетках Ramos и конкурируют за связывание с клеточным антигеном CD37.

Пример 3. Связывание гуманизированных версий МАт А0 с клеточным антигеном CD37.

Гуманизированные версии А0 оценивали в отношении их связывания с клеточным антигеном CD37 с помощью FACS-анализа. Антитела добавляли к клеткам Ramos в указанных концентрациях и давали им связываться в течение 30 мин при 4°C. Затем связанное антитело выявляли с помощью меченного ФЭ козьего античеловеческого антитела в виде IgG (фирма Sigma), клетки отмывали дважды ЗФР и после этого ресуспендировали в FACS-буфере и анализировали FACS-методом с использованием устройства типа BD FACS Canto. Примеры представлены на фиг. 2 и 3 (антитела А, В, С, D, I или А, Н, I, J, K, L и М соответственно; см. табл.1). Несколько гуманизированных версий А0 характеризовались связыванием с клетками Ramos, аналогичным связыванию родительского антитела А0, этот результат свидетельствует о том, что гуманизация не снижает связывание с клеточным антигеном CD37.

Пример 4. FACS с использованием анализа Скэтчарда гуманизированных версий химерного МАт А0.

Аффинность гуманизированных версий антитела А0 (обозначенных как В, С, D, Н, I и К; см. табл. 1) к клеточному антигену CD37 определяли описанным ранее методом FACS с использованием анализа Скэтчарда (Brockhoff et al., 1994). В целом метод состоял в следующем: приготавливали разведения антител в 96-лучночном планшете, начиная с 100-400 нМ в первой лунке (80 мкл), затем осуществляли 11 стадий разведения (1:2, 40+40 мл). Добавляли по 50 мкл МАт в пробирки для осуществления FACS, в каждую пробирку для осуществления FACS добавляли по 150 мкл клеток ($0,8 \times 10^6$ /мл = $1,2 \times 10^5$ клеток/пробирку). Клетки осторожно смешивали и инкубировали в течение 1 ч на льду. Затем добавляли 50 мкл конъюгированного с ФИТЦ вторичного антитела (концентрация 15 мкг/мл; мышиное МАт к человеческому IgG всех подклассов, фирма Zymed, № 05-4211), смешивали и инкубировали в течение 30 мин на льду. Затем добавляли 4 мл ЗФР, pH 7,2, содержащий 0,02% кислоты, клетки пеллетировали и ресуспендировали в 300 мкл ЗФР, pH 7,2 и подвергали FACS-анализу с помощью устройства типа BD FACS Canto. Все стадии эксперимента осуществляли на влажном льду, все разведения антител осуществляли в ЗФР/0,5% БСА + 0,02% кислоты. Калибровку для FACS-анализа осуществляли с помощью входящих в набор Quantum FITC MESF (Premix) гранул в высокой концентрации (High Level Bead) (фирма Bangs Laboratories). Во всех образцах оценивали одни и те же FACS-параметры. Соотношение связанного IgG и свободного IgG рассчитывали на основе значений MFI при различных концентрациях антител и представляли в виде Скэтчард-блота. На фиг. 4 показана взаимосвязь MFI/концентрацией антитела нескольких гуманизированных вариантов А0. Результаты демонстрируют что связывание с клетками Ramos некоторых гуманизированных версий было сходным со связыванием исходного антитела, при этом значения констант диссоциации (K_d) составляли от 2,15 до 4,90 наномолей/л.

Пример 5. ADCC-активность гуманизированных версий химерного МАт А0.

Способность гуманизированных версий А0 (которые обозначены как В, С, D, Н, J, K; см. табл. 1) опосредовать антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC) оценивали, используя клетки линии Ramos в качестве клеток-мишеней и стимулированные IL2 человеческие PBMC в качестве эффекторных клеток. Клетки линии Ramos (из лимфомы Беркитта; ATCC № CRL-1596) получали от ATCC. Клетки выращивали в колбах для культуры ткани (175 см²) с использованием в качестве культуральной среды RPMI-1640 + GlutaMAX, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной бычьей сыворотки, 12,5 мМ HEPES, 1 мМ пируватом натрия, 1% среды MEM, содержа-

щей заменимые аминокислоты. Клетки культивировали с начальной плотностью 3×10^5 клеток/мл при 37°C и 5% CO_2 в увлажненной атмосфере в течение 3 дней. В культурах поддерживали концентрацию клеток на уровне от 3×10^5 до $1,8 \times 10^6$ /мл путем пересева в соотношении 1:6 в свежую среду 2-3 раза в неделю. Аликвоты клеточной культуры с плотностью клеток от $1,5 \times 10^6$ /мл до $1,8 \times 10^6$ /мл и находящиеся на логарифмической фазе роста центрифугировали ($200 \times g$, т.е. 1000 об/мин) в течение 10 мин. Клетки отмывали однократно средой для отмывки (RPMI 1640 без L-глутамин) и пеллетировали ($200 \times g$, т.е. 1000 об/мин; 10 мин). Клеточный дебрис ресуспендировали в среде для анализа [1% БСА в RPMI без L-глутамин] и определяли количество клеток. Концентрацию клеток доводили до 2×10^5 /мл.

Примерно 50-80 мл цельной крови здоровых доноров использовали для выделения PBMC. 10 мл цельной крови разводили в соотношении 1:3,6 26 мл HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса без кальция и магния) в 50-миллилитровой пробирке. 18 мл разведенной цельной крови настилали сверху на 12 мл реагента Lymphoprep (фирма Nycomed Pharma) в 50-миллилитровой пробирке и центрифугировали при $370 \times g$ (1400 об/мин) в течение 35 мин. Мононуклеарные клетки с поверхности отбирали аспирацией и отмывали сначала однократно HBSS ($750 \times g$, т.е. 1900 об/мин; 10 мин), а затем дважды HBSS ($300 \times g$, т.е. 1200 об/мин; 10 мин) и последний раз HBSS ($160 \times g$, т.е. 900 об/мин; 10 мин). Пеллетированные клетки осторожно ресуспендировали с помощью пипетки в культуральной среде/среде для анализа (10% инактивированной тепловой обработкой человеческой АВ-сыворотки в RPMI 1640 без L-глутамин) определяли количество клеток с помощью счетчика клеток. Концентрацию PBMC доводили до 1×10^7 /мл. Свежевыделенные PBMC (5×10^5 /мл) поддерживали в культуральной среде (RPMI 1640 без L-глутамин, дополненная 10% инактивированной тепловой обработкой человеческой АВ-сыворотки) в колбах для культуры ткани (75 см^2) при 37°C в CO_2 -инкубаторе в течение ночи. На следующий день клетки стимулировали hIL-2 в конечной концентрации 1 ед./мл в течение еще 3 дней. Стимулированные IL-2 PBMC отделяли от клеточного дебриса в градиенте Lymphoprep. Очищенные стимулированные IL-2 PBMC суспендировали в культуральной среде/среде для анализа в концентрации 1×10^7 /мл.

Совместное культивирование эффекторных клеток с клетками-мишенями в присутствии специфического или неспецифического антитела осуществляли в двух или трех повторностях в 96-луночных круглодонных титрационных планшетах в конечном объеме 200 мкл среды для анализа на лунку, содержащей 10% человеческой АВ-сыворотки и 1% БСА в RPMI в соотношении 1:1. Сначала вносили эффекторные клетки (свежевыделенные PBMC-клетки в 100 мкл 10% человеческой АВ-сыворотки в RPMI на лунку), затем клетки-мишени и раствор антитела, разведенный в 50 мкл 1% БСА в RPMI. В качестве контроля эффекторные клетки культивировали только в среде для анализа (контроль эффекторных клеток), а клетки-мишени культивировали либо только в среде для анализа (спонтанный лизис), либо в среде для анализа, дополненной 1% Triton X-100 (максимальный лизис). Полученные совместным культивированием культуры инкубировали при 37°C в увлажняющем CO_2 -инкубаторе в течение 3 ч. После периода инкубации клетки удаляли из культуральной среды центрифугированием ($200 \times g$, т.е. 1000 об/мин; 10 мин) при комнатной температуре. Не содержащие клеток супернатанты (100 мкл/лунку) переносили в соответствующие лунки 96-луночного круглодонного планшета. Для определения активности лактатдегидрогеназы (LDH) в этих супернатантах 100 мкл реакционной смеси (смешенные непосредственно перед использованием 250 мкл катализатора с 11,25 мл раствора красителя) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем оценивали абсорбцию согласно описанному ниже методу.

Для оценки ADCC-активности применяли набор для оценки цитотоксичности (LDH; фирма Roche). Выявление цитотоксичности основано на определении ферментативной активности LDH, высвобождающейся из клеток с поврежденной плазматической мембраной. LDH, высвобождающаяся в супернатанты культур, восстанавливает соль тетразолия, присутствующую в наборе, до формазана. Максимальную абсорбцию формазанового красителя оценивают при 490 нм в сравнении с длиной волны 650 нм с помощью применяемого для ELISA планшет-ридера. Для расчета процента клеточно-опосредуемой цитотоксичности для каждой серии экспериментов использовали по 5 контролей.

Контроль основного уровня I(1): активность LDH в среде для анализа, которую вычитают из значений, указанных в (3) и (5).

Контроль основного уровня II (2): активность LDH в среде для анализа, дополненной 1% Triton-X100, которую вычитают из максимальных значений высвобождения LDH, указанных в (4).

Спонтанное высвобождение LDH (3): активность LDH, высвободившаяся только из клеток-мишеней.

Максимальное высвобождение LDH (4): максимальная активность LDH, которая может высвободиться из клеток-мишеней.

Контроль эффекторных клеток (5): активность LDH, высвободившаяся только из эффекторных клеток.

Для определения процента клеточно-опосредуемой цитотоксичности рассчитывали среднюю абсорбцию по трем или двум повторностям и вычитали основной уровень согласно инструкциям произво-

дителя. На фиг. 5 представлены результаты оценки ADCC при применении эффекторных клеток: клеток-мишеней (E:T) в соотношении 25:1 и клеток линии Ramos в качестве клеток-мишеней. Антитела добавляли в концентрации 30 нг/мл. Как исходное МАт, так и его гуманизированные версии характеризовались близкой ADCC-активностью в отношении клеток Ramos. В целом, гуманизация МАт к CD37 не изменяла существенно способность индуцировать ADCC.

Пример 6. Проапоптозная активность гуманизированных версий химерного МАт А0.

Проапоптозную активность МАт А0 (=А) и его гуманизированных версий (В, С, D и I; см. табл. 1) оценивали, измеряя уровень аннексии V/PI (йодид пропидия)-позитивных клеток после инкубации клеток линии Ramos с МАт. Клетки линии Ramos (из лимфомы Беркитта; ATCC №CRL-1596) получали от ATCC. Клетки выращивали в колбах для культуры ткани (175 см²) с использованием в качестве культуральной среды RPMI-1640 + GlutaMAX, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной бычьей сыворотки, 12,5 мМ HEPES, 1 мМ пируватом натрия, 1% среды MEM, содержащей заменимые аминокислоты. Клетки культивировали с начальной плотностью 3×10^5 клеток/мл при 37°C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере в течение 3 дней. В культурах поддерживали концентрацию клеток на уровне от 3×10^5 до $1,8 \times 10^6$ /мл путем пересева в соотношении 1:6 в свежую среду 2-3 раза в неделю. Аликвоты клеточной культуры с плотностью клеток от $1,5 \times 10^6$ /мл до $1,8 \times 10^6$ /мл и находящиеся на логарифмической фазе роста центрифугировали (200×g, т.е. 1000 об/мин) в течение 10 мин. Клетки отмывали однократно средой для отмывки (RPMI 1640 без L-глутамина) и пеллетировали (200×g, т.е. 1000 об/мин; 10 мин). Клеточный дебрис ресуспендировали в культуральной среде и определяли количество клеток. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 /мл. Высевали по 100 мкл клеточной суспензии на лунку 96-луночных круглодонных титрационных планшетов. Антитела разводили в среде для культуры клеток, содержащей 10% FBS, и добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора антитела. Клетки инкубировали в течение 20-24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе и затем окрашивали с помощью набора № 2 для оценки апоптоза типа Vybrant. В клетки добавляли меченный с помощью красителя Alexa Fluor 488 аннексии V и раствор йодида пропидия и инкубировали в течение 15 мин в темноте. Затем клетки ресуспендировали в 400 мкл буфера для связывания аннексина V и подвергали FACS-анализу с помощью устройства типа BD FACS Canto. Процент аннексии V-позитивных/PI-негативных клеток и аннексии V/PI-позитивных клеток определяли с помощью двумерного дот-блоттинга, используя FL1/FL2-каналы. В качестве отрицательного контроля использовали несвязывающееся антитело соответствующего изотипа (фирма Sigma, человеческий IgG1).

На фиг. 6 представлены данные о проапоптозном действии различных гуманизированных версий МАт А в отношении клеток линии Ramos. Клетки инкубировали с антителом в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 ч, представлены данные об общем процентном содержании аннексии V-позитивных клеток (PI-позитивных и PI-негативных). Для родительского МАт А характерна сильная проапоптозная активность. При создании изобретения неожиданно было установлено, что при использовании гуманизированных версий количество аннексии V-позитивных клеток существенно снижалось по сравнению с родительским МАт А, что свидетельствует об измененной проапоптозной активности гуманизированных антител. В целом, в этой серии экспериментов установлено, что гуманизация МАт приводила к снижению проапоптозной активности.

Пример 7. ADCC-активность версий химерного МАт А0 со сконструированными Fc.

ADCC-активность версий химерного МАт А0 со сконструированными Fc (которые обозначены как А1, А2, А3, А4; см. табл. 2) оценивали с использованием в качестве клеток-мишеней клеток линии Ramos. ADCC оценивали согласно описанному выше методу (пример 5). Результаты эксперимента представлены на фиг. 7. Для версий А0 со сконструированными Fc обнаружена в значительной степени повышенная активность и эффективность по сравнению с родительским МАт А0. При использовании некоторых Fc-вариантов повышение максимального лизиса достигало вплоть до 100% по сравнению с родительским МАт, и величины EC₅₀ повышались вплоть до 10 раз по сравнению с родительским МАт. В целом, интродукция специфических Fc-мутантов сильно повышала ADCC-активность химерного МАт А0.

Пример 8. ADCC-активность версий химерного МАт В0 со сконструированными Fc.

ADCC-активность версий химерного МАт В0 со сконструированными Fc (которые обозначены как В1, В2, В3, В4; см. табл. 2) оценивали с использованием в качестве клеток-мишеней клеток линии Ramos. ADCC оценивали согласно описанному выше методу (пример 5). Для В0 со сконструированными Fc обнаружена в значительной степени повышенная активность и эффективность по сравнению с родительским МАт В0. При использовании некоторых Fc-вариантов повышение максимального лизиса достигало вплоть до 80% по сравнению с родительским МАт, и величины EC₅₀ повышались вплоть до 20 раз по сравнению с родительским МАт. В целом, интродукция специфических Fc-мутантов значительно повышала ADCC-активность гуманизированного МАт В0. Результаты эксперимента представлены на фиг. 8.

Пример 9. Проапоптозная активность МАт А0 и В0.

Данные о проапоптозной активности МАт А0 и В0 в отношении клеток линии Ramos до и после перекрестного сшивания с МАт к IgG представлены на фиг. 9. Анализ апоптозной активности осуществля-

ли согласно методу, описанному в примере 6, для перекрестного сшивания антител добавляли к антителам антитело к человеческому IgG (специфическое для γ -цепи; фирма Sigma) в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 15 мин при 37°C перед добавлением клеток-мишеней. На фиг. 9 представлены данные эксперимента, при осуществлении которого CD37-специфические перекрестно сшитые и несшитые МАт добавляли в концентрации 1 мкг/мл. Установлено, что химерное МАт А0 является сильным индуктором апоптоза даже без перекрестного сшивания, это действие существенно повышалось после перекрестного сшивания МАт. При создании изобретения неожиданно было установлено, что без перекрестного сшивания у гуманизированного МАт В0 полностью отсутствовала проапоптотная активность, однако у него обнаружена выраженная проапоптотная активность после перекрестного сшивания с Ат к IgG. В целом, в этом эксперименте установлено, что проапоптотная активность гуманизированной версии МАт А0 может восстанавливаться после перекрестного сшивания антитела.

Пример 10. Проапоптотная активность версий МАт А0 со сконструированными Fc.

Проапоптотную активность версий химерного МАт А0 со сконструированными Fc в отношении клеток Ramos оценивали с помощью окрашивания аннексином V/PI согласно методу, описанному в примере 6. Родительское антитело А0 и варианты со сконструированными Fc А2 и А4 титровали с использованием концентраций от 0,1 до 10000 нг/мл. Как видно из данных, представленных на фиг. 10, для всех трех антител характерна близкая проапоптотная активность. В целом, результаты, полученные в этом эксперименте, свидетельствуют о том, что у МАт А0 со сконструированным Fc проапоптотная активность не изменялась.

Пример 11.

а) Анализ способности антител А2 и В2 со сконструированными Fc вызывать В-клеточное истощение в цельной крови.

Эффективность и способность в отношении истощения здоровых В-клеток из человеческой крови оценивали с помощью анализа цельной крови. В этом формате анализа тестируемое антитело добавляли в обработанные ЭДТК образцы человеческой крови здоровых индивидуумов и затем после инкубации в течение 3-4 ч при 37°C определяли количество В-клеток с помощью 4-цветного FACS-анализа. Путем сравнения с буфером или IgG-контролями рассчитывали степень В-клеточного истощения, вызываемого тестируемым агентом. Благодаря присутствию определенных уровней человеческого IgG и эффекторных клеток, что аналогично ситуации, которая имеет место в организме человека *in vivo*, этот тип анализа можно рассматривать как надежный инструмент прогнозирования действия тестируемых антител *in vivo*.

Количественный FACS-анализ использовали для определения количества В-клеток и/или собранных Ramos-клеток в образцах крови здоровых индивидуумов. Для осуществления количественного анализа применяли пробирки фирмы BD Trucount, содержащие известное количество флуоресцентных гранул, которые служили в качестве внутреннего стандарта при количественном определении представляющей интерес популяции клеток. В-клетки идентифицировали с помощью 4-цветного анализа с использованием 4 различных CD-маркеров (CD3/CD14/CD19/CD45) в сочетании с FSC/SSC-анализом.

По 270 мкл свежей крови на лунку инкубировали в 48-луночной планшете вместе с 30 мкл разведения антитела (в 3ФР) или с 3ФР (контроль, представляющий собой буфер), опыт осуществляли с дублированием. Образцы инкубировали в течение 4 ч при 37°C и после этого немедленно помещали на лед. В пробирки фирмы Trucount добавляли по 33 мкл мастер-смеси CD-маркеров и 50 мкл смеси крови-антитела. Образцы интенсивно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 450 мкл буфера для лизиса, интенсивно перемешивали и инкубировали в течение еще 15 мин при комнатной температуре. Образцы помещали на лед и немедленно подвергали FACS-анализу с помощью проточного цитометра типа BD FACS Canto™. Для оценки данных использовали программу BD FACSDiva (версия 5.0.2).

Химерные и гуманизированные МАт А2 и В2 со сконструированными Fc характеризовались очень высокой активностью в отношении истощения здоровых В-клеток, и при этом значения EC₅₀ составляли от 0,15 до 0,35 нМ. Степень истощения здоровых В-клеток составляла от 57 до 65%. Параллельно оценивали ритуксимаб, зарегистрированное антитело, которое применяют для лечения В-NHL, и для него в этом формате анализа установлена существенно более низкая способность вызывать В-клеточное истощение (фиг. 11 А).

б) Конструирование Fc приводит к повышению способности антител А0 и В0 вызывать В-клеточное истощение по сравнению с ритуксимабом.

Воздействие МАт на В-клеточное истощение в образцах человеческой крови, полученных из здоровых индивидуумов, оценивали согласно методу, описанному в разделе а). МАт А0 и В0, в которых не осуществляли конструирование Fc, характеризовались способностью вызывать В-клеточное истощение на уровне 13-26%, что соответствует активности ритуксимаба. Конструирование Fc приводило к резкому повышению способности обоих МАт вызывать В-клеточное истощение, при этом средний процент истощения составлял 75%. Эти данные четко демонстрируют повышенную активность А2 и В2 по сравнению с ритуксимабом (фиг. 11Б).

в) Антитела A2 и B2 не вызывают истощения Т-клеток и моноцитов при анализе цельной крови.

Воздействие A2 и B2 на Т-лимфоциты (CD3-позитивные) и моноциты (CD14-позитивные) оценивали параллельно с оценкой воздействия на В-лимфоциты. Не обнаружено существенного изменения ни количества Т-клеток, ни количества моноцитов, в то время как выявлено резкое снижение количества В-клеток (фиг. 11B). Эти данные свидетельствуют о том, что A2 и B2 вызывают специфическое истощение В-клеток в человеческой крови.

Пример 12. Конструирование Fc приводит к повышению ADCC-активности по сравнению с ритуксимабом.

ADCC-активность версии МАт A2 со сконструированным Fc оценивали с использованием клеток линии Ramos в качестве клеток-мишеней. ADCC оценивали согласно описанному выше методу (пример 5). При использовании A0 с несконструированным Fc обнаружено, что обусловленный им максимальный лизис клеток-мишеней линии Ramos, ниже по сравнению с лизисом, вызываемым ритуксимабом, специфическим для CD20 антителом, которое разрешено применять для лечения пациентов, страдающих В-клеточными лимфомами. При создании изобретения неожиданно было установлено, что A0 со сконструированным Fc (т.е. A2) обладает существенно улучшенной активностью и эффективностью по сравнению с ритуксимабом. Эти результаты четко демонстрируют, что при аналогичной плотности антигенов CD20 и CD37 на поверхности клеток линий Ramos МАт к CD37 A2 со сконструированным Fc обладает более высокой ADCC-активностью по сравнению с ритуксимабом (фиг. 12).

Пример 13. Способность антител A2 и B2 со сконструированными Fc вызывать истощение клеток лимфомы при анализе цельной крови.

Эффективность и способность вызывать истощение клеток линии Ramos, клеточной линии, выведенной из крови человека, страдающего лимфомой Беркитта, оценивали с помощью анализа цельной крови, описанного в примере 11. Модификацией анализа является то, что опухолевые клетки линии Ramos отбирали примерно в 10-кратном избытке относительно эндогенных В-клеток в применяемой в качестве матрицы цельной крови, а их истощение оценивали также с помощью FACS-анализа. Для химерных и гуманизированных МАт A2 и B2 со сконструированным Fc обнаружена высокая активность в отношении истощения клеток Ramos, что характеризовалось значениями EC₅₀ от 0,35 до 0,54 нМ. Степень истощения клеток Ramos составляла от 36 до 55%. Параллельно оценивали активность ритуксимаба, зарегистрированного антитела, которое применяют для лечения В-NHL, и при этом установлено, что при использовании указанного формата анализа ритуксимаб обладал существенно более низкой способностью вызывать истощение клеток Ramos (фиг. 13).

Пример 14. In vivo эффективность антител A2 и B2 со сконструированными Fc при оценке на модели соответствующего заболевания.

Противоопухолевую эффективность in vivo МАт A2 и B2 оценивали на модели лимфомы Беркитта, для создания которой использовали клетки линии Ramos и бестимусных мышей. CD37-позитивные клетки Ramos инъецировали подкожно в бок животных и после развития опухолей начинали i.v.-обработку животных. Была выбрана схема введения, предусматривающая применение дважды в неделю (q3/4d) двух различных доз (8 и 25 мг/кг), которые оценивали параллельно. Оба МАт обладали выраженной противоопухолевой эффективностью, при этом значения Т/С составляли от 0,2 до 26%. Не обнаружено существенного различия между двумя применяемыми дозами и между двумя антителами. Однако выявлена тенденция к проявлению более высокой эффективности при обработке животных высокой дозой A2, при этом значение Т/С составляло 0,2% и у 5 из 10 животных обнаружен полный регресс опухолей. Все варианты обработки хорошо переносились, при этом не обнаружено заметной потери веса. В целом, установлено, что МАт A2 и B2 обладали выраженной противоопухолевой эффективностью на модели лимфомы Беркитта, созданной с использованием клеток линии Ramos, при этом максимальная активность достигалась уже при применении дозы 8 мг/кг. Активность оказалась сопоставимой с активностью ритуксимаба, которую оценивали параллельно. Следует заметить, что активность in vivo, выявленная при применении антител A2 и B2 со сконструированными Fc, может быть недооцененной, поскольку эти МАт оптимизированы для взаимодействия с человеческими, но не мышинными эффекторными клетками. Указанное оптимизированное взаимодействие, которое приводит к значительно повышенной ADCC-активности in vitro при применении человеческих эффекторных клеток (пример 8), не нашло своего отражения на применяемой мышинной модели. Однако полученные в этом эксперименте данные (представлены на фиг. 14), является доказательством in vivo концепции направленного воздействия на CD37, и поэтому их можно использовать для оценки терапевтической дозы, которую можно рекомендовать для применения на человеке.

Пример 15. Оценка корреляции фармакокинетического (ФК) и фармакодинамического (ФД) действия A2 и B2 на мышах с целью определения предназначенной для человека терапевтической дозы.

Оценивали корреляцию между концентрациями A2 и B2 в сыворотке и их фармакодинамическим действием на мышах с использованием модели ксенотрансплантата опухоли из клеток Ramos. Эти исследования продемонстрировали, что при использовании антител A2 и B2 в дозе 8 мг/кг (приготовлены в цитратном буфере: 25 mM Na-цитрат, 115 mM NaCl, 0,04% Твин 80, pH 6,0) происходило существенное замедление роста опухолей при оценке на указанной модели агрессивной опухоли, полученной путем

подкожного введения (s.c), при использовании схем введения антител мышам q3 или 4d, что свидетельствует о проявлении активности в течение всего периода применения доз антител. Кроме того, с использованием указанной дозы проводили фармакокинетическую оценку.

На основе сочетания результатов ФК/ФД-исследований на мышах можно рассчитывать предназначенную для человека дозу с помощью опубликованных данных для определения клиренса (CL) гуманизированных антител в организме человека (Lobo et al., 2004).

Полный расчет для A2.

Среднее значение $AUC(0-\infty)$ после введения одной дозы 8 мг/кг = 6099 мкг·ч/мл.

Принимая, что значение $AUC(0-\infty)$ для мышей = $AUC(ss, \tau)$ для мышей и $AUC(ss, \tau)/\tau = C(ave, ss)$.

$C(ave, ss)$ для мышей (в случае $\tau = 84$ ч) = 73 мкг/мл, что, вероятно эквивалентно $C(ave, ss)$ для человека (в случае $\tau = 168$ ч).

Поскольку $AUC(ss, \tau)$ для человека = D/CL и с учетом клиренса гуманизированных антител (CL) в организме человека по данным Lobo et al., 2004 составляет: CL = от 7 мл/ч/70 кг до 15 мл/ч/70 кг.

Для варианта 7 мл/ч/70 кг: $168 \text{ ч} \times 7 = 1176 \text{ мл} \times 73 \text{ мкг} = 86 \text{ мг}$.

Для варианта 15 мл/ч/70 кг: $168 \text{ ч} \times 15 = 2520 \text{ мл} \times 73 \text{ мкг} = 184 \text{ мг}$.

Таким образом, для A2 установлено, что предназначенная для еженедельного введения человеку весом 70 кг доза должна составлять 86-184 мг. С помощью указанных выше положений расчетная доза B2, предназначенная для еженедельного введения человеку весом 70 кг, должна составлять от 189 до 404 мг.

Пример 16. Антитела A2 и B2 обладают ADCC-активностью в отношении клеток множественной миеломы.

Оценивали экспрессию CD37 с использованием панели клеточных линий множественной миеломы, применяя FACS-анализ и антитела, специфические для CD37. Клетки либо инкубировали с антителом CD37, непосредственно меченным флуоресцентной меткой, или с немеченным специфическим в отношении CD37 антителом, а затем с вторичным флуоресцентно меченым антителом к первичному антителу. Флуоресцентную активность меченых клеток оценивали с помощью проточного цитометра для FACS типа Sauto (фирма BD Biosciences) и интенсивность флуоресценции подсчитывали в виде MFI с использованием программы FACS Diva. Экспрессия CD37 на клеточной поверхности обнаружена в 6 из 11 изученных образцов клеток множественной миеломы (фиг. 15). Для одной из клеточных линий (RPMI 8226) затем определяли ADCC-активность с помощью метода, описанного в примере 5, используя специфические для CD37 антитела A2 и B2. Для обоих антител продемонстрирована выраженная ADCC-активность в отношении клеток линии RPMI 8226, что характеризовалось значениями EC_{50} в пределах 25 нг/мл и максимальным клеточным лизисом примерно 20% (фиг. 16). Эти результаты свидетельствуют о том, что CD37-позитивные клетки множественной миеломы обладают чувствительностью к опосредуемому ADCC клеточному лизису при применении специфических для CD37 МАт A2 и B2.

На фиг. 15 продемонстрированы результаты FACS-анализа экспрессии CD37 в шести выведенных из множественной миеломы клеточных линиях. Незакрашенные области под кривой соответствуют данным, свидетельствующим о реактивности со специфическим для CD37 антителом, закрашенные области под кривой соответствуют данным, полученным для применяемого в качестве отрицательного контроля антитела.

Пример 17. Проапоптотная активность антител A2 и B2 в отношении полученных из организма пациента CLL-клеток.

Проапоптотную активность A2 и B2 оценивали с использованием клеток, полученных из организма пациента, страдающего хроническим лимфолейкозом (CLL). Выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) из организма пациента с диагностированным CLL после получения его информированного согласия согласно Хельсинской декларации. Первичные CLL-клетки очищали из свежесобранной крови с помощью процедуры Ficoll-Paque® plus (фирма StemCell Technologies, Мьелан, Франция) и хранили до применения при 4°C в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированной тепловой обработкой человеческой АВ-сыворотки (фирма Sigma, Франция). Культуральная среда для первичных CLL-клеток представляла собой RPMI 1640, дополненную 2 mM L-глутамином и 10% инактивированной тепловой обработкой человеческой АВ-сыворотки. Для экспериментального применения количество первичных CLL-клеток подсчитывали с помощью гемоцитометра и их жизнеспособность оценивали путем исключения 0,25% трипанового синего. Жизнеспособность образцов CLL-клеток составляла более 90%. Клетки инкубировали при 37°C в течение 24 ч с антителами в концентрации 30 мкг/мл и затем определяли процент аннексии V-позитивных клеток согласно методу, описанному в примере 6. Как видно из фиг. 17, для антител A2 и B2 со сконструированными Fc обнаружена выраженная проапоптотная активность в отношении первичных CLL-клеток, о чем свидетельствовало количество аннексии V-позитивных клеток на уровне примерно 90% (A2) и 40% (B2). Четко продемонстрировано, что оба МАт превышали по активности ритуксимаб, специфическое для В-клеток антитело, разрешенное для лечения В-NHL. Для МАт A2 также четко продемонстрирована более высокая активность по сравнению с алемтузумабом, антителом, разрешенным для лечения В-CLL.

Пример 18. Создание трансгенной мышинной модели, в которой эндогенный ген CD37 заменен его человеческим гомологом.

Конструировали предназначенный для направленного переноса вектор, который содержал кодирующую последовательность человеческого CD37 (BAC (бактериальная искусственная хромосома) ID: RP11-433N13, RP11-50I11), фланкированную нетранслируемыми последовательностями. Этот предназначенный для направленного переноса вектор (который содержал также сайты loxP, фланкирующие экзоны 3-4, и маркер для селекции нео, фланкированный сайтами frr) затем применяли для гомологичной рекомбинации, используя мышинные ES-клетки и стандартную технологию замены экзонов 1-8 мышинной геномной последовательности на человеческие последовательности-копии. Для этой цели клеточную линию C57BL/6N ES выращивали на слое фидерных клеток с инактивированным митозом, который состоял из мышинных зародышевых фибробластов (MEF), в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, которая содержала 20% FBS (фирма PAN) и 1200 ед./мл ингибирующего лейкоз фактора (фирма Millipore, ESG 1107). Подвергали электропорации 1×10^7 клеток и 30 г линейаризованного ДНК-вектора (устройство Biorad Gene Pulser) при 240 В и 500 Ф. Селекцию с помощью G418 (200 г/мл) начинали в день 2 (d2). Противоселекцию ганцикловиром (2М) начинали в d5 после электропорации. Клоны ES выделяли в d8 и анализировали с помощью Саузерн-блоттинга согласно стандартным процедурам, например, используя радиоактивно меченные ДНК-зонды, специфические для генов-мишеней, после размножения и замораживания клонов в жидком азоте. Затем создавали трансгенных животных с помощью стандартных процедур, известных в данной области, например путем инъекции бластоциста и последующего создания химерных животных. Получали животных гетерозиготных и гомозиготных по человеческому CD37 путем общепринятой селекции химерных и гетерозиготных животных соответственно. Осуществляли мониторинг успешных случаев "выключения (knock-out)" мышинного гена CD37 и "включения (knock-in)" человеческого гена CD37 на основе уровня белков с помощью стандартных процедур, например FACS-анализа лимфоцитов периферической крови или иммуногистохимического анализа срезов тканей.

Пример 19. Создание суррогатных антител.

Получали моноклональные антитела, специфические в отношении CD37 макака, путем генетической иммунизации мышей и кроликов полной кодирующей последовательностью антигена CD37 макака (регистрационный № ENSMMUT00000020744). Специфические антитела отбирали, используя рекомбинантные клетки HEK293 или CHO, экспрессирующие антиген CD37 макака, например, с помощью стандартных методов ELISA или FACS. Кодирующие последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей этих антител восстанавливали с помощью ПЦР-клонирования и применяли для создания химерных антител (согласно методу, описанному в примере 1), которые несли VH- и VL-область, выведенную из мышинного или кроличьего исходного антитела, и Fc-фрагмент, идентичный указанному фрагменту антитела, предлагаемого в изобретении, например, A2 или B2. Способность к связыванию и функциональные свойства можно исследовать с помощью систем анализов, в которых используют клетки, экспрессирующие CD37 макака, в качестве клеток-мишеней, предназначенных, например, для анализа связывания, FACS, анализа Скэтчарда, ADCC и апоптоза. И, наконец, суррогатное антитело отбирали на основе его активности в отношении истощения В-клеток в крови макака-крабоведа *in vitro*.

Пример 20. Получение продуцирующих антитела клонов.

Для получения клонов, продуцирующих антитела, предлагаемые в изобретении, например антитела A2, A4, B2 или B4, молекулу ДНК, которая кодирует полную тяжелую цепь, например, имеющую последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 27, 31, 35 или 39, соответственно встраивали в эукариотический экспрессионный вектор, обозначенный как pBI-26, который кодирует также маркер для селекции, представляющий собой дигидрофолатредуктазу из хомячка.

Молекулу ДНК, которая кодирует полную легкую цепь, например, имеющую последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 29, 33, 37 и 41 соответственно, встраивали в эукариотический экспрессионный вектор, обозначенный как pBI-49, который кодирует также маркер для селекции, представляющий собой неомифосфотрансферазу. Последовательности ДНК полных тяжелых и легких цепей полностью секвенировали.

Клеточную линию китайского хомячка CHO-DG44, выращенную в виде суспензионной культуры в средах определенного химического состава, трансфектировали совместно эукариотическими экспрессионными векторами тяжелых и легких цепей антител согласно описанному выше методу. Трансфектированные клетки отбирали в среде, дополненной гипоксантином и тимидином, и в присутствии антибиотика G418. Затем клетки подвергали стадиям селекции и амплификации с использованием возрастающих концентраций метотрексата (MTX). Отбирали на стадии амплификации в присутствии 800 нМ MTX клон индивидуальной клетки на основе характеристик роста и получали антитело во вращающихся колбах и хранили после консервирования замораживанием.

м в банке для хранения клеток (Safety Cell Bank, SCB).

Ссылки

- American Cancer Society (Cancer Facts & Figures, 2005).
- Baker и Jones, Curr Opinion in Drug Discovery & Development, 10, 2007, cc. 219-227.
- Barbas и др., Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 91, 1994, cc. 3809-3813.
- Barrena и др., Leukemia, 19, 2005, cc. 1376-1383.
- Belov и др., Cancer Research, 61, 2001, cc. 4483-4489.
- Boulianne G. L., Hozumi N. и Shulman M. J., Production of functional chimeric mouse/human antibody. Nature 312, 1984, с. 643.
- Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R., Cytometry, 17(1), 1994, cc. 75-83.
- Buchsbaum и др., Cancer Research, 52, 1992, cc. 6476-6481.
- Chothia и Lesk., J. Mol. Biol. 196, 1987, cc. 901-917.
- Coiffier B. и др., Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. Blood 92, 1998, cc. 1927-1932.
- Coiffier, JCO, 23, 2005, cc. 6387-6393.
- Edelman и др., Proc Natl Acad Sci USA, 63, 1969, cc. 78-85.
- Feugier P. и др., Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol, 23, 2005, cc. 4117-4126.
- Foran J.M. и др., European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma и previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, и small B-cell lymphocytic lymphoma. J Clin Oncol 18, 2000, cc. 317-324.
- Forstpointner R. и др., The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate и prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed и refractory follicular и mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood, 104, 2004, cc. 3064-3071.
- Francisco и др., Blood, 102(4), 15 августа 2003 г., cc. 1458-1465.
- Frank и др., Methods Enzymol., 154, 1987, cc. 221-249.

Gait M.J., *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach.*, изд-во IRL Press, Oxford, UK, 1984.

Goldenberg DM и Sharkey RM. Novel radiolabeled antibody conjugates. *Oncogene* 26, 2007, сс. 3734–3744.

Hainsworth J.D., Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. *Semin Oncol*, 31, 2004, сс. 17-21.

Hawkins и др., *J. Mol. Biol.* 254, 1992, сс. 889-896.

Hayden и Mandecki, Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. *DNA* 7(8), 1988, сс. 571-577.

Hertz T, Yanover C., PepDist: A new framework for protein-peptide binding prediction based on learning peptide distance functions. *BMC Bioinform* 7 (приложение 1), 2006, сс.3-17.

Hiddemann W. и др., Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, и prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study. Group. *Blood* 106, 2005, 3725-3732 (2005a).

Hiddemann W. и др., Treatment strategies in follicular lymphomas: current status и future perspectives. *J Clin Oncol*, 23, 2005b, сс. 6394-6399.

Howard O.M. и др., Rituximab и CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol*, 20, 2002, сс. 1288-1294.

Ichimura и др., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 44, 1991, сс. 1045-1053.

Jackson и др., *J. Immunol.* 154(7), 1995, сс. 3310-3319.

Johnson S., Bird R.E., Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies и their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203, 1991, сс. 88-98.

Jones T.D., Hanlon M., Smith B.J., Heise C.T., Nayee P.D., Sanders D.A., Hamilton A., Sweet C., Unitt E., Alexander G., Lo K.M. и др., The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Interferon Cytokine Res*, 24(9), 2004, сс. 560-572.

Jones T.D., Phillips W.J., Smith B.J., Bamford C.A., Nayee P.D., Baglin T.P., Gaston J.S., Baker M.P., Identification и removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of Factor VIII. *J Thromb Haemost*, 3(5), 2005, сс. 991-1000.

Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. и Foeller C., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5-ое изд.). NIH Publication No. 91-3242, изд-во U.S. Department of Health и Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Kahl B. и др., Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. *Ann Oncol*, 17, 2006, сс. 1418-1423.

Kaminski и др., *JCO*, 10, 1992, сс. 1696-1711.

Kipriyanow и Le Gall, *Molecular Biotechnology*, 26, 2004, сс. 39- 60.

Knobeloch и др., *MolCellBiol*, 20, 2000, сс. 5363-5369.

van der Kolk L.E., Baars J.W., Prins M.H., van Oers M.H., Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood*, 100(6), 15 сентября 2002 г., сс. 2257-2259.

McLaughlin P. и др. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*, 16, 1998, сс. 2825-2833.

Lazar и др., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11), 14 марта 2006 г., сс. 4005-4010.

Ling и MacLennan, в: *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*, изд-во Oxford University Press, 1987, сс. 302-335.

Link и др., *Journal Immunol*, 137, 1986, сс. 3013-3018.

Lobo и др., *J Pharm Sci*, 93(11), 2004, сс.2645-2668.

Lowman и др., *Biochemistry*, 30(45), 1991, сс. 10832-10837.

Marks и др., *Biotechnology* 10, 1992, сс. 779-783.

Moldenhauer G., и др., Biochemical characterization и epitope analysis of B lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering workshop monoclonal antibodies, в: *Leukocyte Typing 111*, под ред. A. McMichael, изд-во Oxford University Press, Oxford, 1987, с. 378.

- Moldenhauer G., CD37. *J. Biol Regul Homeost Agents*, 14, 2000, cc. 281-283.
- Press и др., *JCO*, 7, 1989.
- Press O.W. и др., Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med*, 329, 1993, cc. 1219-1224.
- Reche P.A., Glutting J.P., Zhang H., Reinherz E.L., Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics*, 56(6), 2004, cc. 405-419.
- Remington, *The Science и Practice of Pharmacy*, 21-ое изд., под ред. Hendrickson R.
- Romaguera J.E. и др., High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate и cytarabine. *J Clin Oncol*, 23, 2005, cc. 7013-7023.
- Sasse и др., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 53, 2000, cc. 879-885.
- Shier и др., *Gene* 169, 1995, cc.147-155.
- Schwartz-Albiez и др., *Journal Immunol* 140, 1988, cc. 905-914.
- Stemmer и др., Single-step assembly of a gene и entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164(1), 1995, cc. 49-53.
- van Spriel и др., *Journal Immunol*, 172, 2004, cc. 2953-2961.
- Suzawa и др., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2000, cc. 2175-2184..
- Tangri S., Mothe B.R., Eisenbraun J., Sidney J., Southwood S., Briggs K., Zinckgraf J., Bilsel P., Newman M., Chesnut R., LiCalsi C., Sette A., Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J Immunol*, 174(6), 2005, cc. 3187-3196.
- Thomas DA и др. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt и Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 106, 2006, cc. 1569-1580.
- Ус и др., Gene synthesis и expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 186(1), 1992, cc.143-149.
- Yelton и др., *Immunol.* 155, 1995, cc. 1994-2004.
- Zhao и др., *Blood*, 104, 2004, реферат 2515.
- Zhao X.B., Lapalombella R., Joshi T., Cheney C., Gowda A., Hayden-Ledbetter M.S., Baum P.R., Lin T.S., Jarjoura D., Lehman A., Kussewitt D., Lee R.J., Caligiuri M.A., Tridandapani S., Muthusamy N., Byrd J.C., Targeting CD37+ lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical. *Blood*, 110, 7, 1 октября 2007 г. (электронная публикация до выхода в печать,. *Blood*., 17 апреля 2007 г.).

Перечень последовательностей

<110> Берингер Ингельхайм Интенациональ ГмбХ
 <120> Антитела к CD37
 <130> 12_0278_PCT
 <160> 42
 <170> PatentIn версия 3.3
 <210> 1
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)
 <400> 1
 gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct 48
 Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc 192
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc 336
 Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110
 acc gtc tct tct 348
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

[illegible]

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

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

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

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

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

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 5
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 5
 gcc gtg cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc 48
 Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg 144
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288

```

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

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc   336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100                      105                      110

acc gtc tct tca
Thr Val Ser Ser
      115

<210> 6
<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
      115

<210> 7
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

```

<400> 7
 gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc 48
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg 144
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc agg gcc acc ctg agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336
 Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 acc gtc tct tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 8
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 9
gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc 48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg 144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gcc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag gtc 192
Ala Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Val
50 55 60
aag ggc agg ttc acc atc agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
acc gtc tct tca 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 11
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <400> 11
 gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 13
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 13

gac atc gtg atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc aag ctg ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag gcc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly


```

      50              55              60
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85              90              95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100              105

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 14
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20              25              30

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 15
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

1	5	10	15	
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac				96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	20	25	30	
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg				144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	35	40	45	
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag gcc gtg ccc agc cgg ttt agc gcc				192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60	
agc gcc tcc gcc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc				240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75	80
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg				288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	85	90	95	
acc ttc gcc gga gcc acc gag ctg gag atc aaa cgt				324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg	100	105		
<210> 16				
<211> 108				
<212> PRT				
<213> Искусственная				
<220>				
<223> Синтетическая конструкция				
<400> 16				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1	5	10	15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	35	40	45	
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg	100	105		
<210> 17				
<211> 324				
<212> ДНК				

<213> Искусственная

<220>

<223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 17

gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct gcc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag gcc gtg ccc gcc agg ttt agc gcc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc gcc tcc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

acc ttc gcc cag gcc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 19
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 19
 gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct gcc 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc cag gcc ccc aga ctg ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag gcc gtg ccc gcc agg ttt agc gcc 192
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agc gcc tcc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 acc ttc gcc cag gcc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 21
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированная последовательность мышиного иммуноглобулина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 21
 gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
 35 40 45
 tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag gcc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agc gcc tcc gcc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 acc ttc gcc gga gcc acc gag ctg gag atc aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 22
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 990

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<400> 23

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

```

aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc      336
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100      105      110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca      384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115      120      125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc      432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130      135      140

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg      480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145      150      155      160

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag      528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165      170      175

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg      576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac      624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg      672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210      215      220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag      720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
      225      230      235      240

atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat      768
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245      250      255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac      816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260      265      270

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc      864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275      280      285

ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac      912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg      960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305      310      315      320

cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa      990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325      330

```

```

<210> 24
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 25
<211> 318
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 25
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 144
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 318
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 <210> 27
 <211> 1338
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Химерная последовательность иммуноглобулина со сконструированным Fc
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)
 <400> 27
 gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct 48
 Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc 192
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc 336
 Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tgc gtc ttc ccc ctg gca Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 115 120 125	384
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 130 135 140	432
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350	1056
tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365	1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380	1152

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1200
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 28
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 29
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Химерная последовательность иммуноглобулина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(642)

<400> 29
 gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg 288
 Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336
 Thr Phe Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205
 ttc aac agg gga gag tgt
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 642
 <210> 30
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 30
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 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
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 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
 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> 31

<211> 1338

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Химерная последовательность иммуноглобулина со сконструированным Fc

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 31

gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct 48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc 192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc 336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc 480
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca 528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg 576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190


```

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc      624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
      195                      200                      205

aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca      672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
      210                      215                      220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc      720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
      225                      230                      235                      240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct      768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
      245                      250                      255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc      816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
      260                      265                      270

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca      864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
      275                      280                      285

aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc      912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
      290                      295                      300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc      960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
      305                      310                      315                      320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc      1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
      325                      330                      335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca      1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
      340                      345                      350

tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc      1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
      355                      360                      365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg      1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
      370                      375                      380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac      1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
      385                      390                      395                      400

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg      1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
      405                      410                      415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac      1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      420                      425                      430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa      1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435                      440                      445

<210> 32
<211> 446
<212> PRT

```

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 33
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Химерная последовательность иммуноглобулина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(642)

<400> 33
 gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

48

```

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat      96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
      20                      25                      30

ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
      35                      40                      45

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg      288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
      85                      90                      95

acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca      336
Thr Phe Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100                      105                      110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga      384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115                      120                      125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc      432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130                      135                      140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag      480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145                      150                      155                      160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc      528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165                      170                      175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac      576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180                      185                      190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc      624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195                      200                      205

ttc aac agg gga gag tgt      642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

```

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 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
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 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
 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> 35
 <211> 1338
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированная последовательность иммуноглобулина со
 сконструированным Fc

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<400> 35

gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc gcc agc Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15	48
agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc gcc tac Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr 20 25 30	96
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	144
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe 50 55 60	192
aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 100 105 110	336
acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 115 120 125	384
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 130 135 140	432
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	816

260	265	270	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285			864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300			912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320			960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335			1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350			1056
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365			1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380			1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400			1200
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415			1248
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430			1296
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445			1338
<210> 36			
<211> 446			
<212> PRT			
<213> Искусственная			
<220>			
<223> Синтетическая конструкция			
<400> 36			
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr 20 25 30			
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

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

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

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 37
<211> 642
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность иммуноглобулина

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 37
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65	70	75	80	
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg				288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	85	90	95	
acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca				336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	100	105	110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga				384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	115	120	125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc				432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	130	135	140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag				480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	145	150	155	160
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc				528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	165	170	175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac				576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	180	185	190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc				624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	195	200	205	
ttc aac agg gga gag tgt				642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210			
<210> 38				
<211> 214				
<212> PRT				
<213> Искусственная				
<220>				
<223> Синтетическая конструкция				
<400> 38				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1	5	10	15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr				
	20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val				
	35	40	45	
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly				
	50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65	70	75	80	

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

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

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
130 135 140

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

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

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> 39
<211> 1338
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность иммуноглобулина со
сконструированным Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 39
gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc 48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg 144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 100 105 110	336
acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tgc gtc ttc ccc ctg gca Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 115 120 125	384
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 130 135 140	432
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008

```

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca      1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
      340      345      350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc      1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
      355      360      365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg      1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
      370      375      380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac      1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
      385      390      395      400

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg      1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
      405      410      415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac      1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      420      425      430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa      1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435      440      445

<210> 40
<211> 446
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

```

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

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

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

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 41
<211> 642
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность иммуноглобулина

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 41
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag gcc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agc gcc tcc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95
acc ttc gcc cag gcc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
cca tct gtc ttc atc ttc cgg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 ttc aac agg gga gag tgt 642
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 42
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 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
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 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
 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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерная молекула антитела, которая связывается с человеческим CD37, характеризующаяся тем, что она содержит:

I) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

II) вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

III) константную область тяжелой и легкой цепей антитела человеческого происхождения, где молекула антитела имеет одну или несколько мутаций в Fc-фрагменте, которые модулируют одну или несколько эффекторных функций, причем одна или несколько мутаций в Fc-фрагменте представляет(ют) собой замену, выбранную из группы I332E и S239D или I332E и G236A, или S239D, I332E и G236A.

2. Молекула антитела по п.1, в которой:

I) константная область тяжелой цепи происходит из IgG1, а

II) константная область легкой цепи происходит из каппа-цепи.

3. Молекула антитела по п.1, где указанная модуляция эффекторной функции представляет собой повышение антитело-обусловленной клеточно-зависимой цитотоксичности.

4. Молекула антитела по любому из пп.1-3, которая имеет тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

5. Молекула антитела по любому из пп.1-3, которая имеет тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

6. Молекула антитела по любому из пп.1-3, которая имеет тяжелую цепь, содержащую константную область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую константную область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

7. Антитело, которое связывается с человеческим CD37 и имеет тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

8. Антитело, которое связывается с человеческим CD37 и имеет тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

9. Антитело, которое связывается с человеческим CD37 и имеет тяжелую цепь, содержащую константную область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую константную область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

10. Молекула ДНК, содержащая область, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи антитела по одному из пп.1-9.

11. Молекула ДНК по п.10, в которой область, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, слита с областью, кодирующей константную область тяжелой цепи антитела человеческого происхождения, предпочтительно константная область тяжелой цепи антитела человека происходит из IgG1.

12. Молекула ДНК по п.11, содержащая последовательность, выбранную из группы, которая включает SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 23.

13. Молекула ДНК, содержащая область, которая кодирует вариабельную область легкой цепи антитела по одному из пп.1-9.

14. Молекула ДНК по п.13, в которой область, кодирующая вариабельную область легкой цепи, слита с областью, кодирующей константную область легкой цепи антитела человеческого происхождения, предпочтительно константная область легкой цепи происходит из каппа-цепи.

15. Молекула ДНК по п.14, содержащая последовательность, выбранную из группы, которая включает SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 25.

16. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК по любому из пп.10-12 и/или молекулу ДНК по одному из пп.13-15.

17. Экспрессионный вектор по п.16, который содержит молекулу ДНК по пп.12 и/или 15.

18. Клетка-хозяин для получения антитела по пп.7-9, содержащая экспрессионный вектор по п.16.

19. Клетка-хозяин по п.18, несущая экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК по п.12, и второй экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК по п.15.

20. Способ получения антитела по любому из пп.1-9, включающий трансфекцию клетки-хозяина млекопитающего одним или несколькими векторами по п.17, культивирование клетки-хозяина выделение и очистку молекулы антитела.

21. Фармацевтическая композиция для лечения В-клеточного злокачественного заболевания, где В-клеточное злокачественное заболевание выбрано из группы, включающей В-клеточную неходжкинскую

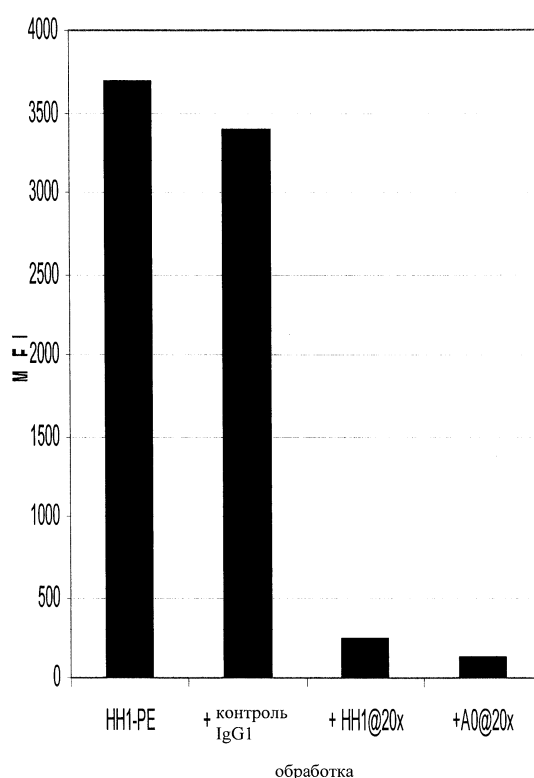
лимфому, В-клеточный хронический лимфолейкоз и множественную миелому, содержащая в качестве действующего вещества эффективное количество одного или нескольких молекул антител к CD37 по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, дополнительно содержащая одно или несколько дополнительных терапевтических средств, представляющих собой агенты, мишенью которых является В-клеточный антиген CD20.

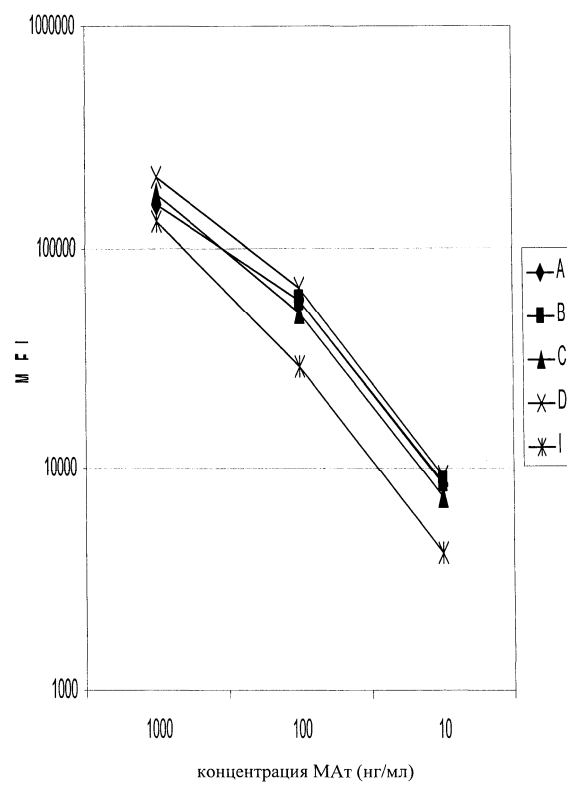
23. Применение фармацевтической композиции по пп.21, 22 для истощения В-клеток, на поверхности которых экспрессируется CD37.

24. Применение фармацевтической композиции по пп.21, 22 для лечения В-клеточного злокачественных заболеваний, где В-клеточное злокачественное заболевание выбрано из группы, включающей В-клеточную неходжкинскую лимфому, В-клеточный хронический лимфолейкоз и множественную миелому.

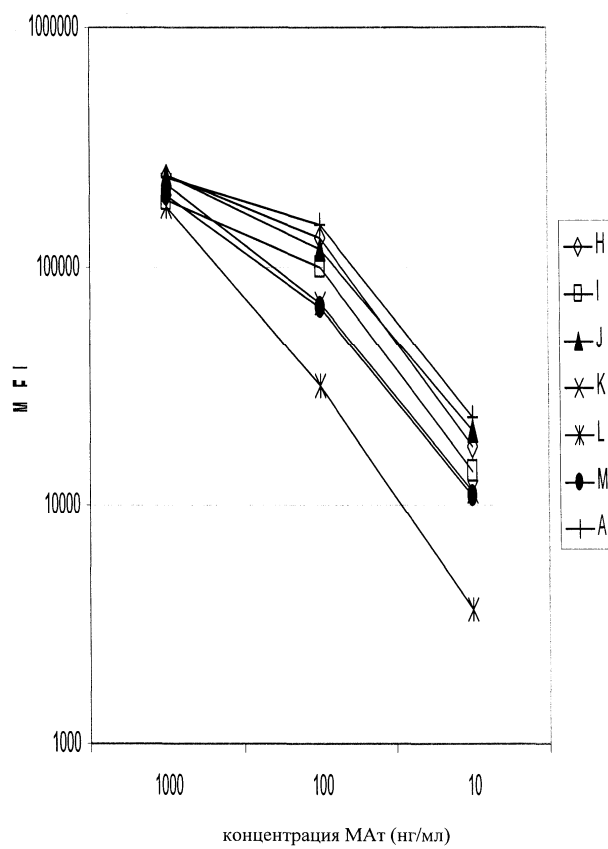
25. Способ истощения экспрессирующих CD37 В-клеток в популяции клеток, заключающийся в том, что обрабатывают популяцию клеток молекулой антитела по одному из пп.1-9 или фармацевтической композицией, которая содержит указанную молекулу антитела, где этот способ осуществляют *in vitro*.



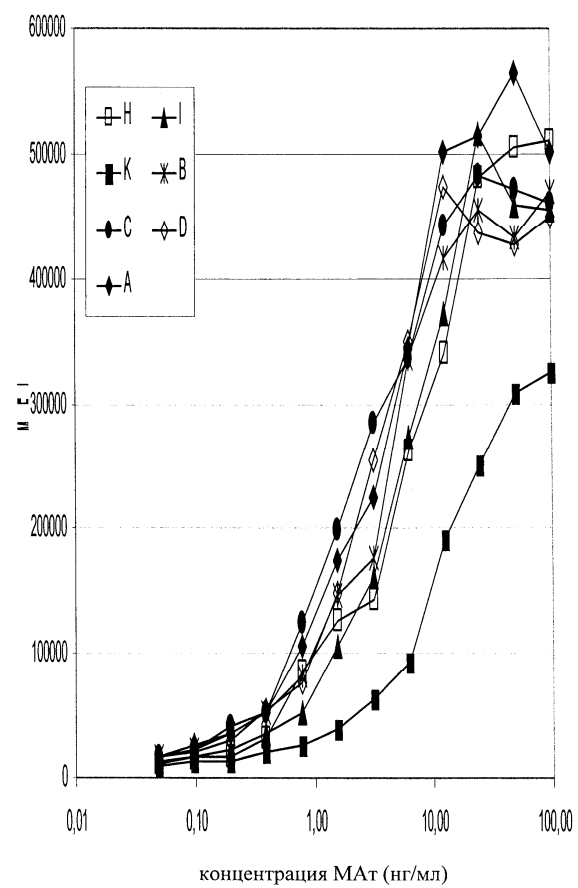
Фиг. 1



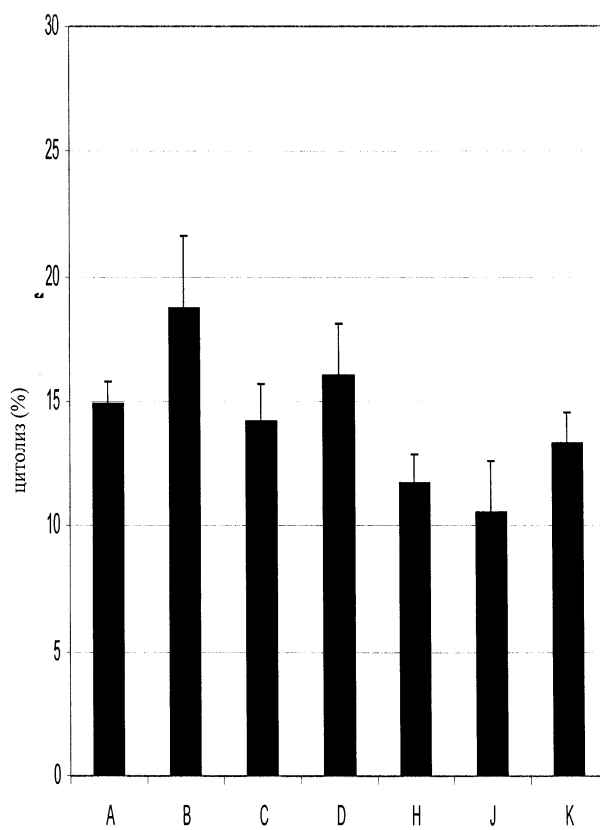
Фиг. 2



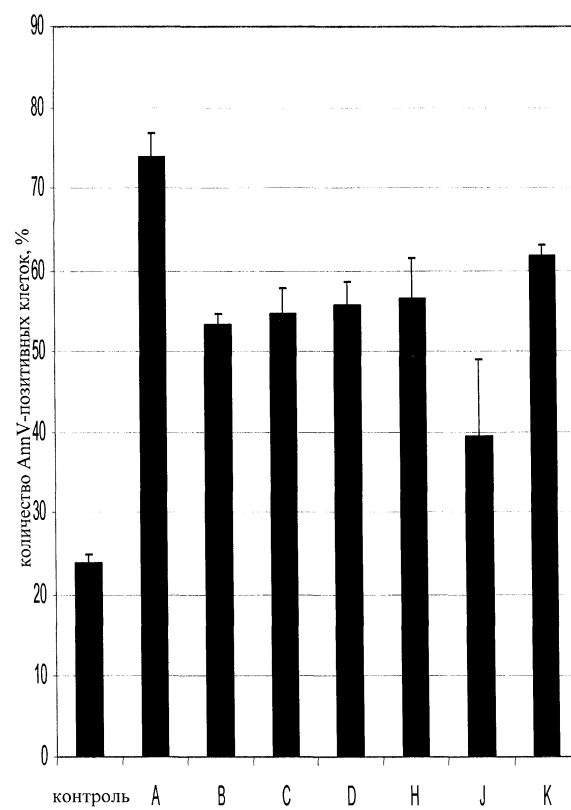
Фиг. 3



Фиг. 4

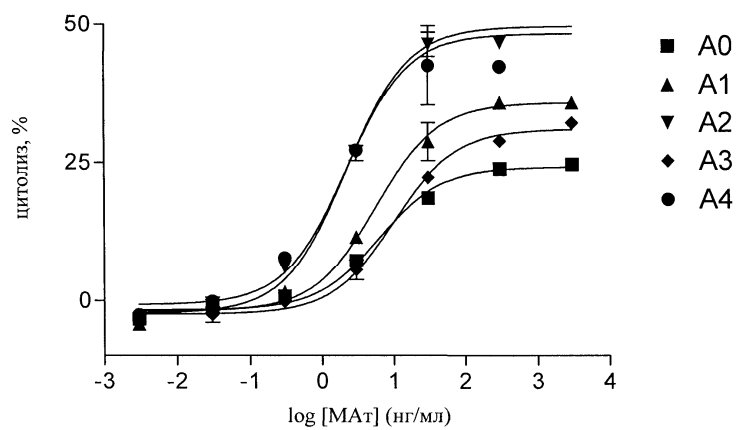


Фиг. 5



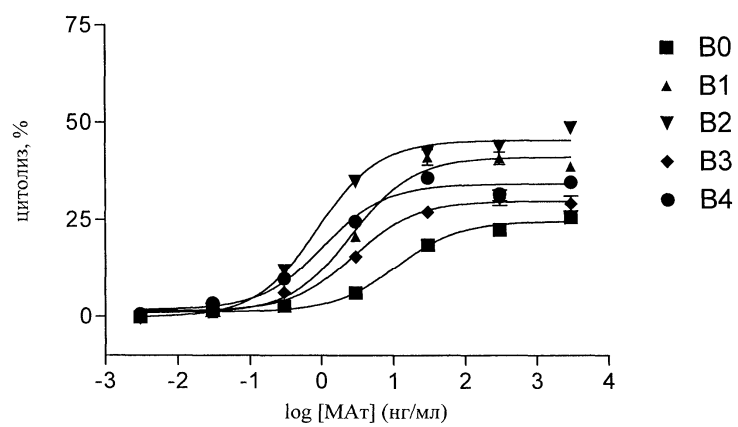
Фиг. 6

ADCC-активность в отношении клеток линии Ramos

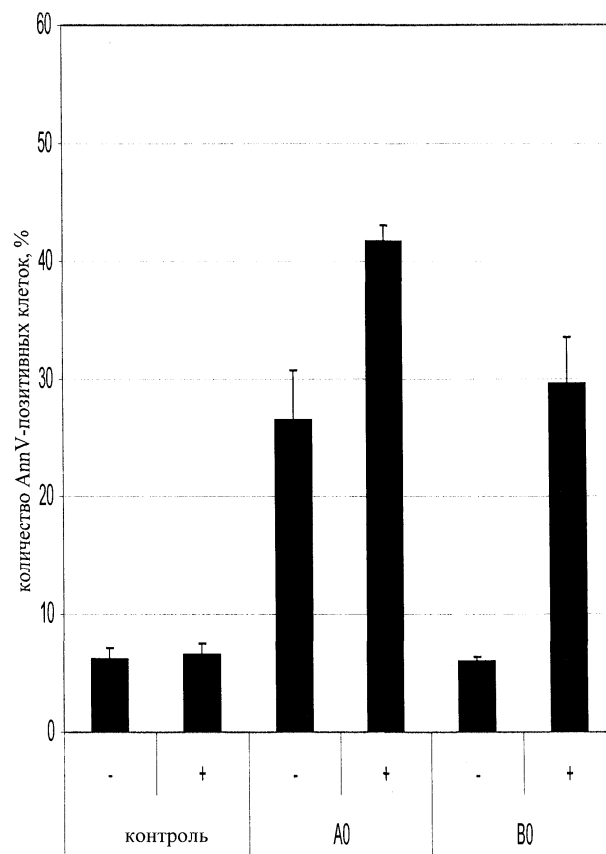


Фиг. 7

ADCC-активность в отношении клеток линии Ramos

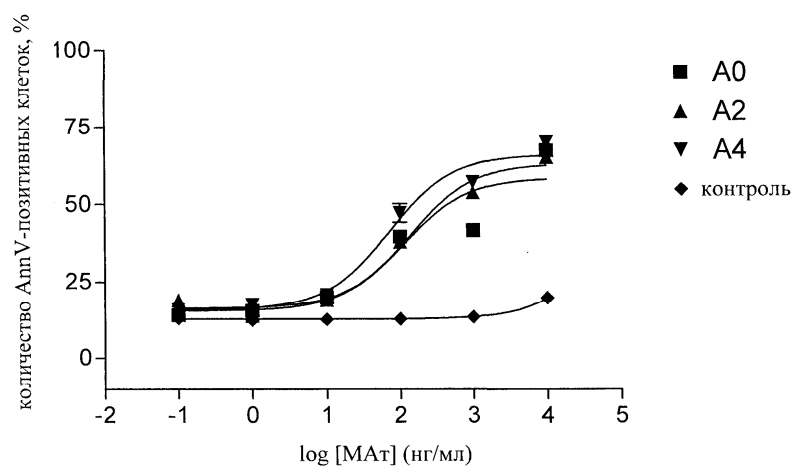


Фиг. 8

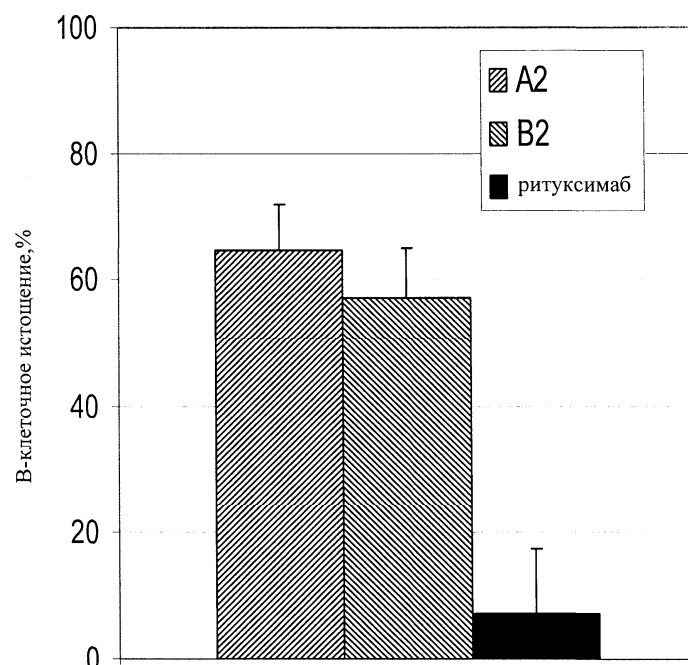


Фиг. 9

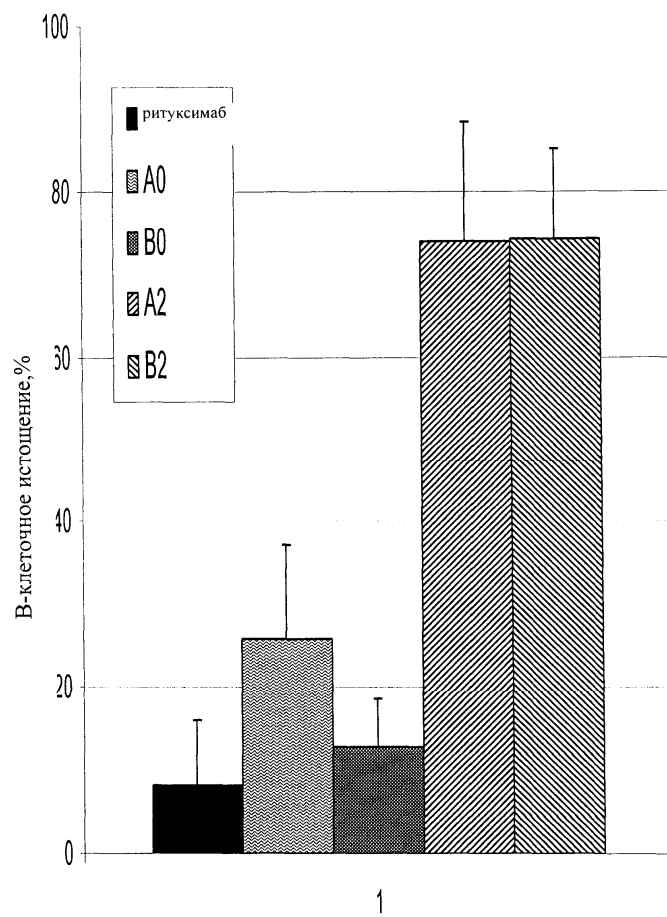
Апоптоз клеток линии Ramos



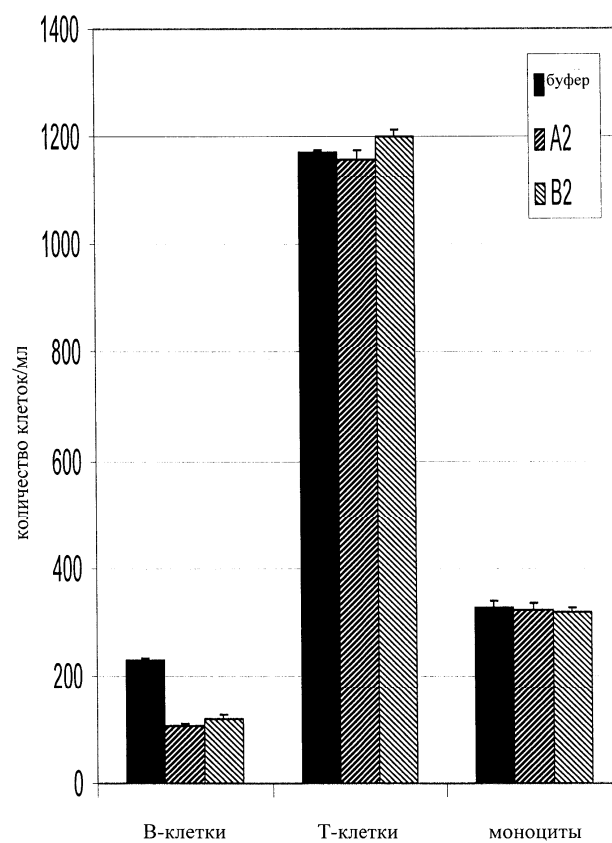
Фиг. 10



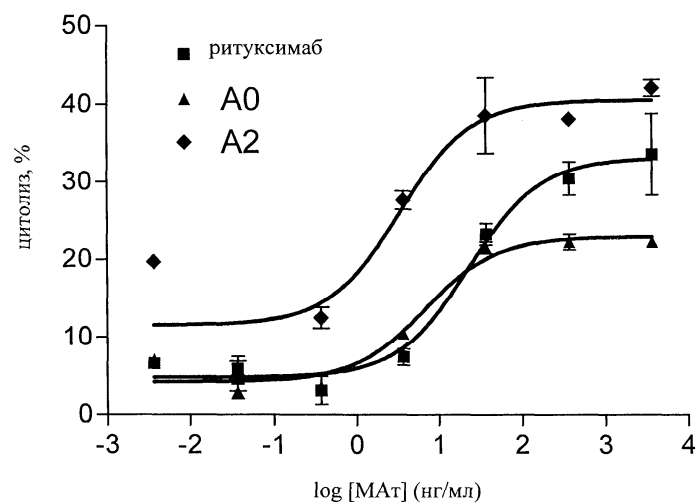
Фиг. 11А



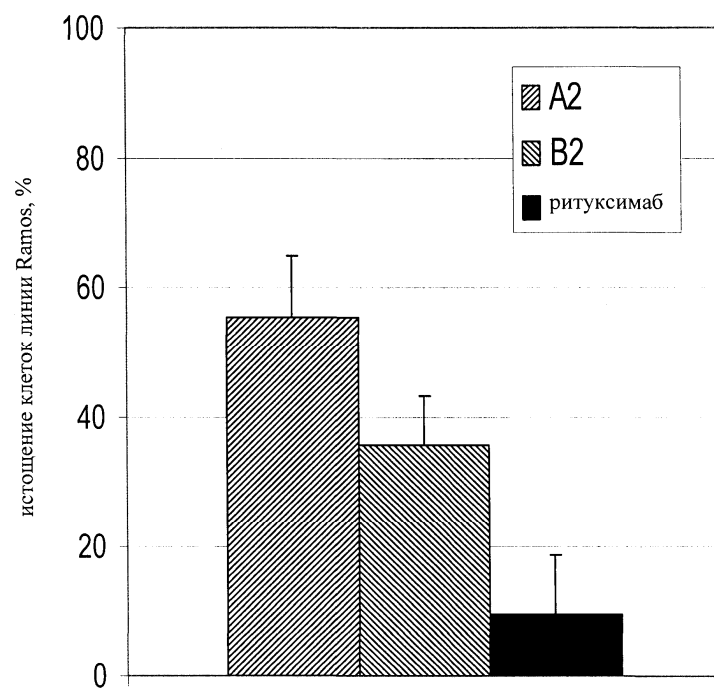
Фиг. 11Б



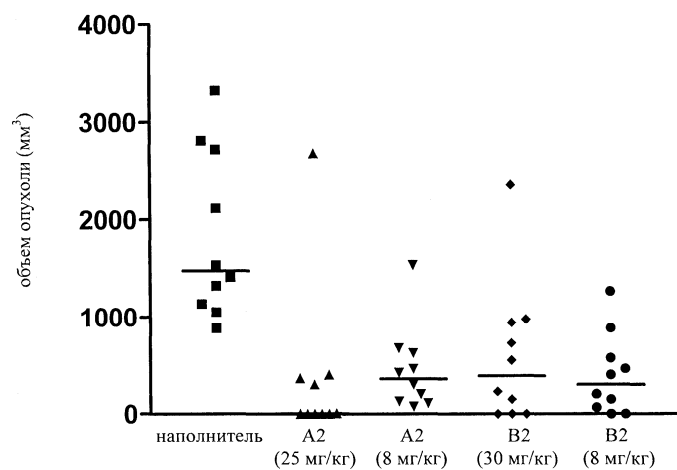
Фиг. 11В



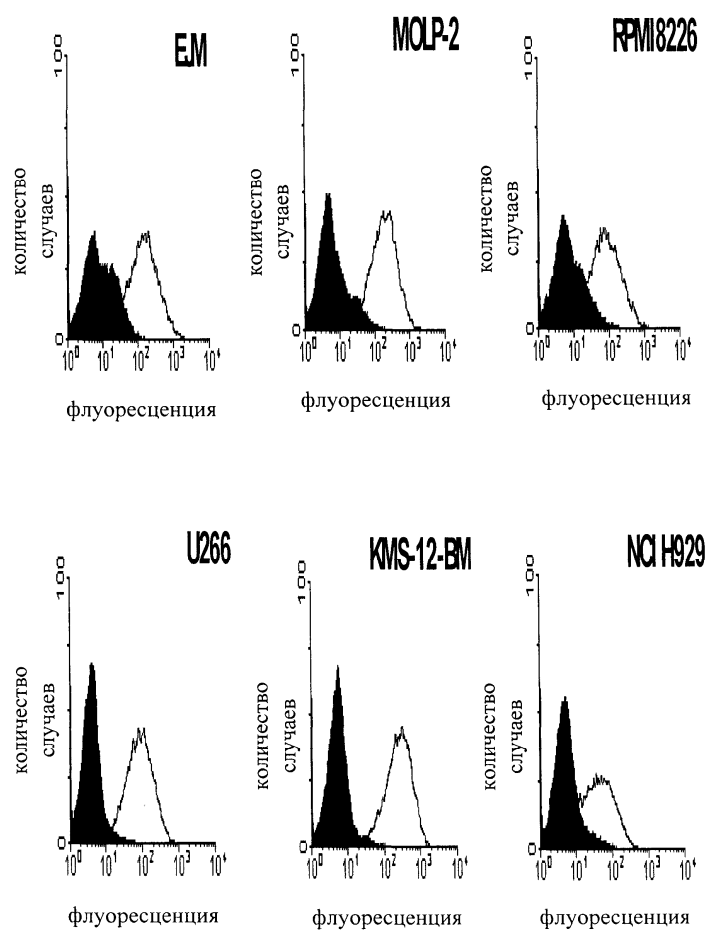
Фиг. 12



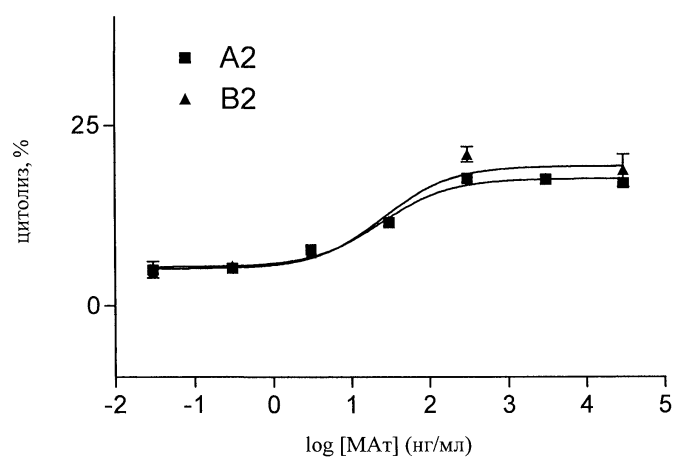
Фиг. 13



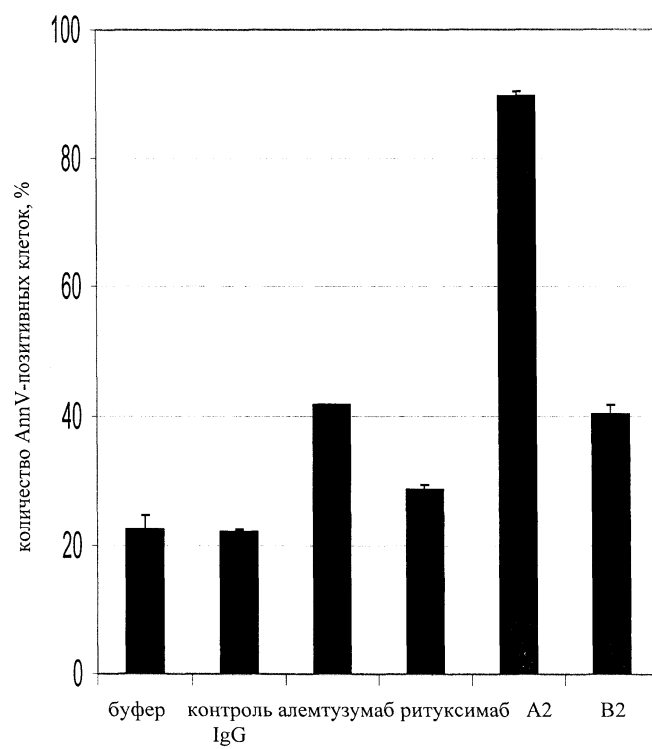
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

