

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044601**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890347

(22) Дата подачи заявки
2016.08.26

(54) **АНТИТЕЛА И ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ CD37**

(31) **62/211,455; 62/212,183**

(32) **2015.08.28; 2015.08.31**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/US2016/048887**

(87) **WO 2017/040247 2017.03.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЕБИОФАРМ ИНТЕРНЭШНЛ, С.А.
(CH)**

(72) Изобретатель:
**Декерт Ютта, Таварес Даниэль, Жуй
Линьюнь, Лёбрих Свен, Келли Меган
(US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-20130295104
US-A1-20050287538
US-A1-20060039913
US-A1-20090269336
MARKEN et al. "Membrane Topology of the
L6 Antigen and Identification of the Protein Epitope
Recognized by the L6 Monoclonal Antibody", Journal
of Biological Chemistry, 11 March 1994 (11.03.1994),
Vol. 269, Pgs. 7397-401, entire document
US-A1-20130058947
US-A1-20090041783**

(57) Настоящее изобретение в целом относится к антителам, которые связываются с CD37 человека, а также диагностическим исследованиям для нацеленного на CD37 лечения.

B1

044601

**044601
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/211,455, поданной 28 августа 2015 г., и предварительной заявки на патент США № 62/212,183, поданной 31 августа 2015 г., каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к диагностическим исследованиям и наборам для нацеленного на CD37 лечения, а также антителам, которые связываются с CD37 человека.

Уровень техники

Рак является одной из основных причин смерти в развитых странах, только в Соединенных Штатах рак диагностирован более чем у одного миллиона человек и вызывает 500000 смертей в год. В целом, по оценкам, более чем у 1 из 3 человек будет развиваться некоторая форма рака в течение жизни.

Антиген лейкоцитов CD37 ("CD37"), также известный как GP52-40, тетраспанин-26 или TSPAN26, представляет собой трансмембранный белок суперсемейства тетраспанинов (Maesker et al., 1997, FASEB J. 11:428-442). Указанный белок представляет собой сильно гликозилированный белок с четырьмя трансмембранными доменами, который экспрессируется на поверхности В-клеток на стадиях от пре-В-клеток до зрелых периферических В-клеток, но отсутствует на конечной стадии дифференцировки в плазматические клетки (Link et al., 1987, J. Pathol. 152:12-21). Антиген CD37 лишь в незначительной степени экспрессирован на Т-клетках, миелоидных клетках и гранулоцитах (Schwartz-Albiez et al., 1988, J. Immunol., 140(3):905-914). Однако CD37 также экспрессируется на злокачественных В-клетках, таких как В-клетки, обнаруживаемые при неходжкинской лимфоме (НХЛ) и хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) (Moore et al., 1986, J. Immunol. 137(9):3013-8). Этот профиль экспрессии позволяет предположить, что CD37 представляет собой перспективную терапевтическую мишень для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, экспрессирующих CD37. Однако для того, чтобы эти способы лечения были максимально эффективными, необходимо иметь возможность чувствительного и специфичного определения CD37 в динамическом диапазоне.

Краткое описание изобретения

В настоящем описании предложены антитела к CD37 и их антигенсвязывающие фрагменты, а также способы обнаружения CD37, диагностики ассоциированных с CD37 заболеваний и расстройств (таких как рак), контроля эффективности нацеленных на CD37 способов лечения, и разделения пациентов на группы. Антитела к CD37 и их антигенсвязывающие фрагменты являются особенно предпочтительными в силу того, что они обеспечивают возможность более специфичного и выраженного окрашивания, а также окрашивания без ядерного фона. Антитела к CD37 и их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с эпитопом, который содержит одну или более из аминокислот 110-137 CD37. Антитела к CD37 и их антигенсвязывающие фрагменты также могут связываться с полипептидом, содержащим аминокислоты 107-242 CD37 (SEQ ID NO: 20) и/или с полипептидом, содержащим аминокислоты 107-235 CD37 (SEQ ID NO: 19), при этом указанные антитела к CD37 и их антигенсвязывающие фрагменты не связываются с полипептидом, состоящим из аминокислот 138-235 CD37.

В одном из вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию специфично связывается с тем же эпитопом CD37, что и антитело, содержащее полипептид, представленный SEQ ID NO: 9, и полипептид, представленный SEQ ID NO: 10.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию специфично связывается с CD37 и конкурентно ингибирует связывание с CD37 антитела, содержащего полипептид, представленный SEQ ID NO: 9, и полипептид, представленный SEQ ID NO: 10.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию содержит последовательности варибельной области тяжелой цепи CDR1, CDR2 и CDR3, представленные SEQ ID NO: 3-5 соответственно, и последовательности варибельной области легкой цепи CDR1, CDR2 и CDR3, представленные SEQ ID NO: 6-8 соответственно.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию специфично связывается с CD37, и указанное антитело или его фрагмент содержит последовательности варибельной области тяжелой цепи CDR1, CDR2 и CDR3, представленные SEQ ID NO: 3-5, и последовательности варибельной области легкой цепи CDR1, CDR2 и CDR3, представленные SEQ ID NO: 6-8 соответственно.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию содержит полипептидные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные полипептидным последовательностям, представленным SEQ ID NO: 9 и 10. В другом варианте реализации указанные полипептидные последовательности по меньшей мере на 95% идентичны полипептидным последовательностям, представленным SEQ ID NO: 9 и 10. В другом варианте реализации указанные полипептидные последовательности по меньшей мере на 99% идентичны полипептидным последовательностям, представленным SEQ ID NO: 9 и 10. В другом варианте реализации указанные полипептидные последовательности содержат аминокислоты последовательностей SEQ ID NO: 9 и 10.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию специфично связывается с CD37, причем указанное антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию специфично связывается с CD37, причем указанное антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию получают рекомбинантным способом. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является мышиным, отличным от человеческого, гуманизированным, химерным или человеческим. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет измененную поверхность. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, одноцепочечный Fv или scFv, стабилизированный дисульфидной связью Fv, домен V-NAR, IgNar, интраантитело, IgGΔCH₂, мини-антитело, F(ab')₃, тетратело, триотело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂ или scFv-Fc. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv или scFv, стабилизированный дисульфидной связью Fv, интраантитело, IgGΔCH₂, мини-антитело, F(ab')₃, тетратело, триотело, диатело, DVD-Ig, mAb₂, (scFv)₂ или scFv-Fc. В другом варианте реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент продуцируется клеткой. В другом варианте реализации указанная клетка выделена. В другом варианте реализации предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий (а) культивирование клетки и (б) выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культивированной клетки.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD37 человека со значением K_d, составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 нМ. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD37 человека со значением K_d, составляющим 1,0 нМ, или лучше.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, содержащим, по существу состоящим из или состоящим из аминокислот 107-242 CD37 (SEQ ID NO: 20). В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, содержащим, по существу состоящим из или состоящим из аминокислот 107-235 CD37 (SEQ ID NO: 19). В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 16. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 17. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, содержащим аминокислоты 107-242 CD37 (SEQ ID NO: 20), но не связывается с полипептидом, состоящим из аминокислот 138-235 CD37. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, содержащим аминокислоты 107-235 CD37 (SEQ ID NO: 19), но не связывается с полипептидом, состоящим из аминокислот 138-235 CD37.

В другом варианте реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 15, но не связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 18. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 16, но не связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 18. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 17, но не связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 18. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одной аминокислотой из аминокислот 110-137 CD37.

В другом варианте реализации аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента измеряют с помощью проточной цитометрии, Вiascore, иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммуноанализа.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет обнаруживаемую метку. В другом варианте реализации метка выбрана из группы, состоящей из иммунофлуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, фосфоресцирующей метки, ферментной метки, радиоактивной метки, авидина/биотина, частицы коллоидного золота, окрашенной частицы и магнитной частицы. В другом варианте реализации предложена композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и буфер, выбранный из группы, состоящей из буфера для иммуногистохимии (ИГХ), буфера для иммуноферментного анализа (ELISA) и буфера для анализа методом сортировки флуорес-

центно-активированных клеток (FACS).

В другом варианте реализации предложен способ обнаружения экспрессии CD37 в образце, включающий приведение указанного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или композицией согласно настоящему описанию.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет обнаруживаемую метку. В другом варианте реализации метка выбрана из группы, состоящей из иммунофлуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, фосфоресцирующей метки, ферментной метки, радиоактивной метки, авидина/биотина, частицы коллоидного золота, окрашенной частицы и магнитной частицы. В другом варианте реализации метка представляет собой ферментную метку.

В другом варианте реализации экспрессию CD37 определяют с помощью радиоиммуноанализа, анализа методом вестерн-блоттинга, цитометрии, иммунофлуоресцентного анализа, иммуноферментного анализа, иммунопреципитационного анализа, хемилюминесцентного анализа или иммуногистохимического анализа. В другом варианте реализации экспрессию CD37 определяют с помощью иммуногистохимического анализа.

В другом варианте реализации предложен способ повышения эффективности лечения рака с применением терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий введение указанного терапевтически активного агента субъекту, имеющему рак, при котором в образце рака от указанного субъекта с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции согласно настоящему описанию была обнаружена повышенная экспрессия CD37.

В другом варианте реализации предложен способ идентификации рака, который, вероятно, может реагировать на терапевтически активный агент, содержащий антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий (а) приведение биологического образца, содержащего клетки указанного рака, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или композицией; (б) обнаружение связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с CD37 в биологическом образце (а); (с) присвоение значения связыванию, обнаруженному на стадии (б), где указанное значение присваивают на основании сравнения с одним или более эталонными образцами; и (д) сравнение значения, полученного на стадии (с), со значением для эталонной ткани или клетки, где значение для уровня CD37 указанного рака, превышающее значение для эталонного образца с нормальной или низкой экспрессией CD37, или значение для уровня CD37 указанного рака, равное или превышающее значение для эталонного образца с высокой экспрессией CD37, указывает на рак, который, вероятно, может реагировать на антитело к CD37.

В другом варианте реализации предложен способ лечения пациента, имеющего рак, включающий (а) определение значения уровня экспрессии CD37 на основании обнаружения экспрессии CD37 в образце рака, полученном от указанного пациента, где указанное обнаружение выполняют с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции; и (б) введение терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, если указанное значение показывает, что пациент получит пользу от введения терапевтически активного агента.

В другом варианте реализации способ лечения пациента, имеющего рак, включает (а) определение значения уровня экспрессии CD37 на основании обнаружения экспрессии CD37 в образце рака, полученном от указанного пациента, где указанное обнаружение выполняют с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции; и (б) инструктирование лица, предоставляющего медицинские услуги, по введению терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, если указанное значение показывает, что пациент получит пользу от введения терапевтически активного агента.

В другом варианте реализации способ лечения пациента, имеющего рак, включает (а) предоставление образца рака, полученного от пациента, имеющего рак, для определения значения уровня экспрессии CD37 на основании обнаружения экспрессии CD37 с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции и (б) введение терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, если указанное значение показывает, что пациент получит пользу от введения терапевтически активного агента.

В другом варианте реализации способ лечения пациента, имеющего рак, включает (а) обнаружение экспрессии CD37 в образце рака, полученном от указанного пациента, выполненное с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции; (б) определение значения уровня экспрессии CD37 образца рака и (с) введение терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, если указанное значение показывает, что пациент получит пользу от введения терапевтически активного агента.

В другом варианте реализации способ идентификации рака как чувствительного к лечению с применением активного агента против CD37 включает (а) определение уровня экспрессии CD37 в раковом образце указанного рака с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, включающее применение способа, который позволяет обнаружить отличия в интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания в экспрессирующем CD37 образце рака по сравнению с ин-

тенсивностью окрашивания или равномерностью окрашивания в одном или более эталонных образцов; (b) определение значения интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания CD37 для указанного образца рака и (c) сравнение значения интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания CD37, определенного на стадии (b), с относительным значением, определенным путем измерения экспрессии белка CD37 в по меньшей мере одном эталонном образце, представляющем собой образец ткани, клетки или осадка клеток, который не является чувствительным к лечению с применением терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, и где значение интенсивности окрашивания CD37 для указанного образца рака, определенное на стадии (b), превышающее указанное относительное значение, идентифицирует указанный рак как чувствительный к лечению с применением указанного терапевтически активного агента.

В другом варианте реализации способ идентификации рака как чувствительного к лечению с применением терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, включает (a) определение уровня экспрессии CD37 в раковом образце указанного рака с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, включающее применение способа, который позволяет обнаружить отличия в интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания в экспрессирующем CD37 образце рака по сравнению с интенсивностью окрашивания или равномерностью окрашивания в одном или более эталонных образцов; (b) определение значения интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания CD37 для указанного образца рака и (c) сравнение значения интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания CD37, определенного на стадии (b), с относительным значением, определенным путем измерения экспрессии белка CD37 в по меньшей мере одном эталонном образце, представляющем собой образец ткани, клетки или осадка клеток, который является чувствительным к лечению с применением терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, и где значение интенсивности окрашивания CD37 для указанного образца рака, определенное на стадии (b), превышающее или равное указанному относительному значению, идентифицирует указанный рак как чувствительный к лечению с применением указанного терапевтически активного агента. В другом варианте реализации предложен способ, который дополнительно включает введение терапевтически активного агента, содержащего антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент, субъекту, от которого был получен образец рака или биологический образец. В другом варианте реализации уровень CD37 у пациента определяют в образце рака или биологическом образце, полученном от указанного пациента. В другом варианте реализации образец рака или биологический образец представляет собой жидкий экстракт, кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость или препарат селезенки. В другом варианте реализации обнаружение осуществляют методом иммуногистохимии (ИГХ). В другом варианте реализации метод ИГХ представляет собой калиброванный метод ИГХ, который позволяет различить различные уровни экспрессии CD37. В другом варианте реализации ИГХ обеспечивает диапазон интенсивности окраски для образцов с низким уровнем экспрессии CD37, средним уровнем экспрессии CD37 или высоким уровнем экспрессии CD37. В другом варианте реализации ИГХ позволяет обнаружить отличия в интенсивности окрашивания или равномерности окрашивания в экспрессирующем CD37 образце рака или биологическом образце по сравнению с эталонным образцом. В другом варианте реализации ИГХ выполняют вручную. В другом варианте реализации ИГХ выполняют с использованием автоматизированной системы. В другом варианте реализации значение CD37 определяют на основании ИГХ. В другом варианте реализации обнаружение осуществляют с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). В другом варианте реализации эталонный образец представляет собой положительный эталонный образец или отрицательный эталонный образец. В другом варианте реализации эталонный образец включает клетки, осадок клеток или ткань.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит реагент для детекции, выбранный из группы, состоящей из иммунофлуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, фосфоресцирующей метки, фермента, радиоактивной метки, авидина/биотины, частицы коллоидного золота, окрашенной частицы и магнитной частицы. В другом варианте реализации реагент для детекции представляет собой фермент.

В другом варианте реализации рак представляет собой CD37-положительный рак. В другом варианте реализации рак представляет собой лейкоз или лимфому. В другом варианте реализации рак выбран из группы, состоящей из В-клеточных лимфом, НХЛ, В-клеточного лимфобластного лейкоза/лимфомы из клеток-предшественников и новообразований из зрелых В-клеток, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ)/лимфомы из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмочитарной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (МКЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), ФЛ низкой степени, средней степени и высокой степени, кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, MALT-типа В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, узлового типа В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, волосатоклеточного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), лимфомы Беркитта, плазмочитомы, плазмочелочной миеломы, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, макроглобулинемии Валь-

денстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы (АККЛ). В другом варианте реализации CD37-положительный рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому или мантийноклеточную лимфому. В другом варианте реализации экспрессию CD37 обнаруживают с применением по меньшей мере одного дополнительного антитела к CD37 или его антигенсвязывающего фрагмента. В другом варианте реализации экспрессию CD37 измеряют с применением двух антител к CD37 или их антигенсвязывающих фрагментов. В другом варианте реализации по меньшей мере одно дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит агент для детекции. В другом варианте реализации агент для детекции представляет собой хромогенный агент для детекции, флуорогенный агент для детекции, ферментативный агент для детекции или электрохемилюминесцентный агент для детекции. В другом варианте реализации агент для детекции представляет собой пероксидазу хрена (ПХ).

В другом варианте реализации по меньшей мере одно дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связано/связан с твердым носителем. В другом варианте реализации по меньшей мере одно дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связано/связан с планшетом для микротитрования.

В другом варианте реализации ELISA представляет собой двухслойный "сэндвич" (sandwich) ELISA.

В другом варианте реализации терапевтически активный агент содержит антитело к CD37 huCD37-3. В другом варианте реализации терапевтически активный агент представляет собой конъюгат антитело-майтаниноид, содержащий антитело к CD37 huCD37-3, мйтаниноид DM1 и нерасщепляемый N-сукцинимидил-4-(maleimidometil)циклогексанкарбоксилатный (SMCC) линкер (IMGN529).

В другом варианте реализации предложен комбинированный диагностический и фармацевтический набор, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композицию согласно настоящему описанию для применения для диагностики и терапевтически активный агент, содержащий антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения.

В другом варианте реализации антитело для детекции позволяет обнаруживать экспрессию CD37 с помощью ИГХ. В другом варианте реализации антитело для детекции позволяет обнаруживать экспрессию CD37 с помощью ELISA.

В другом варианте реализации антитело к CD37 в терапевтически активном агенте конъюгировано с цитотоксином.

В другом варианте реализации диагностический набор согласно настоящему описанию содержит антитело, его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему описанию, реагент для ИГХ и один или более стандартизированных эталонных образцов, включающих клетки, осадок клеток или фиксированные в формалине и залитые парафином образцы ткани, и при этом один или более стандартизированных эталонных образцов получены из не экспрессирующих CD37, в низкой степени экспрессирующих CD37 или в высокой степени экспрессирующих CD37 клеток, осадков клеток или тканей.

Краткое описание чертежей/фигур

На фиг. 1А и 1В представлены результаты скрининга методом ELISA для антител, полученных путем иммунизации мышей с применением белка hCD37-LEL (большой внеклеточной петли) (SEQ ID NO: 15), содержащего аминокислоты со 107 по 242 CD37 человека, слитого с гистидиновой меткой (His-tag).

На фиг. 1А показано, что супернатант клона 1В11 гибридомы связывается с различными вариантами антигена CD37, hCD37-LEL, hCD37-Fc-LAGA (LAGA относится к мутациям Fc G236A и P238A), SEQ ID NO: 17, содержащими аминокислоты со 107 по 235 CD37 человека, слитыми с доменом Fc IgG1 человека) и hCD37-ECD-Fc (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 16, содержащий аминокислоты со 107 по 235 CD37 человека, слитый с доменом Fc IgG2a мыши) как в нативных, так и в денатурирующих условиях.

На фиг. 1В показано, что супернатанты двух субклонов гибридомы, 1В11-2 и 1В11-20, связываются с hCD37-Fc-LAGA и hCD37-LEL как в нативных, так и в денатурирующих условиях.

На фиг. 2 показано, что антитело 1В11-2 связывается с нативными белками hCD37-Fc-LAGA и hCD37-LEL со значительно улучшенной аффинностью по сравнению с эталонным антителом к CD37, NCL-CD37 (клон СТ1, Leica Biosystems).

На фиг. 3 показано, что антитело 1В11-2 связывается с денатурированным белком hCD37-LEL со значительно улучшенной аффинностью по сравнению с NCL-CD37.

На фиг. 4 показано, что антитело 1В11-2 не связывается с процессированным белком hCD37-ECD-S2-Fc (S2 относится ко второму сегменту большого внеклеточного домена CD37, содержащему аминокислоты со 138 по 176, SEQ ID NO: 18), тогда как NCL-CD37 сохраняет способность к связыванию с этим белком CD37.

На фиг. 5 показаны иммуногистохимические изображения нормальной миндалины человека, окрашенной либо моноклональным антителом (МАТ) мыши NCL-CD37 (слева), либо МАТ мыши CD37 1В11-2 (справа). Стрелки указывают на зародышевые центры, мантийные зоны (и те, и другие CD37-положительны) и межфолликулярные области (CD37-отрицательны) соответственно. Черные

стрелки указывают на зародышевые центры; серые стрелки указывают на мантийные зоны (и те, и другие CD37-положительны), а неокрашенные стрелки указывают на межфолликулярные области (CD37-отрицательны). При применении антитела NCL-CD37 окраска ядер присутствует как в зародышевом центре, так и в мантийной зоне. При применении антитела 1B11-2 окраска ядер отсутствует.

На фиг. 6 показаны иммуногистохимические изображения нормального тонкого кишечника человека (верхняя панель) и нормальной поджелудочной железы человека (нижняя панель) с применением либо моноклонального антитела (МАТ) NCL-CD37 мыши (левая панель), либо МАТ 1B11-2 мыши (правая панель). Стрелками на панелях слева обозначено розовое окрашивание цитоплазмы клеток Панета (верхняя панель, обозначено черными стрелками) и островковых клеток (нижняя панель, обозначено неокрашенными стрелками), полученное с применением МАТ NCL-CD37 мыши. Стрелки на панелях справа показывают, что при применении антитела 1B11-2 это окрашивание не наблюдается в соответствующих областях.

На фиг. 7 показаны иммуногистохимические изображения ткани пациента с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (верхняя панель) и ткани пациента с фолликулярной лимфомой (нижняя панель), окрашенные с применением либо МАТ NCL-CD37 мыши (левая панель), либо МАТ 1B11-2 мыши (правая панель). Более сильное, более четкое окрашивание наблюдается для обоих типов рака при применении МАТ 1B11-2 мыши.

На фиг. 8 показаны результаты вестерн-блоттинга после электрофореза в ДНС-ПААГ в денатурирующих условиях продуктов слияния Fc с антигенами внеклеточного домена (ECD) CD37, где приведено сравнение моноклонального антитела 1B11-2 мыши с поставляемым на рынок моноклональным антителом мыши к CD37 (Leica). Маркеры молекулярной массы в килодальтонах (кДа) показаны в исходном виде и в виде схематического изображения справа.

На фиг. 9 показаны результаты вестерн-блоттинга после электрофореза в ПААГ в нативных условиях продуктов слияния Fc с антигенами внеклеточного домена (ECD) CD37, обнаруживаемые с применением моноклонального антитела 1B11-2 мыши.

Подробное описание изобретения

В настоящем описании предложены способы обнаружения CD37 человека.

Эти способы позволяют идентифицировать раковые заболевания, характеризующиеся экспрессией CD37, для улучшения эффективности лечения с применением нацеленных на CD37 терапевтических средств. Способы обнаружения могут быть использованы для разделения пациентов на группы, контроля или определения терапевтической эффективности или определения вероятности того, что рак будет реагировать на нацеленное на CD37 терапевтическое средство. Способы обнаружения позволяют обнаруживать клинически значимый динамический диапазон CD37. Также раскрыты новые связывающиеся с CD37 полипептиды, такие как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для применения в способах обнаружения (например, иммуногистохимическом (ИГХ) анализе для CD37). Связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), предложенный в настоящем описании, обеспечивает возможность более специфичного и выраженного окрашивания без ядерного фона. Связывающийся с CD37 агент связывается с эпитопом, который содержит одну или более из аминокислот 110-137 CD37. Связывающийся с CD37 агент также связывается с полипептидом, содержащим аминокислоты 107-242 CD37 (SEQ ID NO: 20), или с полипептидом, содержащим аминокислоты 107-235 CD37 (SEQ ID NO: 19), но не связывается с полипептидом, состоящим из аминокислот 138-235 CD37. Также предложены родственные полипептиды и полинуклеотиды, композиции, содержащие связывающиеся с CD37 агенты и способы получения связывающихся с CD37 агентов.

I. Определения.

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже определен ряд терминов и фраз.

Термин "CD37" в контексте настоящего описания относится к любому нативному CD37, если не указано иное. CD37 также относится к GP52-40, лейкоцитарному антигену CD37 и тетраспанину-26. Термин "CD37" охватывает "полноразмерный" непротессированный CD37, а также любую форму CD37, которая образуется в результате процессинга в клетке. Указанный термин также охватывает природные варианты CD37, например, варианты сплайсинга, аллельные варианты и изоформы. Полипептиды CD37, описанные в настоящем описании, могут быть выделены из множества источников, таких как биологические образцы человека, или из другого источника или получены рекомбинантными или синтетическими способами.

Термин "повышенная экспрессия" или "сверхэкспрессия" CD37 относится к образцу, который демонстрирует повышенные уровни экспрессии CD37. CD37 может быть повышен или сверхэкспрессирован по сравнению с отрицательным контролем или контролем с низким содержанием CD37 или по сравнению с образцом здоровой или непораженной ткани или клеток того же типа. Такая повышенная экспрессия или сверхэкспрессия может быть вызвана, например, мутацией, амплификацией гена, усиленной транскрипцией, усиленной трансляцией или повышенной стабильностью белка. В одном примере экспрессию CD37 измеряют с помощью иммуногистохимии (ИГХ) и определения значения интенсивности окрашивания или значения равномерности окрашивания путем сравнения с калиброванными контролями, имеющими установленные значения (например, исследуемому образцу присваивают значение интен-

сивности, равное 3, если его интенсивность сравнима с калиброванным контролем уровня 3, или исследуемому образцу присваивают значение интенсивности, равное 2, если его интенсивность сравнима с калиброванным контролем уровня 2). Равномерность окрашивания, которая является гетерогенной или гомогенной, также свидетельствует об увеличении экспрессии CD37. Значения интенсивности окрашивания и равномерности окрашивания могут быть применены отдельно или в комбинации (например, 2 гомо, 2 гетеро, 3 гомо, 3 гетеро и т.д.). В другом примере повышение экспрессии CD37 может быть определено посредством обнаружения повышения по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза или по меньшей мере в 5 раз относительно контрольных значений (например, уровень экспрессии в биологическом образце, ткани или клетке от субъекта, не имеющего рака или имеющего рак, не характеризующийся повышенными значениями CD37). В другом примере экспрессии CD37 присваивают H-значение. H-значения объединяют значения интенсивности окрашивания со значениями равномерности с использованием расчета, предложенного в настоящем описании. В другом примере экспрессию CD37 измеряют путем определения процентного содержания клеток, которые имеют по меньшей мере конкретный уровень окрашивания (например, по меньшей мере 25% клеток имеют значение, составляющее по меньшей мере 2, или по меньшей мере 75% клеток имеют значение, составляющее по меньшей мере 2).

"Эталонный образец" может быть применен для сопоставления и сравнения результатов, полученных способами, предложенными в настоящем описании, с исследуемым образцом. Эталонные образцы могут представлять собой клетки (например, линии клеток, осадки клеток) или ткань. Уровни CD37 в "эталонном образце" могут представлять собой абсолютное или относительное количество, диапазон количеств, минимальное и/или максимальное количество, среднее количество и/или медианное количество CD37. Диагностические способы, предложенные в настоящем описании, включают сравнение уровня экспрессии CD37 в исследуемом образце с "эталонным значением". В некоторых вариантах реализации эталонное значение представляет собой уровень экспрессии CD37 в эталонном образце. Эталонное значение может представлять собой предварительно заданное значение, а также может быть определено с помощью эталонных образцов (например, контрольных биологических образцов или эталонных образцов), исследуемых параллельно с исследуемыми образцами. Эталонное значение может представлять собой индивидуальный порог отсечения, такой как медиана или среднее, или диапазон значений, такой как доверительный интервал. Эталонные значения могут быть предварительно установлены для различных подгрупп лиц, таких как лица, предрасположенные к раку, лица, имеющие рак ранней или поздней стадии, лица мужского и/или женского пола или лица, подвергавшиеся терапии рака. Примеры отрицательных эталонных образцов или значений и положительных эталонных образцов или значений описаны в настоящем описании.

В некоторых вариантах реализации эталонный образец представляет собой образец из здоровой ткани, в частности соответствующую ткань, не пораженную раком, или соответствующую ткань, не пораженную раком, характеризующимся сверхэкспрессией CD37. Эти типы эталонных образцов называют отрицательными контрольными образцами или эталонными образцами. В других вариантах реализации эталонный образец представляет собой образец из опухоли, которая экспрессирует CD37. Эти типы эталонных образцов упоминаются как положительные контрольные образцы. Положительные контрольные образцы также могут быть использованы в качестве сравнительного индикатора типа (гетеро или гомо), степени (0, 1, 2, 3) интенсивности окрашивания, H-значения и/или процентного содержания клеток, имеющих по меньшей мере конкретный уровень окрашивания, который коррелирует с уровнем экспрессии CD37. Положительные контрольные сравнительные образцы упоминаются как калиброванные эталонные образцы. Эталонные образцы с низким уровнем или отсутствием CD37 описаны в примерах в настоящем описании и также включают красную пульпу селезенки (например, моноциты и красные клетки крови), Т-клетки и межфолликулярную область миндалин человека. Экспрессирующие CD37 эталонные образцы описаны в примерах в настоящем описании и также включают белую пульпу селезенки (например, В-лимфоциты и маргинальную зону селезенки), зародышевый центр миндалин человека и мантийную зону миндалин человека. Примеры неэкспрессирующих линий клеток включают клетки 300-19, а примеры экспрессирующих линий клеток включают В-клетки Дауди (Daudi), Ramos, Намальвы (Namalwa) и неходжкинской лимфомы RL. Другим положительным эталонным образцом с высоким уровнем CD37 является линия клеток, стабильно или временно трансфицированная CD37 (например, 300.19/CD37, как описано в опубликованной заявке США № 2015/0093397 и публикации PCT WO 2013/149171, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки). Соответствующие положительные и отрицательные эталонные уровни CD37 для конкретного рака могут быть определены путем измерения уровней CD37 у одного или более подходящих субъектов, и такие эталонные уровни могут быть адаптированы к конкретным группам субъектов (например, эталонный уровень может быть сопоставлен с возрастом так, что могут быть проведены сравнения между уровнями CD37 в образцах от субъектов определенного возраста и эталонными уровнями для конкретного течения заболевания, фенотипа или их отсутствия в определенной возрастной группе). В контексте настоящего описания "иммуногистохимия" относится к гистохимическим и иммунологическим способам, используемым для анализа, например, клеток или тканей. Таким образом, термины "иммуногистохимия", "иммуноцитохимия" и "иммунохимия" используются взаимозаменяемо.

"Образец" или "биологический образец" согласно настоящему изобретению имеет биологическое происхождение, в конкретных вариантах реализации такое, как происхождение от эукариотических организмов. В некоторых вариантах реализации образец представляет собой образец от человека, но образцы от животных также могут быть использованы в практике согласно настоящему изобретению. Неограничивающие источники образца для применения в контексте настоящего изобретения включают, например, солидные ткани, аспираты биопсий, жидкие экстракты, кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость, наружные срезы кожи, дыхательных, кишечных и мочеполовых путей, слезы, слюну, молоко, опухоли, органы, культуры клеток и/или компоненты культур клеток. "Образец рака (раковый образец)" представляет собой образец, который содержит раковую клетку. Способы, предложенные в настоящем описании, могут быть пригодны для применения для образцов солидной ткани, где количество доступного материала мало. Способы, предложенные в настоящем описании, могут быть применены для исследования аспекта экспрессии CD37 или состояния образца, включая, но не ограничиваясь ими, сравнение различных типов клеток или тканей и обнаружение или определение наличия и/или типа заболеваний или отклонения от нормы.

Для целей настоящего описания "срез" образца ткани относится к отдельной части или фрагменту образца ткани, например тонкому слою ткани или клеток, вырезанных из образца ткани. Понятно, что множество срезов образцов ткани может быть взято и подвергнуто анализу в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых случаях выбранная часть или срез ткани содержит гомогенную популяцию клеток. В других случаях выбранная часть содержит область ткани, например просвет, в качестве неограничивающего примера. Выбранная часть может быть небольшой, как одна клетка или две клетки, или может представлять собой, например, многие тысячи клеток. В большинстве случаев сбор клеток важен, и хотя настоящее изобретение было описано для применения при обнаружении клеточных компонентов, способ может также быть применен для обнаружения неклеточных компонентов организма (например, растворимых компонентов в крови в качестве неограничивающего примера).

В контексте настоящего описания термин "захватывающий реагент" относится к реагенту, способному связывать и захватывать молекулу-мишень в образце таким образом, что при подходящих условиях комплекс захватывающий реагент - молекула-мишень может быть отделен от остальной части образца. В одном из вариантов реализации захватывающий реагент иммобилизован. В одном из вариантов реализации захватывающий реагент в сэндвич-иммуноанализе представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или смесь различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов к целевому антигену.

В контексте настоящего описания термин "обнаруживаемое" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое/который может быть обнаружено либо непосредственно через метку, усиленную с помощью средства обнаружения, либо опосредованно с помощью, например, другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, являющегося меченым. Для прямого мечения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обычно конъюгируют с фрагментом, который может быть обнаружен каким-либо средством. В одном из вариантов реализации обнаруживаемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биотинилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В контексте настоящего описания термин "средство обнаружения" относится к фрагменту или методике, используемым для обнаружения присутствия обнаруживаемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и включает агенты для детекции, которые усиливают иммобилизованную метку, такую как метка, иммобилизованная на планшете для микротитрования. В одном из вариантов реализации средство обнаружения представляет собой флуориметрический агент для детекции, такой как авидин или стрептавидин.

Обычно "сэндвич-ELISA" включает следующие стадии: (1) планшет для микротитрования покрывают захватывающим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; (2) добавляют образец, и любой присутствующий антиген связывается с захватывающим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; (3) добавляют антитело для детекции или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с антигеном; (4) добавляют связанное с ферментом вторичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с антителом для детекции или его антигенсвязывающим фрагментом; и (5) добавляют субстрат, который конвертируется ферментом в обнаруживаемую форму.

Термин "метка" в контексте настоящего описания относится к обнаруживаемому соединению или композиции, непосредственно или опосредованно конъюгированному с антителом с получением "меченого" антитела. Метка может быть обнаруживаемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментной метки, может катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции, которая является обнаруживаемой.

Под терминами "коррелировать" или "коррелирующей" подразумевается сравнение любым способом характеристики и/или результатов первого анализа с характеристикой и/или результатами второго анализа. Например, можно использовать результаты первого анализа при проведении второго анализа и/или можно использовать результаты первого анализа для определения, должен ли выполняться второй анализ, и/или можно сравнивать результаты первого анализа с результатами второго анализа. В одном из

вариантов реализации повышенная экспрессия CD37 коррелирует с повышенной вероятностью эффективности нацеленной на CD37 противораковой терапии.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфично связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации указанного, посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена в пределах вариабельной области молекулы иммуноглобулина. В контексте настоящего описания термин "антитело" охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, полученные по меньшей мере из двух интактных антител, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, химерные белки, содержащие антитело, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина при условии, что указанные антитела проявляют желаемую биологическую активность. Антитело может принадлежать к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), основанных на идентичности константных доменов их тяжелых цепей, обозначаемых альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть неконъюгированными или конъюгированными с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы и т.д.

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела.

"Антигенсвязывающий фрагмент" относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариабельные области интактного антитела, соответствующие антигену. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Примеры фрагментов антител, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, включают (без ограничения) (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1 (например, антитело, расщепляемое папаином с образованием трех фрагментов: двух антигенсвязывающих фрагментов Fab и одного фрагмента Fc, который не связывает антиген); (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области (например, антитело, расщепляемое пепсином с образованием двух фрагментов: бивалентного антигенсвязывающего фрагмента F(ab')₂ и фрагмента rFc', который не связывает антиген) и родственную ему моновалентную единицу F(ab'); (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1 (т.е. та часть тяжелой цепи, которая включена в Fab); (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, и родственной стабилизированной дисульфидной связью Fv и (v) фрагмент dAb (доменное антитело) или sdAb (однодоменное антитело) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой неприродное антитело. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают очисткой из природных компонентов. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают рекомбинантным способом. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают с помощью гибридомы.

"Блокирующее" антитело или "антитело-антагонист" представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность связанного с ним антигена, такого как CD37. В конкретном варианте реализации блокирующие антитела или антитела-антагонисты в значительной степени или полностью ингибируют биологическую активность антигена. Предпочтительно, чтобы биологическая активность снижалась на 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 или даже 100%.

Термин "антитело к CD37" или "антитело, которое связывается с CD37" относится к антителу, способному связываться с CD37 с достаточной аффинностью, так что указанное антитело пригодно для применения в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на CD37. Степень связывания антитела к CD37 с посторонним белком, не являющимся CD37, составляет менее приблизительно 10% от степени связывания антитела с CD37, как измерено, например, посредством радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах реализации антитело, которое связывается с CD37, характеризуется константой диссоциации (Kd) ≤1 мкМ, ≤100 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ или ≤0,1 нМ. Примеры антител к CD37 известны в данной области техники и раскрыты, например, в опубликованной заявке США № 2011/0256153, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

"Моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к гомогенной популяции антител или антигенсвязывающих фрагментов, вовлеченной в высокоспецифическое распознавание и связывание одной антигенной детерминанты или эпитопа. Это отличает их от поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает интактные и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутанты, химерные белки, содержащие участок антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена. Кроме того, "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к таким анти-

телам и их антигенсвязывающим фрагментам, полученным любым количеством способов, включая, но не ограничиваясь ими, гибридомы, фаговый дисплей, экспрессию рекомбинантных генов и использование трансгенных животных.

Термин "гуманизованное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам антител или антигенсвязывающих фрагментов, не являющихся человеческими (например, мышинных), которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные последовательности, не являющиеся человеческими (например, мышинные). Как правило, гуманизованные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки в участках, определяющих комплементарность (CDR), заменены остатками CDR других видов, отличных от человека, (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и связывающей способностью (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525, Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327, Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536). В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками антитела или фрагмента от других видов, отличных от человека, которые имеют желаемую специфичность, аффинность и связывающую способность. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть дополнительно модифицированы посредством замещения дополнительных остатков либо в каркасном участке Fv, либо/и остатков из числа замещенных, не являющихся человеческими, для коррекции и оптимизации специфичности, аффинности и/или связывающей способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В целом гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, а как правило двух или трех переменных доменов, содержащих все или по существу все участки CDR, которые соответствуют иммуноглобулину, не являющемуся человеческим, тогда как все или по существу все участки FR представляют собой участки FR консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для получения гуманизованных антител, описаны в патентах США № 5225539 или 5639641.

Термин "первичное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем описании относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое/который специфично связывается с целевым белковым антигеном в образце. Первичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент как правило является первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, используемым при выполнении иммуногистохимического анализа. В одном из вариантов реализации первичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является единственным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, используемым при выполнении иммуногистохимического анализа.

Термин "вторичное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем описании относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое/который специфично связывается с первичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, образуя таким образом мостик между первичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и последующим реагентом, если таковой имеется. Вторичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как правило, является вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, используемым при выполнении иммуногистохимического анализа. Термин "третичное" антитело в настоящем описании относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое/который специфично связывается со вторичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, образуя таким образом мостик между вторичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и последующим реагентом, если таковой имеется.

"Переменная область" антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к переменной области легкой цепи антитела или переменной области тяжелой цепи антитела как отдельно, так и в комбинации. Переменные области тяжелой и легкой цепи состоят каждая из четырех каркасных участков (FR), соединенных тремя участками, определяющими комплементарность (CDR), также известными как гиперпеременные области. Участки CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от участков FR и вместе с участками CDR другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Существует по меньшей мере два способа определения участков CDR: (1) подход, основанный на межвидовой изменчивости последовательностей (например, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani et al. (1997), J. Molec. Biol. 273:927-948)). Помимо этого в данной области техники для определения CDR иногда используют комбинации этих двух подходов.

Систему нумерации Кабата обычно используют при указании остатков в переменной домене (остатки приблизительно 1-107 легкой цепи и остатки приблизительно 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Нумерация положения аминокислоты по Кабату относится к системе нумерации, используемой для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи в составе антител, описанной в источнике Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты в соответствии с укорочением или вставкой в участках FR или CDR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. по Кабату) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кабату для данного антитела может быть определена посредством сравнения в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Кабату. Вместо этого Чотиа указывает на расположение структурных петель (Chothia и Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации с использованием нумерации по Кабату варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это происходит потому, что схема нумерации по Кабату помещает вставки в положениях H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, то цикл заканчивается на положении 32, если присутствует только 35A, цикл заканчивается на положении 33; если присутствуют и 35A, и 35B, то цикл заканчивается на положении 34). Гиперварибельные области согласно AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Чотиа и используются программой моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

Петля	Кабат	AbM	Чотиа
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
<u>(Нумерация по Кабату)</u>			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
<u>(Нумерация по Чотиа)</u>			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Термин "антитело человека ("человеческое" антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемые человеком, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аминокислотную последовательность, соответствующую антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, продуцируемому человеком, полученные с применением любого способа, известного в данной области техники. Это определение антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты.

Термин "химерные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, в которых аминокислотная последовательность получена от двух или более видов. Как правило, варибельная область как легкой, так и тяжелой цепей соответствует варибельной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов с желаемой специфичностью, аффинностью и связывающей способностью, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), тогда как константные области гомологичны последовательностям в антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, полученных от другого вида (обычно человека), чтобы избежать возникновения иммунного ответа у этих видов.

Термины "эпитоп" или "антигенная детерминанта" используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к той части антигена, которая может быть распознана и специфично связана конкретным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В случае, когда антиген является полипептидом, эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, сближающимися при укладке белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные при укладке белка в третичную структуру, обычно теряются при денатурации белка. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а как правило по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

"Аффинность связывания" в целом относится к прочности суммарного количества нековалентных взаимодействий между отдельно взятым сайтом связывания молекулы (например, антитела) и связывающимся с ней партнером (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего описания "аффинность связывания" относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном) в отношении 1:1. Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y обычно может быть охарактеризована константой диссоциации (Kd). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем описании. Низкоаффинные антитела, как правило, медленно связываются с антигеном и склонны легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела, как правило, связываются с антигеном быстрее и склонны дольше оставаться связанными. В данной области техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых мо-

жет быть применен для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты реализации описаны ниже.

"Или лучше" в контексте настоящего описания в отношении аффинности связывания относится к более сильному связыванию между молекулой и связывающимся с ней партнером. "Или лучше" в контексте настоящего описания относится к более сильному связыванию, характеризующемуся меньшим численным значением K_d . Например, для антитела, которое имеет аффинность к антигену "0,6 нМ или лучше", аффинность антитела к антигену составляет <0,6 нМ, т.е. 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ и т.д. или любое значение менее 0,6 нМ.

Фраза "по существу подобный" или "по существу такой же" в контексте настоящего описания означает достаточно высокую степень сходства между двумя числовыми значениями (как правило, одно связано с антителом согласно настоящему изобретению, а другое связано с эталонным антителом/антителом сравнения), так что специалисту в данной области техники было бы понятно, что разница между этими двумя значениями имеет малую биологическую и/или статистическую значимость или вообще не имеет биологической и/или статистической значимости в контексте биологических характеристик, определяемых указанными значениями (например, значения K_d). Разница между указанными двумя значениями составляет менее приблизительно 50%, менее приблизительно 40%, менее приблизительно 30%, менее приблизительно 20% или менее приблизительно 10% в зависимости от значения для эталонного антитела/антитела сравнения.

"Выделенные" полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которые находятся в форме, не обнаруженной в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетка или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не находятся в форме, в которой они обнаруживаются в природе. В некоторых вариантах реализации выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция являются по существу чистыми.

В контексте настоящего описания "по существу чистый" относится к веществу, которое является по меньшей мере на 50% чистым (т.е. свободным от примесей), по меньшей мере на 90% чистым, по меньшей мере на 95% чистым, по меньшей мере на 98% чистым или по меньшей мере на 99% чистым.

Термин "иммуноконъюгат" или "конъюгат" в контексте настоящего описания относится к соединению или его производному, которое связано со связывающимся с клеткой агентом (т.е. антителом к CD37 или его антигенсвязывающим фрагментом) и определено общей формулой: C-L-A, где C = цитотоксин, L = линкер и A = клеточный связывающий агент, антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент. Иммуноконъюгаты также могут быть определены общей формулой в обратном порядке: A-L-C.

"Линкер" представляет собой любой химический фрагмент, способный связывать соединение, обычно лекарственное средство, такое как майтанзиноид, со связывающимся с клеткой агентом, таким как антитело к CD37 или его фрагмент, стабильным, ковалентным образом. Линкеры могут быть подвержены или быть по существу устойчивыми к расщеплению, индуцированному кислотой, светоиндуцированному расщеплению, расщеплению, вызванному пептидазой, расщеплению, вызванному эстеразой и расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых соединение или антитело остается активным. Подходящие линкеры хорошо известны в данной области техники и включают, например, дисульфидные группы, тиозфирные группы, кислотнеустойчивые группы, фотолabile группы, неустойчивые к пептидазе группы и неустойчивые к эстеразе группы. Линкеры также включают заряженные линкеры и их гидрофильные формы, как описано в настоящем описании и известно в данной области техники.

Термины "рак" и "раковый" относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток, или описывают такое состояние. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры "рака" или "туморогенных" заболеваний включают В-клеточные лимфомы, включая НХЛ, В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфому из клеток-предшественников и новообразования из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоцитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома (МКЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), включая ФЛ низкой степени, средней степени и высокой степени, кожная лимфома из клеток фолликулярного центра, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны (МАЛТ-типа, узлового типа и лимфома селезенки), волосатоклеточный лейкоз, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВЛ), лимфома Беркитта (БЛ), плазмцитомы, плазмклеточная миелома, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание и анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ). В некоторых вариантах реализации указанный рак представляет собой лейкоз или лимфому.

"Опухоль" и "новообразование" относятся к любому образованию, которое представляют собой результат избыточного роста или пролиферации клеток, либо доброкачественных (нераковых), либо злокачественных (раковых), включая предраковые поражения.

Термины "раковая клетка", "клетка опухоли" и грамматические эквиваленты относятся к общей по-

пуляции клеток, полученных из опухоли или предракового поражения, включая как нетуморогенные клетки, которые составляют основную массу популяции клеток опухоли, так и туморогенные стволовые клетки (раковые стволовые клетки). В контексте настоящего описания к термину "клетка опухоли" будет добавлен термин "нетуморогенная", когда он относится исключительно к тем клеткам опухоли, которые лишены способности к обновлению и дифференцировке, чтобы отличать эти клетки опухоли от раковых стволовых клеток.

Термин "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), включая, но не ограничиваясь ими, людей, приматов, не являющихся человеком, грызунов и т.п., которые должны быть реципиентами конкретного лечения. Как правило, термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо в настоящем описании в отношении человека.

"Химиотерапевтический агент" представляет собой химическое соединение, пригодное для применения для лечения рака, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие агенты, антиметаболиты, алкалоиды растений - "веретенные яды", цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, анти-тела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназы. Химиотерапевтические агенты включают соединения, применяемые в "нацеленной терапии" и традиционной химиотерапии. Введение "в комбинации с" одним или более дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (совместное) и последовательное введение в любом порядке.

Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому препарат будет введен. Такой состав может быть стерильным.

"Эффективное количество" антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или иммуноконъюгата, раскрытое в настоящем описании, представляет собой количество, достаточное для достижения конкретно заявленной цели. "Эффективное количество" может быть определено эмпирически и в обычном порядке применительно к заявленной цели.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или другого лекарственного средства, эффективного для "лечения" заболевания или расстройства у субъекта или млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может снижать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; подавлять (т.е. до некоторой степени замедлять и в определенном варианте реализации останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; подавлять (т.е. до некоторой степени замедлять и в определенном варианте реализации останавливать) метастазирование опухоли; до некоторой степени подавлять рост опухоли; до некоторой степени ослаблять один или более симптомов, связанных с раком; и/или приводить к положительному ответу, такому как повышенная выживаемость без прогрессирования (PFS), безрецидивная выживаемость (DFS) или общая выживаемость (OS), полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или в некоторых случаях стабильное заболевание (SD), снижение прогрессирования заболевания (PD), сокращение времени до прогрессирования (TTP) или любой их комбинации. См. определение "лечения" в настоящем описании. В зависимости от той степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или уничтожать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. В некоторых вариантах реализации выявление повышенных уровней CD37 позволяет вводить уменьшенные количества нацеленного на CD37 терапевтического средства для достижения того же терапевтического эффекта, что и при более высоких дозах. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но необязательно, поскольку профилактическую дозу используют у субъектов до начала заболевания или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Термин "положительно отвечать" в целом относится к обуславливанию благоприятного состояния у субъекта. В отношении лечения рака этот термин относится к оказанию терапевтического воздействия на субъекта. Положительные терапевтические эффекты при раке могут быть измерены несколькими способами (См. W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Например, подавление роста опухоли, экспрессия молекулярного маркера, экспрессия сывороточного маркера и методы молекулярной визуализации могут быть применены для оценки терапевтической эффективности противоракового терапевтического средства. В отношении подавления роста опухоли в соответствии со стандартами NCI T/C \leq 42% соответствует минимальному уровню противоопухолевой активности. T/C $<$ 10% считается высоким уровнем противоопухолевой активности, где T/C (%) = средний объем опухоли в случае лечения/средний объем опухоли в контроле \times 100. Положительный ответ может быть выражен, например, в повышенной выживаемости без прогрессирования (PFS), безрецидивной выживаемости (DFS) или общей выживаемости (OS), полном ответе (CR), частичном ответе (PR) или в некоторых случаях, стабильном заболевании (SD), снижении прогрессирования заболевания (PD), сокращении времени до прогрессирования (TTP) или любой их

комбинации.

PFS, DFS и OS могут быть измерены согласно стандартам, установленным Национальным институтом рака и Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США для утверждения новых лекарственных средств. См. Johnson et al., (2003), J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411.

"Выживаемость без прогрессирования" (PFS) относится к периоду времени от регистрации до прогрессирования заболевания или смерти. Для пациентов с НХЛ PFS может быть измерена с использованием стандартов, представленных в пересмотренных критериях оценки результатов лечения злокачественных лимфом Международного проекта по гармонизации (Cheson et al., J. Clin. Oncol. 25:579-86 (2007), включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Для пациентов с ХЛЛ PFS может быть измерена с использованием стандартов, представленных Международной рабочей группой по критериям ответа ХЛЛ Национального института рака (Hallek et al., Blood, 777:5446-56 (2008), включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Для пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинской лимфомой PFS может быть измерена с использованием стандартов классификации Лугано (Cheson et al., J. Clin. Oncol. 32:3059-68 (2014)). В целом выживаемость без прогрессирования относится к ситуации, когда пациент остается живым без усугубления течения рака. "Время до прогрессирования опухоли" (TTP) определяют как период времени от регистрации до прогрессирования заболевания. Для пациентов с НХЛ TTP может быть измерена с использованием стандартов, представленных в пересмотренных критериях оценки результатов лечения злокачественных лимфом Международного проекта по гармонизации (Cheson et al., J. Clin. Oncol. 25:579-86 (2007), включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Для пациентов с ХЛЛ TTP может быть измерена с использованием стандартов, представленных Международной рабочей группой по критериям ответа ХЛЛ Национального института рака (Hallek et al., Blood, 111:5446-56 (2008), включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Для пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинской лимфомой PFS может быть измерена с использованием стандартов классификации Лугано (Cheson et al., J. Clin. Oncol. 32:3059-68 (2014)).

"Полный ответ" или "полная ремиссия" или "CR" указывает на исчезновение всех признаков опухоли или рака в ответ на лечение. Это не всегда означает, что рак был излечен.

"Частичный ответ" или "PR" относится к уменьшению размера или объема одной или более опухолей или поражений или распространения рака в организме в ответ на лечение.

"Стабильное заболевание" относится к заболеванию без прогрессирования или рецидива. При стабильном заболевании не наблюдается достаточного уменьшения размера опухоли, чтобы соответствовать критериям частичного ответа или достаточного увеличения размера опухоли, чтобы соответствовать критериям прогрессирования заболевания.

"Прогрессирование заболевания" относится к появлению еще одного нового поражения или опухоли и/или однозначному прогрессированию существующих поражений, не являющихся мишенью. Прогрессирование заболевания также может относиться к росту опухоли более чем на 20% с момента начала лечения вследствие либо увеличения массы, либо распространения опухоли.

"Безрецидивная выживаемость" (DFS) относится к периоду времени в процессе и после лечения, в течение которого у пациента не проявляются признаки заболевания.

"Общая выживаемость" (OS) относится к периоду времени от регистрации пациента до смерти или даты последней явки. OS включает увеличение продолжительности жизни по сравнению с контрольными или не получавшими лечения людьми или пациентами. Общая выживаемость относится к ситуации, когда пациент остается живым в течение определенного периода времени, такого как год, пять лет и т.д., например, со времени постановки диагноза или лечения.

Такие термины как "проведение лечения" или "лечение" или "лечить" или "облегчение" или "облегчать" относятся к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, ослабляют симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже диагностировано или подозревается расстройство. В некоторых вариантах реализации субъекта успешно "излечивают" от рака в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, если пациент демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; подавление или отсутствие инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; подавление или отсутствие метастазирования опухоли; подавление или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или нескольких симптомов, связанных с конкретным раком; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни; уменьшение туморогенности, частоты туморогенных состояний или туморогенной способности опухоли; уменьшение числа или частоты встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли; дифференцировка клеток опухоли в нетуморогенное состояние; повышенная выживаемость без прогрессирования (PFS), безрецидивная выживаемость (DFS) или общая выживаемость (OS), полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), снижение прогрессирования заболевания (PD), сокращение времени до прогрессирования (TTP) или любую их комбинацию.

Профилактические или предотвращающие меры относятся к терапевтическим мерам, которые пре-

дотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в профилактических или предотвращающих мерах, включают тех, кто расположен к расстройству, и тех, у кого расстройство подлежит предотвращению.

В контексте настоящего описания термин "лицо, предоставляющее медицинские услуги" относится к отдельным лицам или учреждениям, которые непосредственно взаимодействуют с живыми субъектами, например, пациентами, являющимися людьми, и осуществляют воздействие. Неограничивающие примеры лиц, предоставляющих медицинские услуги, включают врачей, медсестер, лаборантов, терапевтов, фармацевтов, консультантов, практиков альтернативной медицины, медицинские учреждения, кабинеты врачей, больницы, отделения неотложной помощи, клиники, центры неотложной помощи, клиники/учреждения альтернативной медицины и любые другие организации, предоставляющие общее и/или специализированное лечение, наблюдение, поддержку, терапию, средство для лечения и/или рекомендации, касающиеся всех или любой части состояния здоровья пациента, включая, но не ограничиваясь ими, общие медицинские, специализированные медицинские, хирургические и/или любой другой вид лечения, наблюдения, поддержки, терапии, лечения и/или рекомендаций. В некоторых аспектах лицо, предоставляющее медицинские услуги, может осуществлять воздействие или инструктировать другое лицо, предоставляющее медицинские услуги, по осуществлению терапии для лечения рака. "Осуществление" терапии в контексте настоящего описания включает назначение терапии субъекту, а также доставку, применение или предоставление терапии субъекту. Лицо, предоставляющее медицинские услуги, может обеспечить выполнение или поручить другому лицу, предоставляющему медицинские услуги, или пациенту выполнить следующие действия: получить образец, обработать образец, предоставить образец, получить образец, передать образец, проанализировать или измерить образец, количественно оценить образец, предоставить результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, получить результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки образца, сравнить/оценить результаты, полученные после анализа/измерения/количественной оценки одного или более образцов, обеспечить сравнение/оценку одного или более образцов, получить сравнение/оценку одного или более образцов, назначить терапию или терапевтический агент (например, CD37-связывающий агент), начать применение терапии, прекратить применение терапии, продолжить применение терапии, временно прервать применение терапии, увеличить количество вводимого терапевтического агента, уменьшить количество вводимого терапевтического агента, продолжить введение количества вводимого терапевтического агента, повысить частоту введения терапевтического агента, снизить частоту введения терапевтического агента, поддерживать ту же частоту введения терапевтического агента, заменить терапию или терапевтический агент по меньшей мере другой терапией или терапевтическим агентом, объединить терапию или терапевтический агент по меньшей мере с другой терапией или дополнительным терапевтическим агентом. Эти действия могут быть выполнены лицом, предоставляющим медицинские услуги, автоматически с использованием компьютеризированного способа (например, через веб-службу или автономную компьютерную систему).

Термины "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", взаимозаменяемо используемые в настоящем описании, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Модификация, если таковая присутствует, может быть введена в структуру нуклеотида до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с меченым компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы" (caps), замещение одного или более природных нуклеотидов аналогами, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), содержащие концевые фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), с интеркаляторами (например, акридин, псорален и т.д.), содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.д.), содержащие алкилирующие агенты, с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида (полинуклеотидов). Дополнительно любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, может быть замещена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными группами или активирована для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами или может быть конъюгирована с твердыми носителями. 5'- и 3'-конец ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или фрагментами органических кэпирующих групп, содержащими от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть дериватизированы до стандартных защитных групп. Полинуклеотиды также могут содержать аналоги сахаров - производных рибозы или дезоксирибозы, которые обычно известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические ана-

логи сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и аналоги нуклеозидов, лишенные азотистых оснований, такие как метилрибозид. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связующими группами. Эти альтернативные связующие группы включают, но не ограничиваются ими, варианты реализации, где фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аральдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть одинаковыми. Предшествующее описание относится ко всем полинуклеотидам, упоминаемым в настоящем описании, включая РНК и ДНК.

Термин "вектор" означает конструкцию, которая способна доставлять и экспрессировать один/одну или более требуемых генов или последовательностей в клетку хозяина. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы, векторы экспрессии депротенизированной ДНК или РНК, плазмидные, космидные или фаговые векторы, векторы экспрессии ДНК или РНК, связанные с катионными конденсирующими агентами, векторы экспрессии ДНК или РНК в липосомальных лекарственных формах и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" взаимозаменяемо используют в настоящем описании для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и его цепь может включать неаминокислоты. Термины также охватывают полимер аминокислот, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций или модификаций, таких как конъюгация с компонентом метки. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, не встречающиеся в природе аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды согласно настоящему изобретению основаны на антителах, в некоторых вариантах реализации полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей. В некоторых вариантах реализации полипептид, пептид или белок является не встречающимся в природе. В некоторых вариантах реализации полипептид, пептид или белок получают очисткой из природных компонентов. В некоторых вариантах реализации полипептид, пептид или белок получают рекомбинантным способом.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или содержат определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании (и введении пропусков, если необходимо) для максимального соответствия без учета каких-либо консервативных аминокислотных замен в контексте идентичности последовательности. Процент идентичности может быть определен с использованием программного обеспечения или алгоритмов для сравнения последовательностей или посредством визуального контроля. В данной области техники известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые могут быть использованы для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Одним из таких неограничивающих примеров алгоритма выравнивания последовательностей является алгоритм, описанный в источнике Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268, модифицированный в работе Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877 и включенный в программы NBLAST и XBLAST (Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). В некоторых вариантах реализации может быть применена программа Gapped BLAST согласно описанию в источнике Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Другими общедоступными программами, которые могут быть применены для выравнивания последовательностей, являются BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или Megalign (DNASTAR). В некоторых вариантах реализации процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей определяют с использованием программы GAP, входящей в программное обеспечение GCG (например, с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и значения штрафа за пропуск, равного 40, 50, 60, 70 или 90 и значения штрафа за продление пропуска, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В качестве альтернативы в некоторых вариантах реализации программа GAP в составе пакета программ GCG, включающего алгоритм Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), может быть использована для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей (например, с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250 и значения штрафа за пропуск, равного 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и значения штрафа за продление пропуска, равного 1, 2, 3, 4, 5). В качестве альтернативы в некоторых вариантах реализации процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Миллера-Маерса (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Например, процент идентичности может быть определен с использованием программы ALIGN (версия 2.0) и с использованием PAM120 с таблицей остатков, значением штрафа за продление пропуска, равным 12 и значением штрафа за пропуск, равным 4. Подходящие

параметры для максимального выравнивания посредством конкретного программного обеспечения для выравнивания могут быть определены специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах реализации используют параметры по умолчанию программного обеспечения для выравнивания. В некоторых вариантах реализации процент идентичности "X" первой аминокислотной последовательности по отношению ко второй аминокислотной последовательности рассчитывают как $100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой число аминокислотных остатков, отмеченных как идентичные соответствия при выравнивании первой и второй последовательностей (в соответствии с визуальным контролем или конкретной программой выравнивания последовательностей), а Z - общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности превышает длину второй последовательности, процент идентичности первой последовательности по отношению ко второй последовательности будет больше, чем процент идентичности второй последовательности по отношению к первой последовательности. В качестве неограничивающего примера, наличие определенного процента идентичности последовательности конкретного полинуклеотида (например, по меньшей мере на 80% идентичен, по меньшей мере на 85% идентичен, по меньшей мере на 90% идентичен, а в некоторых вариантах реализации по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен) по отношению к эталонной последовательности в определенных вариантах реализации может быть определено с использованием программы Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit использует алгоритм локальной гомологии согласно Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489 (1981), для поиска лучшего сегмента гомологии между двумя последовательностями. При использовании программы Bestfit или любой другой программы для выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной эталонной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры устанавливают таким образом, что процент идентичности вычисляется по всей длине эталонной нуклеотидной последовательности и разрешены пропуски в гомологии длиной до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности.

В некоторых вариантах реализации две нуклеиновые кислоты или два полипептида согласно настоящему изобретению по существу идентичны, то есть имеют идентичность нуклеотидов или аминокислотных остатков по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, а в некоторых вариантах реализации по меньшей мере 9, 96, 97, 98, 99% при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, определенную с использованием алгоритма сравнения последовательностей или визуального контроля. В некоторых вариантах реализации идентичность имеет место в области последовательностей, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 40-60 остатков или любое целое значение между ними или в области с длиной, превышающей 60-80 остатков, по меньшей мере приблизительно 90-100 остатков, или последовательности по существу идентичны по всей длине сравниваемых последовательностей, таких как, например, кодирующая область нуклеотидной последовательности.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой аминокислотную замену, при которой один аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семь аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Например, замена фенилаланина на тирозин является консервативной заменой. В некоторых вариантах реализации консервативные замены в последовательностях полипептидов и антител согласно настоящему изобретению не отменяют связывания полипептида или антитела, содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном (антигенами), то есть с CD37, с которым связывается полипептид или антитело. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не препятствуют связыванию антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:412-417 (1997)).

В контексте настоящего описания и формулы изобретения неопределенные и определенные формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекстом явным образом не продиктовано иное.

Понятно, что во всех случаях, когда варианты реализации описаны в настоящем описании с использованием формулировки "включающий/содержащий", также предложены иные аналогичные варианты реализации, описанные в терминах "состоящий из" и/или "по существу состоящий из".

Термин "и/или" в настоящем описании, используемый в такой фразе, как "А и/или В", предназначен для включения "А и В", "А или В", "А" и "В". Аналогично термин "и/или", используемый в такой фразе как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих вариантов реализации: А, В и С; А,

В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

II. Связывающиеся с CD37 агенты.

В настоящем описании предложены агенты, которые специфично связываются с CD37 человека. Эти агенты упомянуты в настоящем описании как "связывающиеся с CD37 агенты". В некоторых вариантах реализации связывающиеся с CD37 агенты представляют собой антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноконъюгаты или полипептиды. Полноразмерные аминокислотные последовательности для CD37 человека известны в данной области техники и также приведены в настоящем описании, как представлено SEQ ID NO: 1, соответственно. CD37 человека:

```
MSAQESCLSLIKYFLVFNLFVFLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSVFVGLAFVPLQIWSKVLAI
SGIFTMGIALLCVGVGALKELRCLLGLYFGMLLFFATQITLGLISTQRAQLERSLRDVE
KTIQKYGTNPEETAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRNGSEAHRVPCSCY
NLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHYREGCAQGLQKWLHNNL
ISIVGICLVGLLELGFMTLSIFLCRNLDHVYNRLARYR (SEQ ID NO:1)
```

Последовательность нуклеиновой кислоты CD37 человека:

```
atgtcagcccaggagagctgcctcagcctcatcaagtactctctcttctttcaacctctctctctcctcctggcagcctgatctctctctc
gcatctggatcctcattgacaagaccagcttctgtcctttgtggcttggccttgcctctgcagatctggtccaaagtctggccatctca
ggaatctcaccatgggcacgcctcctgggtgtgtggggccctcaaggagctccgctgcctcctggcctgtatctttgggatgctgctg
ctctctgttccacacagatcaccttgggaatctctcactcagcgggcccagctggagcgaagcttgcgggacgtcgtagagaaaa
ccatccaaaagtacggcaccaaccccaggagaccggccgaggagagctgggactatgtcagttccagctgcgctcctcggctg
gcaactcccgcaggactgttccaagtcctcatctgagaggtaacgggtcggaggcgcaccgctgccctgctcctgctacaactgtcg
gcgaccaacgactccacaatcctagataaggtgatcttgcctcagcagcagcttggacacctggcgcgtccagacacagtgagac
atctgcgctgcctgcagagagccacatctaccggctgcgcagggcctccagaagtggctgcacaacaaccttattccatag
tggcatftgctgggctggcctactcagctcgggtcatgacgctcctgatattctgtgcagaacctggaccgcttacaaccggc
tcgctcgataccgt (SEQ ID NO:2)
```

Таким образом, в некоторых вариантах реализации связывающиеся с CD37 агенты могут специфично связываться с эпитопом, представленным SEQ ID NO: 1, или с эпитопом полипептида, кодируемого SEQ ID NO: 2.

Связывающиеся с CD37 агенты также включают связывающиеся с CD37 агенты с последовательностями антитела 1B11-2, приведенными ниже.

muCD37-1B11-2 VH-CDR1

GYFMN (SEQ ID NO:3)

muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (Кабат)

RINPYNGDTFYNQKFKГ (SEQ ID NO:4)

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

RINPYNGDTF (SEQ ID NO:34)

muCD37-1B11-2 VH -CDR3

RGIVASSRFFDV (SEQ ID NO:5)

muCD37-1B11-2 VL-CDR1

KASQGVSNVDV (SEQ ID NO:6)

muCD37-1B11-2 VL-CDR2

YASNRYT (SEQ ID NO:7)

muCD37-1B11-2 VL-CDR3

CHQDYTSPT (SEQ ID NO:8)

muCD37-1B11-2 варибельная область тяжелой цепи (VH)

EVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTGYFMNWVQSHGKILEWIGRINPYNGDTFY
 NQKFKTKATLTVDKSSTTAHMEELSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVGAGTSVIVS
 S (SEQ ID NO:9)

muCD37-1B11-2 варибельная область легкой цепи (VL)

SIVMTQTPKFLVVSAGDRVTITCKASQGVSNVDVDWYQQKPGQSPKLLIYASNRYTGVP
 DRFTGSGYGTDFTFISISTVQAEDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:10)

muCD37-1B11-2 полноразмерная тяжелая цепь (HC)

EVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTGYFMNWVQSHGKILEWIGRINPYNGDTFY
 NQKFKTKATLTVDKSSTTAHMEELSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVGAGTSVIVS
 SAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES
 DLYTLSSSVTVPSRPRSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP
 PKPKDVLITLTPKVTCCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSE
 LPMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTSKTKGRPKAPQVYTIPTPKQMAKDKVSL
 TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTF
 TCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:11)

muCD37-1B11-2 полноразмерная легкая цепь

SIVMTQTPKFLVVSAGDRVTITCKASQGVSNVDVDWYQQKPGQSPKLLIYASNRYTGVP
 DRFTGSGYGTDFTFISISTVQAEDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPS
 SEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLT
 LTKDEYERHNSYTCETHKSTSPVKSFNREK (SEQ ID NO:12)

Связывающиеся с CD37 агенты включают связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат шесть последовательностей CDR антитела 1B11-2, представленных SEQ ID NO: 3-8. Связывающиеся с CD37 молекулы могут представлять собой связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат участки CDR антитела 1B11-2 (т.е. SEQ ID NO: 3-8), содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) консервативных аминокислотных замен на CDR. Связывающиеся с CD37 молекулы могут представлять собой связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат участки CDR антитела 1B11-2 (т.е. SEQ ID NO: 3-8), содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) консервативных аминокислотных замен. Связывающиеся с CD37 молекулы могут представлять собой связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат (i) участки CDR, представленные SEQ ID NO: 3, 4, 6 и 7, содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) консервативных аминокислотных замен на CDR и (ii) участки CDR, представленные SEQ ID NO: 5 и 8. Связывающиеся с CD37 молекулы могут представлять собой связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат (i) участки CDR, представленные SEQ ID NO: 3, 4, 6 и 7, содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) консервативных аминокислотных замен и (ii) участки CDR, представленные SEQ ID NO: 5 и 8. Связывающиеся с CD37 молекулы могут представлять собой связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат (i) участки CDR, представленные SEQ ID NO: 3, 4 и 6-8, содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) консервативных аминокислотных замен на CDR и (ii) участок CDR, представленную SEQ ID NO: 5. Связывающиеся с CD37 молекулы могут представлять собой связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые содержат (i) участки CDR, представленные SEQ ID NO: 3, 4 и 6-8, содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) консервативных аминокислотных замен и (ii) участок CDR, представленную SEQ ID NO: 5.

Полипептиды, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать варибельную область легкой цепи, варибельную область тяжелой цепи или варибельные области и легкой, и тяжелой цепей антитела 1B11-2. Также предложены полипептиды, которые содержат (а) полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9 и/или (б) полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой антитело и/или полипептид, который специфично связывается с CD37. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой мышинное, химерное или

ный домен легкой цепи, содержащий последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой антитело и/или полипептид, которое/который специфично связывается с CD37. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой мышиное, химерное или гуманизованное антитело, которое специфично связывается с CD37. В некоторых вариантах реализации полипептид, имеющий определенный процент идентичности последовательности SEQ ID NO: 9 и/или 10, отличается от SEQ ID NO: 9 и/или 10 только наличием консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации полипептид, имеющий определенный процент идентичности последовательности SEQ ID NO: 9 и/или 10, отличается от SEQ ID NO: 9 и/или 10 только аминокислотами вне участков CDR. В некоторых вариантах реализации полипептид, имеющий определенный процент идентичности последовательности SEQ ID NO: 9 и/или 10, отличается от SEQ ID NO: 9 и/или 10 только консервативными аминокислотными заменами вне участков CDR.

В некоторых вариантах реализации полипептид, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательность, представленную SEQ ID NO: 10.

Полипептиды могут содержать одну из отдельных легких цепей или тяжелых цепей, описанных в настоящем описании. Антитела и полипептиды также могут содержать и легкую цепь, и тяжелую цепь. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела 1B11-2 представлены SEQ ID NO: 11 и 12.

Также предложены полипептиды, которые содержат (а) полипептид, имеющий по меньшей мере приблизительно 90% идентичности последовательности SEQ ID NO: 11, и/или (б) полипептид, имеющий по меньшей мере приблизительно 90% идентичности последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит полипептид, имеющий по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 11 или 12. Таким образом, в некоторых вариантах реализации полипептид содержит (а) полипептид, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% идентичности последовательности SEQ ID NO: 11, и/или (б) полипептид, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% идентичности последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит (а) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11; и/или (б) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой антитело и/или полипептид, который специфично связывается с CD37. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой мышиное, химерное или гуманизованное антитело, которое специфично связывается с CD37. В некоторых вариантах реализации полипептид, имеющий определенный процент идентичности последовательности SEQ ID NO: 11 и/или 12, отличается от SEQ ID NO: 11 и/или 12 только наличием консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации полипептид, имеющий определенный процент идентичности последовательности SEQ ID NO: 11 и/или 12, отличается от SEQ ID NO: 11 и/или 12 только аминокислотами вне участков CDR. В некоторых вариантах реализации полипептид, имеющий определенный процент идентичности последовательности SEQ ID NO: 11 и/или 12, отличается от SEQ ID NO: 11 и/или 12 только консервативными аминокислотными заменами вне участков CDR.

В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) конкурентно ингибирует связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 10, с CD37. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) конкурентно ингибирует связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 10, с CD37, и связывается с эпитопом, который перекрывается с эпитопом, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с и/или не связывается с антигенными последовательностями CD37, приведенными ниже в настоящем описании.

Антигенные последовательности CD37:

hCD37-LEL (подчеркнуты АК 107-242 CD37)

TMELLISTQRAQLERSLRDVEKTIQKYGTNPEETA AEESWDYVQFQLRCCGWHYPQD
WFQVLILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVP
AESHIYREGCAOGLQKWLHNNLSFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO:15)

hCD37-ECD-Fc (подчеркнуты АК 107-235 hCD37)

GPEFLISTQRAQLERSLRDVEKTIQKYGTNPEETA AEESWDYVQFQLRCCGWHYPQD
WFQVLILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVP
AESHIYREGCAOGLQGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLSPIVT
 CVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE
 FKCKVNNKDLPAPIERTISKPKTSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY
 VEWVNNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNN
 HTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:16)

hCD37-Fc-LAGA (подчеркнуты АК 107-235 hCD37)

GPEFLISTQRAQLERSLRDVEKTIQKYGTNPEETA AEESWDYVQFQLRCCGWHYPQD
WFQVLILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVP
AESHIYREGCAOGLQGS DKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKTQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKTFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPG (SEQ ID NO:17)

hCD37-ECD-S2-Fc (дважды подчеркнуты АК 107-109 hCD37 и подчеркнуты АК 138-235)

GPEFLISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATN
DSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAOGLQGSEPRGPTIKPCPPC
KCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQT
 QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKTSVRAPQ
 VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWVNNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYF
 MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:18)

hCD37 (АК 107-235)

LISTQRAQLERSLRDVEKTIQKYGTNPEETA AEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQV
LILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHI
YREGCAOGLQ (SEQ ID NO:19)

hCD37 (АК 107-242)

LISTQRAQLERSLRDVEKTIQKYGTNPEETA AEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQV
LILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHI
YREGCAOGLQKWLHNNL (SEQ ID NO:20)

hCD37 (АК 107-109 и 138-235)

LISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTIL
DKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAOGLQ (SEQ ID NO:21)

В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с аминокислотами 107-242 CD37 (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с аминокислотами 107-235 CD37 (SEQ ID NO: 19).

В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с аминокислотами 107-242 CD37 (SEQ ID NO: 20), но не связывается с аминокислотами 138-235 CD37. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с аминокислотами 107-235 CD37 (SEQ ID NO: 19), но не связывается с аминокислотами 138-235 CD37.

В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 15, но не связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 16, но не связывается с полипептидом, представленным

SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 17, но не связывается с полипептидом, представленным SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах реализации связывающийся с CD37 агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с эпитопом, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту из 110-137 SEQ ID NO: 1. Аминокислоты 110-137 представляют собой первый сегмент ("S1") большого внеклеточного домена CD37.

Аффинность или авидность антитела к антигену может быть определена экспериментально с применением любого подходящего способа, хорошо известного в данной области техники, например, проточной цитометрии, иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммуноанализа (РИА) или кинетики (например, анализ BIACORE™). Могут быть легко использованы форматы анализа непосредственного связывания, а также анализа конкурентного связывания. (См., например, Berzofsky, et al., Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", In Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992) и способы, описанные в настоящем документе. Измеренная аффинность взаимодействия антитело-антиген может варьировать при измерении при различных условиях (например, концентрация соли, pH, температура). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания антигена (например, K_D или K_d , K_{on} , K_{off}) выполняют со стандартизованными растворами антител и антигена и стандартизованным буфером, такими как известные в данной области техники и таким как буфер, описанный в настоящем описании.

В одном аспекте анализ связывания может быть выполнен методом проточной цитометрии на клетках, экспрессирующих антиген CD37 на поверхности. Например, CD37-положительные клетки, такие как клетки 300-19, могут быть инкубированы с различными концентрациями антител к CD37 с использованием 1×10^5 клеток на образец в 100 мкл буфера для FACS (среда RPMI-1640 с добавлением 2% нормальной сыворотки козла).

Затем клетки могут быть осаждены, промыты и инкубированы в течение 1 ч со 100 мкл конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитела козла к IgG мыши или антитела козла к IgG человека (такого как, например, получаемое от Jackson Laboratory, 6 мкг/мл в буфере для FACS). Затем клетки снова осаждают, промывают буфером для FACS и ресуспендируют в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 1% формальдегида. Образцы могут быть получены, например, с использованием проточного цитометра FACS Calibur с многолуночным пробоотборником HTS и проанализированы с использованием CellQuest Pro (все инструменты BD Biosciences, Сан-Диего, США). Для каждого образца средняя интенсивность флуоресценции FL1 (MFI) может быть экспортирована и нанесена на график зависимости от концентрации антитела в полулогарифмическом масштабе для получения кривой связывания. Для кривых связывания строят сигмоидальную кривую зависимости от дозы, а значения EC_{50} вычисляют с использованием таких программ, как GraphPad Prism v4 с параметрами по умолчанию (программное обеспечение GraphPad, Сан-Диего, Калифорния). Значения EC_{50} могут быть использованы в качестве меры для кажущейся константы диссоциации " K_d " или " K_D " для каждого антитела.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомных методов, таких как методы, описанные Kohler и Milstein (1975), Nature, 256:495. При использовании гибридомного метода мышь, хомяка или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют, чтобы вызвать выработку лимфоцитами антител, которые будут специфично связываться с иммунизирующим антигеном. Лимфоциты также могут быть иммунизированы *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют и сливают с подходящей линией клеток миеломы с применением, например, полиэтиленгликоля, с образованием клеток гибридомы, которые затем могут быть отделены от неслитых лимфоцитов и клеток миеломы. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, специфично направленные против выбранного антигена, как определяют, например, путем иммунопреципитации, иммуноблоттинга или анализа связывания *in vitro* (например, радиоиммуноанализа (РИА); иммуноферментного анализа (ELISA)), затем могут быть размножены в либо в культуре *in vitro* с использованием стандартных методов (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986), либо *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного. Затем моноклональные антитела могут быть очищены из культуральной среды или асцитной жидкости. В качестве альтернативы моноклональные антитела также могут быть получены способами с использованием рекомбинантной ДНК, как описано в патенте США 4816567. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяют из зрелых В-клеток или клеток гибридомы, например, с помощью RT-PCR с использованием олигонуклеотидных праймеров, которые специфично амплифицируют гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антитела, а их последовательность определяют с использованием общепринятых методов. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи, затем клонируют в подходящие векторы экспрессии, которые трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в иных случаях не продуцируют иммуноглобулиновый белок, и моноклональные антитела вырабатываются клетками-хозяевами. Также рекомбинантные моноклональные антитела или их фрагменты желаемых видов могут быть выделены из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих участки CDR

желаемых видов, как описано (McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628 и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597). Полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий моноклональное антитело, может быть дополнительно модифицирован различными способами с использованием технологии рекомбинантной ДНК для получения альтернативных антител. В некоторых вариантах реализации константные домены тяжелых и легких цепей, например, моноклонального антитела мышцы, могут быть заменены 1) на те же области, например, антитела человека для получения химерного антитела или 2) полипептид неиммуноглобулиновой природы для получения слитого антитела. В некоторых вариантах реализации константные области усекают или удаляют для получения желаемого фрагмента моноклонального антитела. Для оптимизации специфичности, аффинности и т.д. моноклонального антитела могут быть применены сайт-направленный или высокоплотный мутагенез вариабельной области.

В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело к CD37 человека представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации указанное гуманизированное антитело представляет собой антитело с измененной поверхностью.

Антитела человека могут быть получены непосредственно с использованием различных методов, известных в данной области техники. Могут быть получены иммортализованные В-лимфоциты человека, которые продуцируют антитело, направленное против целевого антигена, иммунизированные *in vitro* или выделенные от иммунизированного лица, (см., например, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voemer et al., 1991, J. Immunol., 147(1):86-95 и патент США 5750373). Также антитело человека может быть выбрано из фаговой библиотеки, в случае если указанная фаговая библиотека экспрессирует антитела человека, как описано, например, в источниках Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Методики получения и использования фаговых библиотек антител также описаны в патентах США № 5969108, 6172197, 5885793, 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 и 7264963 и источнике Rothe et al., 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018 (каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте). Стратегии созревания аффинности и стратегии перестановки цепей (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783, включен посредством ссылки во всей своей полноте) известны в данной области техники и могут быть применены для получения высокоаффинных антител человека.

Гуманизированные антитела также могут быть получены в трансгенных мышцах, несущих локусы иммуноглобулина человека, способных после иммунизации продуцировать полный спектр антител человека в отсутствие выработки эндогенного иммуноглобулина. Этот подход описан в патентах США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 5661016.

В некоторых вариантах реализации предложен фрагмент антитела для, например, повышения проникновения в опухоль. Известны различные способы для получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получают путем протеолитического расщепления интактных антител (например, Morigoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81). В некоторых вариантах реализации фрагменты антител получают рекомбинантным способом. Fab, Fv и scFv фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться *E. coli* или другими клетками-хозяевами, обеспечивая таким образом возможность получения больших количеств этих фрагментов. Такие фрагменты антител также могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Фрагмент антитела также может представлять собой линейные антитела, как описано, например, в патенте США № 5641870, и может быть моноспецифическим или биспецифическим. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны специалисту в данной области техники.

В соответствии с настоящим изобретением, способы могут быть адаптированы для получения одноцепочечных антител, специфичных к CD37 (см. патент США № 4946778). Помимо этого, способы могут быть адаптированы для построения библиотек экспрессии Fab (Huse, et al., Science, 246:1275-1281 (1989)) для обеспечения быстрой и эффективной идентификации моноклональных фрагментов Fab с желаемой специфичностью к CD37 или их производных, фрагментов, аналогов или гомологов. Фрагменты антител могут быть получены способами в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими: (a) фрагмент F(ab')₂, полученный расщеплением молекулы антитела пепсином; (b) фрагмент Fab, полученный путем восстановления дисульфидных мостиков фрагмента F(ab')₂; (c) фрагмент Fab, полученный обработкой молекулы антитела папаином и восстанавливающим агентом, и (d) фрагменты Fv.

Для целей настоящего описания следует понимать, что модифицированные антитела могут содержать вариабельную область любого типа, которая обеспечивает связывание антитела с полипептидами CD37 человека. В этом отношении вариабельная область может содержать область любого типа млекопитающих или быть получена из любого типа млекопитающих. Таким образом, вариабельная область модифицированных антител может иметь происхождение от, например, человека, мыши, приматов, не являющихся человеком (например, яванских макака (*symptomolgus monkeys*), макака и т.д.), или волков. В некоторых вариантах реализации как вариабельная, так и константная области модифицированных иммуноглобулинов являются человеческими. В других вариантах реализации вариабельные области совместимых антител (обычно полученные из источника, отличного от человека) могут быть сконструиро-

ваны или специально адаптированы для улучшения связывающих свойств молекулы. В связи с этим вариабельные области, пригодные для применения в настоящем изобретении, могут быть гуманизированы или иным образом изменены путем включения других (imported) аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах реализации вариабельные области модифицированных антител могут быть отличными от человеческих (например, мышинными), а константные области модифицированных антител могут быть человеческими.

В некоторых вариантах реализации вариабельные домены как в тяжелых, так и в легких цепях изменены путем по меньшей мере частичной замены одного или более участков CDR и, если необходимо, частичной замены каркасной области и изменения последовательности. Хотя участки CDR могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предполагают, что участки CDR будут получены из антитела другого класса и, возможно, из антитела других видов. Не всегда необходимо заменять все участки CDR на полные участки CDR из вариабельной области донора, чтобы перенести антигенсвязывающую способность одного вариабельного домена в другой. Скорее, в некоторых случаях необходимо перенести только те остатки, которые необходимы для поддержания активности сайта связывания антигена.

Несмотря на изменения в вариабельной области, специалистам в данной области техники будет понятно, что модифицированные антитела согласно настоящему изобретению будут содержать антитела (например, полноразмерные антитела или их иммунореактивные фрагменты), в которых по меньшей мере часть одного или более доменов константной области была удалена или иным образом изменена, чтобы обеспечить желаемые биохимические характеристики. В некоторых вариантах реализации константная область модифицированных антител будет содержать константную область человека. Модификации константной области могут включать вставки, делеции или замены одной или более аминокислот в одном или более доменах. Таким образом, модифицированные антитела, раскрытые в настоящем описании, могут содержать изменения или модификации в одном или более из трех константных доменов тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) и/или константном домене легкой цепи (CL). В некоторых вариантах реализации предполагаются модифицированные константные области, где один или более доменов частично или полностью удалены. В некоторых вариантах реализации модифицированные антитела будут содержать конструкции с удаленным доменом или варианты, где весь домен CH2 был удален (конструкции ΔCH2). В некоторых вариантах реализации отсутствующий домен константной области будет заменен коротким аминокислотным спейсером (например, 10 остатков) который обеспечивает некоторую молекулярную гибкость, обычно обеспечиваемую отсутствующей константной областью. В некоторых вариантах реализации модификации константной области могут быть применены для удаления дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, что обеспечивает улучшенное позиционирование вследствие повышения специфичности к антигену или гибкости антитела. Модификации константной области могут быть легко осуществлены с использованием общеизвестных биохимических способов или способов молекулярной инженерии в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

Следует отметить, что в некоторых вариантах реализации модифицированные антитела могут быть сконструированы для слияния домена CH3 непосредственно с шарнирной областью соответствующих модифицированных антител. В других конструкциях может быть желательно обеспечить наличие пептидного спейсера между шарнирной областью и модифицированными доменами CH2 и/или CH3. Например, могут быть экспрессированы совместимые конструкции, где указанный домен CH2 был удален, а оставшийся домен CH3 (модифицированный или немодифицированный) присоединен к шарнирной области посредством спейсера из 5-20 аминокислот. Такой спейсер может быть добавлен, например, чтобы гарантировать, что регуляторные элементы константного домена остаются свободными и доступными или что шарнирная область остается гибкой.

Настоящее описание дополнительно охватывает варианты и эквиваленты, которые по существу гомологичны мышинным, химерным, гуманизированным и человеческим антителам или их фрагментам, предложенным в настоящем описании. Они могут включать, например, мутации - консервативные замены, т.е. замену одной или более аминокислот подобными аминокислотами. Например, консервативная замена относится к замене одной аминокислоты другой в пределах того же общего класса, такой как, например, одной кислой аминокислоты другой кислой аминокислотой, одной основной аминокислоты другой основной аминокислотой или одной нейтральной аминокислоты другой нейтральной аминокислотой. В данной области техники хорошо известно, что подразумевается под консервативной аминокислотной заменой.

Полипептиды согласно настоящему описанию могут представлять собой рекомбинантные полипептиды, природные полипептиды или синтетические полипептиды, содержащие антитело к CD37 человека или его фрагмент. В данной области техники будет понятно, что некоторые аминокислотные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть изменены без значительного влияния на структуру или функцию белка. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно включает вариации полипептидов, которые проявляют существенную активность или которые содержат области антитела к белку CD37 или его фрагмента. Такие мутанты включают делеции, вставки, инверсии, повторы и замены типов.

Выделенные полипептиды, описанные в настоящем описании, могут быть получены любым подходящим способом, известным в данной области техники. Такие способы варьируют от прямых способов синтеза белка до конструирования последовательности ДНК, кодирующей выделенные полипептидные последовательности, и экспрессии этих последовательностей в подходящем трансформированном хозяине. В некоторых вариантах реализации последовательность ДНК сконструирована с использованием рекомбинантной технологии путем выделения или синтеза последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес белок дикого типа. Указанная последовательность может быть необязательно, подвергнута мутагенезу с помощью сайт-направленного мутагенеза для получения ее функциональных аналогов. См., например, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81:5662-5066 (1984) и патент США № 4588585.

В некоторых вариантах реализации последовательность ДНК, кодирующая представляющий интерес полипептид, может быть сконструирована путем химического синтеза с использованием олигонуклеотидного синтезатора. Такие олигонуклеотиды могут быть сконструированы на основе аминокислотной последовательности желаемого полипептида и выбора тех кодонов, которые предпочтительны для клетки-хозяина, в которой будет продуцироваться представляющий интерес рекомбинантный полипептид.

Для синтеза выделенной полинуклеотидной последовательности, кодирующей выделенный представляющий интерес полипептид, могут быть применены стандартные способы. Например, полная аминокислотная последовательность может быть использована для конструирования гена с последовательностью, восстановленной по полипептиду. Дополнительно может быть синтезирован олигомер ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретный выделенный полипептид. Например, несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих части желаемого полипептида, могут быть синтезированы и затем лигированы. Отдельные олигонуклеотиды обычно содержат выступающие 5'- или 3'-концы для комплементарной сборки.

После сборки (путем синтеза, сайт-направленного мутагенеза или другим способом) полинуклеотидные последовательности, кодирующие конкретный выделенный представляющий интерес полипептид, будут встроены в вектор экспрессии и функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии, подходящей для экспрессии белка в желаемом хозяине. Правильная сборка может быть подтверждена секвенированием нуклеиновой кислоты, рестрикционным картированием и экспрессией биологически активного полипептида в подходящем хозяине. Как хорошо известно в данной области техники, для получения высоких уровней экспрессии трансфицированного гена в хозяине ген должен быть функционально связан с последовательностями транскрипционного и трансляционного контроля экспрессии, которые являются функционально активными в выбранном хозяине экспрессии.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантные векторы экспрессии используют для амплификации и экспрессии ДНК, кодирующей антитела к CD37 человека или их фрагменты. Рекомбинантные векторы экспрессии представляют собой реплицируемые ДНК-конструкции, которые содержат синтетические или полученные из кДНК фрагменты ДНК, кодирующие полипептидную цепь антитела к CD37 или его фрагмента, функционально связанные с подходящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, полученными из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Единица транскрипции обычно содержит совокупность (1) генетического элемента или элементов, имеющих регуляторное значение в экспрессии генов, например, транскрипционных промоторов или энхансеров, (2) структурную или кодирующую последовательность, которая транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (3) подходящие последовательности инициации и терминации транскрипции и трансляции, как подробно описано ниже. Такие регуляторные элементы могут включать операторную последовательность для контроля транскрипции. Дополнительно могут быть введены способность к репликации в хозяине, обычно обеспечиваемая точкой начала репликации, и ген отбора для облегчения распознавания трансформантов. Области ДНК являются функционально связанными, когда они функционально соотносятся друг с другом. Например, ДНК для сигнального пептида (секреторная лидерная последовательность) функционально связана с ДНК для полипептида, если она экспрессируется в качестве предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он контролирует транскрипцию последовательности, или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы допускать трансляцию. Структурные элементы, предназначенные для использования в дрожжевых системах экспрессии, содержат лидерную последовательность, обеспечивающую внеклеточную секрецию транслированного белка клеткой-хозяином. В качестве альтернативы, когда рекомбинантный белок экспрессируется без лидерной или транспортной последовательности, он может содержать N-концевой остаток метионина. Этот остаток впоследствии может быть необязательно отщеплен от экспрессированного рекомбинантного белка с получением конечного продукта.

Выбор последовательности контроля экспрессии и вектора экспрессии будет зависеть от выбора хозяина. Может быть использован широкий спектр комбинаций хозяина/вектора экспрессии. Пригодные для применения векторы экспрессии для эукариотических хозяев включают, например, векторы, содержащие последовательности контроля экспрессии из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота,

аденовируса и цитомегаловируса. Пригодные для применения векторы экспрессии для бактериальных хозяев включают известные бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из *Escherichia coli*, включая pCR 1, pBR322, pMB9 и их производные, плазмиды более широкого диапазона хозяев, таких как M13 и нитевидные фаги, содержащие одноцепочечную ДНК. Подходящие клетки-хозяева для экспрессии связывающегося с CD37 полипептида или антитела (или белка CD37 для применения в качестве антигена) включают клетки прокариот, дрожжей, насекомых или высшие эукариотические клетки под контролем подходящих промоторов. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или палочковидные бактерии. Высшие эукариотические клетки включают устойчивые линии клеток млекопитающих, как описано ниже. Также могут быть использованы бесклеточные системы трансляции. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в источнике Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985), соответствующее описание из которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительная информация о способах получения белка, включая получение антитела, приведена, например, в патентной публикации США № 2008/0187954, патентах США № 6413746 и 6660501 и международной патентной публикации № WO 04009823, и каждый из указанных источников настоящим включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Различные системы культур клеток млекопитающих или насекомых также эффективно применяют для экспрессии рекомбинантного белка. Экспрессия рекомбинантных белков в клетках млекопитающих может быть осуществлена, поскольку такие белки обычно правильно складываются, соответствующим образом модифицируются и полностью функциональны. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линии клеток почки обезьяны COS-7, описанные Gluzman (*Cell* 23:175, 1981), и другие линии клеток, способные экспрессировать подходящий вектор, включая, например, L-клетки, C127, 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), линии клеток HeLa и ВНК. Векторы экспрессии млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящие промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга и последовательности терминации транскрипции. Бакуловирусные системы для получения гетерологичных белков в клетках насекомых рассмотрены Luckow and Summers, *Bio/Technology*, 6:47 (1988).

Белки, продуцируемые трансформированным хозяином, могут быть очищены в соответствии с любым подходящим способом. Такие стандартные способы включают хроматографию (например, ионообменную, аффинную и колоночную хроматографию с распределением по размерам), центрифугирование, способы, основанные на различной растворимости, или любой другой стандартный способ очистки белка. Для обеспечения легкой очистки путем пропускания через подходящую аффинную колонку к белку могут быть присоединены аффинные метки, такие как гексагистидин, мальтоза-связывающий домен, последовательность белка оболочки вируса гриппа и глутатион-S-трансфераза. Выделенные белки также могут быть физически охарактеризованы с использованием таких методов, как протеолиз, ядерный магнитный резонанс и рентгеноструктурная кристаллография.

Например, супернатанты из систем, которые секретируют рекомбинантный белок в культуральную среду, могут быть сначала сконцентрированы с использованием поставляемого на рынок фильтра для концентрирования белка, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. После стадии концентрирования концентрат может быть нанесен на подходящую матрицу для очистки. В качестве альтернативы может быть использована анионообменная смола, например, матрица или субстрат, имеющие боковые диэтиламиноэтильные (DEAE) группы. Матрицы могут представлять собой акриламид, агарозу, декстран, целлюлозу или другие типы, обычно используемые для очистки белка. В качестве альтернативы может быть использована стадия катионного обмена. Подходящие катионообменники включают различные нерастворимые матрицы, содержащие сульфопропильные или карбоксиметильные группы. Наконец, для дополнительной очистки связывающегося с CD37 агента могут быть использованы одна или более стадий обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с использованием гидрофобной среды для ОФ-ВЭЖХ, например, силикагеля, имеющего боковые металлические или другие алифатические группы. Некоторые или все вышеуказанные стадии очистки в различных сочетаниях также могут быть использованы для получения гомогенного рекомбинантного белка.

Рекомбинантный белок, получаемый в бактериальной культуре, можно выделить, например, путем первоначальной экстракции из осадков клеток с последующим проведением одной или более стадий концентрирования, высаливания, водной ионообменной или эксклюзионной хроматографии. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) может быть использована на конечных стадиях очистки.

Микробные клетки, используемые для экспрессии рекомбинантного белка, могут быть разрушены любым удобным способом, включая циклы замораживания и оттаивания, обработку ультразвуком, механическое разрушение или использование агентов, лизирующих клетки.

Способы, известные в данной области техники для очистки антител и других белков, также включают, например, описанные в патентных публикациях США № 2008/0312425, 2008/0177048 и 2009/0187005, каждая из которых настоящим включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

III. Полинуклеотиды.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение охватывает полинуклеотиды, содержащие полинуклеотиды, кодирующие специфично связывающийся с CD37 полипептид или фрагмент такого полипептида. Например, в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к CD37 человека или кодирующей фрагмент такого антитела. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК и может быть двунитевой или одонитевой и в случае одонитевой может представлять собой кодирующую нить или не кодирующую (антисмысловую) нить. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, лишенную одного или более эндогенных интронов.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, предложенные в настоящем описании, являются не встречающимися в природе. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, предложенные в настоящем описании, получены рекомбинантным способом. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды выделены. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды являются по существу чистыми.

В настоящем описании предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-11.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательности, кодирующие полипептиды, представленные SEQ ID NO: 3-5. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательности, кодирующие полипептиды, представленные SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательности, кодирующие полипептиды, представленные SEQ ID NO: 3-5 и SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах реализации вектор содержит полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, представленные SEQ ID NO: 3-8. В некоторых вариантах реализации композиция содержит полинуклеотид, кодирующий полипептиды, представленные SEQ ID NO: 3-5, и полинуклеотид, кодирующий полипептиды, представленные SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах реализации композиция содержит вектор, содержащий полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, представленные SEQ ID NO: 3-5, и вектор, содержащий полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, представленные SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, представленный SEQ ID NO: 9, и полинуклеотид, кодирующий полипептид, представленный SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации композиция содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, представленный SEQ ID NO: 9, и вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, представленный SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, представленный SEQ ID NO: 9, и полинуклеотид, кодирующий полипептид, представленный SEQ ID NO: 10. В настоящем описании дополнительно предложен полинуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей, представленных SEQ ID NO: 13 и 14.

Последовательность нуклеиновой кислоты VH muCD37-1B11-2

```
gagggtcaactgctgcagctggacctgagctggtgaagcctggggctcagtgaaagatcctgcaaggctctggttactcattfactggct
actttatgaactgggtgatacagagccatgaaaggccttgagtgattggacgtatfaatccttacaatggtgatacctctacaaccagaa
gttcaaggccaagccacattgactgtagacaatcctctaccacagccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctccgtct
attattgtgatccccggggatagtggtctctctaggtctctcagatgctctggggcagggacctcggctcatgctctctcagccaaaacga
cac (SEQ ID NO:13)
```

Последовательность нуклеиновой кислоты VL muCD37-1B11-2

```
agtattgtgatgaccagactcccaattcctgctgtatcagcaggagacagggttaccataacctgcaaggccagtcagggtgtgagtaat
gatgtagattggtaccaacagaagccaggcagctcctctaaactgctgatactatgcatccaatcctacactggagtcctctgacgtctca
ctggcagtgatgggacggattcacttcagcatcagcactgtgcaggctgaagacctggcagttatttctgtcaccaggattatacctct
ccgacgtctggaggaccacaagctggaatcaaacgggctgat (SEQ ID NO:14)
```

Также предложен полинуклеотид, имеющий последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% идентичную одной из SEQ ID NO: 13 и 14. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид,

по меньшей мере приблизительно на 90% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичный SEQ ID NO: 14.

Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичный SEQ ID NO: 14.

Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичный SEQ ID NO: 13, и полинуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичный SEQ ID NO: 14. Также предложена композиция, содержащая вектор или векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 13, и полинуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды содержат кодирующую последовательность для зрелого полипептида, слитую в той же рамке считывания с полинуклеотидом, который способствует, например, экспрессии и секреции полипептида из клетки-хозяина (например, лидерная последовательность, которая действует как секреторная последовательность для регуляции транспорта полипептида из клетки). Полипептид, имеющий лидерную последовательность, является белком-предшественником, и лидерная последовательность может быть расщеплена клеткой-хозяином с образованием зрелой формы полипептида. Полинуклеотиды также могут кодировать пробелок, который представляет собой зрелый белок плюс дополнительные 5'-аминокислотные остатки. Зрелый белок, имеющий пропоследовательность, является пробелком и представляет собой неактивную форму белка. При расщеплении пропоследовательности остается активный зрелый белок.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды содержат кодирующую последовательность для зрелого полипептида, слитую в той же рамке считывания с маркерной последовательностью, которая обеспечивает возможность для, например, очистки кодирующего полипептида. Например, маркерная последовательность может представлять собой гексагистициновую метку, обеспечиваемую вектором pQE-9, чтобы обеспечить очистку зрелого полипептида, слитого с маркером, в случае бактериального хозяина, или маркерная последовательность может представлять собой гемагглютининовую (HA) метку, полученную из белка гемагглютинина вируса гриппа, в случае использования клеток-хозяев млекопитающих (например, клеток COS-7). Настоящее описание также относится к вариантам описанных выше полинуклеотидов, кодирующим, например, фрагменты, аналоги и производные.

Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в тех, и в других. В некоторых вариантах реализации варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые приводят к молчащим заменам, вставкам или делециям, но не изменяют свойств или активностей кодируемого полипептида. В некоторых вариантах реализации варианты полинуклеотидов возникают вследствие молчащих замен из-за вырожденности генетического кода. Варианты полинуклеотидов могут быть получены по ряду причин, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (изменение кодонов в мРНК человека до тех, которые предпочтительны для бактериального хозяина, такого как *E. coli*).

Также предложены векторы и клетки, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем описании.

IV. Биологические образцы.

Биологические образцы часто фиксируют с помощью фиксатора. Обычно используют альдегидные фиксаторы, такие как формалин (формальдегид) и глутаровый альдегид. Образцы тканей, фиксированные с использованием других методов фиксации, таких как спиртовая иммерсия (Battifora and Kopinski, J.

Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095), также являются подходящими. Используемые образцы также могут быть залиты парафином. В одном из вариантов реализации образцы фиксируют в формалине и заливают парафином (FFPE). В другом варианте реализации блок FFPE окрашивают гематоксилином и эозином перед выбором одной или более частей для анализа, чтобы выбрать определенную область (области) для образца из центральной части блока FFPE. Способы получения тканевых блоков из этих образцов, состоящих из частиц, были использованы в предыдущих исследованиях различных прогностических факторов методом ИГХ и/или хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Abbondanzo et al., Am. J. Clin. Pathol. 1990 May; 93(5):698-702; Allred et al., Arch. Surg. 1990 Jan; 125(1):107-13).

Вкратце, любой интактный орган или ткань могут быть разрезаны на довольно мелкие части и инкубированы в различных фиксаторах (например, формалине, спирте и т.д.) в течение различных периодов времени до тех пор, пока ткань не будет "фиксирована". Образцы могут представлять собой практически любую интактную ткань, хирургически удаленную из организма. Образцы могут быть разрезаны на достаточно мелкие части, подходящие для оборудования, обычно используемого в лабораториях гистопатологии. Размер отрезанных частей обычно составляет от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров. Биологический образец также может представлять собой жидкие экстракты, кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость и/или препарат селезенки.

V. Корреляция экспрессии CD37 и терапевтической эффективности.

Иммуноконъюгаты к CD37 предложены в опубликованной заявке США № 2011/0256153, которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах реализации иммуноконъюгат к CD37 представляет собой IMG529. IMG529 содержит антитело huCD37-3 (содержащее участки CDR, представленные SEQ ID NO: 22-27, VH, представленный SEQ ID NO: 28, и VL, представленный SEQ ID NO: 29), линкер SMCC и майтанзиноид DM1. Последовательности антитела huCD37-3 приведены ниже.

huCD37-3 VH-CDR1: TSGVS (SEQ ID NO:22)

huCD37-3 VH-CDR2: VIWGDGSTN (SEQ ID NO:23)

huCD37-3 VH-CDR3: GGYSLAH (SEQ ID NO:24)

huCD37-3 VL-CDR1: RASENIRSNLA (SEQ ID NO:25)

huCD37-3 VL-CDR2: VATNLAD (SEQ ID NO:26)

huCD37-3 VL-CDR3: QHYWGTTWT (SEQ ID NO:27)

huCD37-3 VH v. 1.0:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKFLWLGVIWGDGSTNYHPSLKS
RLSIKKDHSKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:28)

huCD37-3 VH v. 1.1:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKFLWLGVIWGDGSTNYHSSLKS
RLSIKKDHSKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:32)

huCD37-3 VL:

DIQMTQSPSSLSVSGERVITTCRASENIRSNLAWYQKPKGSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGS
GSGTDYSLKINSLQPEDFGTYCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:29)

Тяжелая цепь (HC) huCD37-3 v. 1.0:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKFLWLGVIWGDGSTNYHPSLKS
RLSIKKDHSKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKFGYSLAHWGQGLVTVSSASTKTPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT

YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:30)

Тяжелая цепь (HC) huCD37-3 v. 1.1:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLTTSQVSWVRQPPGKGLLEWLGVWGDGSTNYHSSLKLS
RLSIKDKHKSQVFLKLNLSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:33)

Легкая цепь (LC) huCD37-3:

DIQMTQSPSSLSVSGVERVTTCRASENIRSNLAWYQQKPGKSPKLLVNAVATNLADGVPSRFSGS
GSGTDYSLKINSQPEDFGTYCYCQHWGTTWTWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTNQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

В некоторых вариантах реализации иммуноконъюгат может содержать антитело к CD37, полученное из гибридомы с обозначением депонирования в ATCC PTA-10664, депонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC) по адресу 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 18 февраля 2010 г., или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит области VH-CDR и VL-CDR антитела, полученного из гибридомы PTA-10664.

IMGN529 в настоящее время проходит клинические исследования в отношении лечения лейкозов и лимфом. Способы введения IMGN529 предложены в заявке США № 14/710354 (публикация № 2015/0343077) и источнике Stathis, et al., "Preliminary Findings from a phase I, multi-center, open-label study of the anti-CD37 antibody-drug conjugate (ADC), IMGN529, in adult patients with relapsed or refractory non-Hodgkin Lymphoma (NHL)", Abstract Number 8526, ASCO Annual Meeting (2014)), каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложен способ идентификации субъектов, которые могут положительно реагировать на нацеленную на CD37 терапию вследствие повышенных уровней экспрессии CD37 у субъекта, в частности, с применением антител и их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем описании, с помощью которых можно обнаруживать динамический диапазон уровней экспрессии CD37, например, методом ИГХ. Оценка образцов пациентов и корреляция с эффективностью *in vivo* с использованием моделей ксенотрансплантатов демонстрирует возможности анализа экспрессии для отбора субъектов, которые более склонны реагировать на лечение. С помощью ИГХ получают значение экспрессии CD37 в опухолевых клетках: от 0 (экспрессия отсутствует) до 3 (очень высокие уровни экспрессии). Образцы со значениями экспрессии CD37, составляющими 1, 2 или 3 (или 2 или 3), характеризуются повышенной вероятностью реакции на нацеленную на CD37 противораковую терапию при клинически значимых дозах иммуноконъюгатов к CD37 (см., например, WO 2013/149171, который включен в настоящее описание посредством ссылки). Таким образом, идентификация лиц, имеющих повышенное значение CD37, поможет выявить лиц, которые могут реагировать на клинически значимую дозу. Более того, экспрессия более однородных уровней CD37 обеспечивает лучшую корреляцию с терапевтической пользой. Таким образом, гомогенная равномерность окрашивания или сочетание большей интенсивности окрашивания с гетерогенной равномерностью окрашивания могут указывать на увеличение экспрессии CD37. Например, значения, превышающие 2 гетеро, могут быть применены в качестве критерия отбора пациента для лечения с применением нацеленного на CD37 терапевтического агента. Помимо этого, критерии отбора пациента могут быть основаны на процентном содержании в образце клеток, экспрессирующих мембранный CD37 на определенном уровне, который отражает как интенсивность окрашивания (например, 1, 2 или 3), так и равномерность (например, гетерогенное или гомогенное (см. табл. 3)). Например, образец может быть охарактеризован как содержащий, например, по меньшей мере 25% клеток, положительно окрашиваемых на CD37 со значением по меньшей мере 2 или более, или по меньшей мере 75% клеток, положительно окрашиваемых на CD37 со значением по меньшей мере 2 или более. В другом примере образец может быть охарактеризован как содержащий, например, по меньшей мере 25% клеток, положительно окрашиваемых на CD37 со

значением по меньшей мере 3, или по меньшей мере 75% клеток, положительно окрашиваемых на CD37 со значением 3. В другом примере экспрессии CD37 присваивают H-значение. Помимо этого, иммунологическое обнаружение (с помощью иммуногистохимии) CD37 может быть оценено с использованием H-значений. H-значения объединяют значения интенсивности окрашивания со значениями равномерности с использованием расчета, предложенного в настоящем описании. Как более подробно описано ниже, H-значения могут варьировать от 1 до 300.

Анализ экспрессии CD37 также может быть использован для идентификации пациентов, у которых сниженные уровни нацеленной на CD37 противораковой терапии ("низкодозовая терапия") могут быть эффективны для обеспечения противоопухолевых реакций. Как должно быть понятно в данной области техники, соединения обычно вводят в наименьшей дозе, которая вызывает желаемый терапевтический ответ. Это особенно важно для терапевтических средств, которые вызывают клинические и часто нежелательные побочные эффекты. Возможность распознавания таких субъектов с повышенными уровнями экспрессии CD37 позволяет потенциально минимизировать дозу нацеленного на CD37 терапевтического средства, тем самым уменьшая возможные побочные эффекты, сохраняя при этом терапевтическую эффективность.

VI. Способы иммунодетекции.

В некоторых вариантах реализации связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты) могут быть применены в способах иммунодетекции для идентификации образцов и/или субъектов с повышенной экспрессией или сверхэкспрессией CD37. Способы иммунодетекции включают, например, иммуногистохимию (ИГХ), иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), если упоминать лишь несколько из них.

Как правило, способы иммунодетекции включают получение образца, предположительно содержащего CD37, и приведение указанного образца в контакт с первым связывающимся с CD37 агентом (например, антителом к CD37 или его антигенсвязывающим фрагментом) в условиях, подходящих для обеспечения образования иммунокомплексов.

Относительно обнаружения антигена, анализируемый биологический образец может представлять собой любой образец, в котором требуется обнаружить CD37, такой как жидкий экстракт, кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, лимфатическая жидкость, срез или участок ткани, гомогенизированный экстракт ткани, аспираты биопсий, клетка, отделенные и/или очищенные формы содержащих CD37 композиций или любая биологическая жидкость. В некоторых вариантах реализации используют образцы крови, плазмы или лимфы или экстракты.

Приведение выбранного биологического образца в контакт со связывающимся с CD37 агентом (например, антителом к CD37 или его антигенсвязывающим фрагментом) в подходящих условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), обычно заключается в добавлении связывающегося с CD37 агента (например, антитела к CD37 или его антигенсвязывающего фрагмента) к образцу и инкубирование смеси в течение периода времени, достаточного для того, чтобы связывающийся с CD37 агент (например, антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент) образовал комплексы, т.е. связался с любым присутствующим CD37. По истечении этого времени образец, такой как срез ткани или жидкий экстракт, планшет для ELISA или вестерн-блот, обычно промывают для удаления любого неспецифически связанного связывающегося с CD37 агента (например, антитела к CD37 или его антигенсвязывающего фрагмента), обеспечивая обнаружение только тех связывающихся с CD37 агентов (например, антител к CD37 или их антигенсвязывающих фрагментов), которые специфично связаны в первичных иммунных комплексах.

Как правило, обнаружение образования иммунокомплексов хорошо известно в данной области техники и может быть достигнуто путем применения многочисленных подходов. Связывающийся с CD37 агент (например, антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент), используемый для обнаружения, сам может быть связан с обнаруживаемой меткой, так чтобы можно было просто обнаружить эту метку, определив таким образом количество первичных иммунных комплексов в композиции, подлежащей анализу. В качестве альтернативы первый связывающийся с CD37 агент (например, антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент), который связывается в первичных иммунных комплексах, может быть обнаружен с помощью второго связывающего агента (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), который обладает связывающей способностью по отношению к первому связывающемуся с CD37 агенту (например, антителу к CD37 или его антигенсвязывающему фрагменту). В этих случаях второй связывающий агент может быть связан с обнаруживаемой меткой. Когда второй связывающий агент сам по себе является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, он может быть назван "вторичным" антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Первичные иммунные комплексы приводят в контакт с меченым вторичным связывающим агентом в подходящих условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования вторичных иммунных комплексов. Вторичные иммунные комплексы затем обычно промывают для удаления любых неспецифически связанных меченых вторичных связывающих агентов, а затем обнаруживают оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах. Дополнительно способы включают обнаружение первичных иммунных ком-

плексов с помощью двухстадийного подхода. Второй связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), который обладает связывающей способностью по отношению к первому связывающемуся с CD37 агенту (например, антителу к CD37 или его антигенсвязывающему фрагменту), используют для образования вторичных иммунных комплексов, как описано в настоящем описании. После промывки вторичные иммунные комплексы приводят в контакт с третьим связывающим агентом, который обладает связывающей способностью по отношению ко второму связывающему агенту (например, антителу или его антигенсвязывающему фрагменту), также в подходящих условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий связывающий агент связан с обнаруживаемой меткой, что позволяет обнаружить образовавшиеся третичные иммунные комплексы. Эта система может обеспечить усиление сигнала, если это желательно.

В другом варианте реализации биотинилированный связывающийся с CD37 агент (например, антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент) используют для обнаружения CD37, а второй связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) затем используют для обнаружения биотина. В этом способе тестируемый образец сначала инкубируют в растворе, содержащем биотинилированный связывающийся с CD37 агент (например, антитело к CD37 или его антигенсвязывающий фрагмент). Если CD37 присутствует, часть связывающего агента связывается с CD37 с образованием комплекса биотинилированный связывающийся с CD37 агент - CD37. Затем указанный комплекс амплифицируют путем последовательного инкубирования в растворах стрептавидина (или авидина), биотинилированной ДНК и/или комплементарной биотинилированной ДНК, на каждой стадии добавляя дополнительные сайты биотина к комплексу антитело/антиген. Стадии амплификации повторяют до достижения подходящего уровня амплификации, после чего образец инкубируют в растворе, содержащем второй связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), который связывается с биотином. Этот второй связывающий агент метят, например, ферментом, который может быть использован для обнаружения присутствия комплекса антитело/антиген с помощью гистоэнзимологии с использованием хромогенного субстрата. При подходящей амплификации может быть получен конъюгат, который является макроскопически видимым.

В одном из вариантов реализации для иммунологического обнаружения используют иммуногистохимию (ИГХ). При использовании ИГХ обнаружение CD37 в образце может быть достигнуто с помощью нацеливания на образец зонда, например, антитела к CD37 или его антигенсвязывающего фрагмента. Указанный зонд может быть либо непосредственно, либо опосредованно связан с обнаруживаемой меткой или может быть обнаружен с помощью другого зонда, который либо непосредственно, либо опосредованно связан с обнаруживаемой меткой.

В некоторых вариантах реализации с помощью ИГХ можно обнаруживать различия между различными уровнями экспрессии белка, например, в калиброванном методе ИГХ. В некоторых вариантах реализации с помощью ИГХ можно различать интенсивности окрашивания для образцов, характеризующихся низкой, промежуточной или высокой экспрессией CD37.

В одном из вариантов реализации иммунологическое обнаружение (с помощью иммуногистохимии) CD37 оценивают как по интенсивности, так и по равномерности (процент окрашенных клеток - только мембран). Сравнительные шкалы для интенсивности экспрессии CD37 соотносятся как 0 - отрицательная, 0-1 - очень слабая, 1 - слабая, 1-2 - от слабой до умеренной, 2 - умеренная, 2-3 - от умеренной до сильной, 3 - от сильной до очень сильной. Количественно значение 0 означает, что окрашивания не наблюдается или окрашивание мембраны наблюдается менее чем в 10% опухолевых клеток. Значение 1 или 1+ показывает, что слабое/едва заметное окрашивание мембраны обнаруживается более чем в 10% опухолевых клеток. Клетки окрашиваются только в части их мембран. Значения 1 и 1+ используются взаимозаменяемо. При значении 2 полное окрашивание мембран от слабого до умеренного наблюдается более чем в 10% опухолевых клеток. Наконец, значение 3 показывает, что полное окрашивание мембран от умеренного до сильного наблюдается более чем в 10% опухолевых клеток. Образцы со значением 0 или 1 для экспрессии CD37 могут быть охарактеризованы как не имеющие повышенной экспрессии CD37, в то время как образцы со значениями 2 или 3 могут быть охарактеризованы как имеющие сверхэкспрессию или повышенный уровень CD37. В другом варианте реализации с использованием антител, их антигенсвязывающих фрагментов или полипептидов, предложенных в настоящем описании, образцы со значением 0 для экспрессии CD37 могут быть охарактеризованы как не имеющие повышенной экспрессии CD37, образцы со значением 1 могут быть охарактеризованы как имеющие повышенную экспрессию CD37, а образцы со значениями 2 или 3 могут быть охарактеризованы как имеющие сверхэкспрессию или повышенный уровень CD37. В некоторых вариантах реализации значение, составляющее по меньшей мере 2 в образце, полученном от субъекта, идентифицирует субъекта как претендента на лечение с применением схемы лечения, нацеленного на CD37 (например, IMG529). В некоторых вариантах реализации значение, составляющее по меньшей мере 3 в образце, полученном от субъекта, идентифицирует субъекта как претендента на лечение с применением схемы лечения, нацеленного на CD37 (например, IMG529). Образцы, характеризующиеся сверхэкспрессией CD37, также могут быть оценены по иммуногистохимическим показателям, соответствующим количеству копий экспрессируемых молекул

CD37 на клетку или связанных антител на клетку (ABC), и могут быть биохимически определены.

Сравнительные шкалы для равномерности CD37 (процент окрашивания мембран клеток) следующие: отрицательное = 0%; фокальное = <25%; гетерогенное (гетеро) = 25-75% и гомогенное (гомо) = >75%.

В некоторых вариантах реализации значение, составляющее по меньшей мере 2 гетеро в образце, полученном от субъекта, идентифицирует субъекта как претендента на лечение с применением схемы лечения, нацеленного на CD37 (например, IMG529). В некоторых вариантах реализации значение, составляющее по меньшей мере 2 гомо в образце, полученном от субъекта, идентифицирует субъекта как претендента на лечение с применением схемы лечения, нацеленного на CD37 (например, IMG529). В некоторых вариантах реализации значение, составляющее по меньшей мере 3 гетеро в образце, полученном от субъекта, идентифицирует субъекта как претендента на лечение с применением схемы лечения, нацеленного на CD37 (например, IMG529). В некоторых вариантах реализации значение, составляющее по меньшей мере 3 гомо в образце, полученном от субъекта, идентифицирует субъекта как претендента на лечение с применением схемы лечения, нацеленного на CD37 (например, IMG529). В одном из вариантов реализации иммунологическое обнаружение (с помощью иммуногистохимии) CD37 оценивают с использованием H-значений. H-значения объединяют значения интенсивности окрашивания (например, значения от 0 до 3, где 0 означает отсутствие окрашивания, а 3 означает сильное окрашивание) с процентным содержанием клеток, которые являются положительными по окрашиванию мембран (т.е. равномерности). H-значение может быть рассчитано следующим образом: H-значение = [0*(процентное содержание клеток, окрашенных с интенсивностью 0)] + [1*(процентное содержание клеток, окрашенных с интенсивностью 1)] + [2*(процентное содержание клеток, окрашенных с интенсивностью 2)] + [3*(процентное содержание клеток, окрашенных с интенсивностью 3)]. Соответственно, H-значение может варьировать от 0 (отсутствие окрашивания мембран клеток) до 300 (все мембраны клеток окрашены с интенсивностью 3).

В качестве примера H-значение у субъекта, имеющего рак, может быть следующим:

H-значение = (75% с интенсивностью 0) + (0% с интенсивностью 1) + (0% с интенсивностью 2) + (25% с интенсивностью 3) = 75 или

H-значение = (0% с интенсивностью 0) + (75% с интенсивностью 1) + (0% с интенсивностью 2) + (25% с интенсивностью 3) = 150.

В другом примере H-значение у субъекта, имеющего рак, может быть следующим:

H-значение = (75% с интенсивностью 0) + (0% с интенсивностью 1) + (25% с интенсивностью 2) + (0% с интенсивностью 3) = 50 или

H-значение = (0% с интенсивностью 0) + (75% с интенсивностью 1) + (25% с интенсивностью 2) + (0% с интенсивностью 3) = 125.

В одном из вариантов реализации иммунологическое обнаружение (с помощью иммуногистохимии) CD37 оценивают с использованием процента положительного результата окрашивания и интенсивности по образцу. В этом варианте реализации отбор для лечения с применением схемы лечения, нацеленного на CD37, основан на процентном содержании в образце клеток, экспрессирующих мембранный CD37 на определенном уровне, который отражает как интенсивность окрашивания (например, 1, 2 или 3), так и равномерность (например, гетерогенное или гомогенное (см. табл. 3)). Например, образец, содержащий по меньшей мере 25% (т.е. 25-75% или >75%) клеток, положительно окрашиваемых на CD37 со значением 3, может быть охарактеризован как "3 гетеро" и "3 гомо" или, совместно, как "по меньшей мере 25% положительны со значением 3".

ИГХ может быть выполнена вручную или с использованием автоматизированной системы (например, с использованием автоматизированного фильтра). ИГХ может быть выполнена на клетках, осадках клеток, тканях, препаратах из крови, плазме, сыворотке или лимфатической жидкости и т.д. В некоторых вариантах реализации образцы представляют собой фиксированные образцы. В некоторых вариантах реализации образцы представляют собой залитые парафином образцы. В некоторых вариантах реализации образцы представляют собой фиксированные формалином и залитые парафином образцы.

В одном из вариантов реализации для иммунологического обнаружения используют иммуноферментный анализ (ELISA). Методология, лежащая в основе ELISA, хорошо известна в данной области техники. См., например, источник Lequin R, "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", Clin. Chem. 57:2415-2418 (2005), включенный в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. В одном иллюстративном ELISA связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) иммобилизуют на выбранной поверхности, проявляющей сродство к белку, такой как лунка в полистирольном планшете для микротитрования. Затем в лунки добавляют исследуемый образец, такой как клинический образец, содержащий или предполагается содержащий CD37. После связывания и промывки для удаления неспецифически связанных иммунокомплексов может быть обнаружен связавшийся CD37. Обнаружения обычно достигают добавлением второго антитела, специфичного для CD37, или его антигенсвязывающего фрагмента, который связан с обнаруживаемой меткой. Этот тип ELISA представляет собой "сэндвич-ELISA". Обнаружение также может быть достигнуто добавлением второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с последую-

щим добавлением третьего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который обладает связывающей способностью по отношению ко второму антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем третье антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связан с обнаруживаемой меткой. Появление окраски можно регистрировать спектрофотометрически и соотносить с концентрацией CD37 с помощью калибровки с использованием калибровочной кривой. В одном иллюстративном ELISA исследуемые образцы иммобилизуют на поверхности лунки и затем приводят в контакт со связывающимися с CD37 агентами (например, антителами или их антигенсвязывающими фрагментами). После связывания и промывки для удаления неспецифически связанных иммунокомплексов обнаруживают связавшийся CD37. В случае, если исходные связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) связаны с обнаруживаемой меткой, иммунокомплексы могут быть обнаружены непосредственно. Опять же, иммунокомплексы могут быть обнаружены с использованием второго связывающего агента, который обладает связывающей способностью по отношению к первому связывающему агенту, причем второй связывающий агент связан с обнаруживаемой меткой. Другой ELISA, в котором исследуемые образцы иммобилизованы, включает использование конкуренции при обнаружении. В этом ELISA меченые связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) добавляют в лунки, позволяют связаться с CD37 и обнаруживают с помощью их метки. Количество CD37 в образце затем определяют путем смешивания указанного образца с мечеными связывающимися с CD37 агентами (например, антителами или их антигенсвязывающими фрагментами) до или во время инкубирования в лунках с покрытием. Присутствие CD37 в образце способствует уменьшению количества связывающихся с CD37 агентов (например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов), доступных для связывания с лункой, и таким образом уменьшает конечный сигнал.

В одном из вариантов реализации для иммунологического обнаружения используют вестерн-блоттинг. Для вестерн-блоттинга белки экстрагируют из образца клетки и подвергают электрофорезу (например, в ДНС-ПААГ) и получают отпечаток на мембране (например, нитроцеллюлозе или поливинилиденфториде (ПВДФ)). Затем мембрану приводят в контакт со связывающимся с CD37 агентом (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом), который может быть либо непосредственно помечен, либо в дальнейшем подвергнут действию меченого вторичного связывающего агента. Обнаружение может быть осуществлено, например, с помощью автордиографии, колориметрической реакции или хемилюминесценции. Этот способ обеспечивает как возможность количественной оценки содержания субстрата, так и определение его идентичности по относительному положению на мембране, которое указывает на длину пробега в акриламидном геле во время электрофореза.

В одном из вариантов реализации для иммунологического обнаружения используют проточную цитометрию. Так, например, количество связанных антител на клетку (ABC) может быть оценено с использованием проточной цитометрии. Большое количество связанных антител к CD37 на клетку может указывать на высокие уровни экспрессии CD37 и высокую вероятность чувствительности к лечению с применением антитела к CD37 или его иммуноконъюгата.

В одном из вариантов реализации для иммунологического обнаружения используют FACS. Анализ методом FACS позволяет обнаружить CD37 на мембранах клеток. Вкратце, связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) связаны с флуорофорами, и обнаружение осуществляют с помощью аппарата для сортировки клеток, который считывает длину волны света, излучаемого каждой клеткой, когда она проходит через световой пучок. В этом способе может быть использовано два или более антитела одновременно.

VII. Агенты для детекции.

Связывающиеся с CD37 агенты, предложенные в настоящем описании, могут быть связаны с по меньшей мере одним агентом с образованием конъюгата для детекции. Помимо этого, связывающиеся с CD37 агенты, предложенные в настоящем описании, могут быть обнаружены с помощью агента для детекции, который связан по меньшей мере с одним агентом с образованием конъюгата для детекции. Молекулы и фрагменты для детекции хорошо известны в данной области техники. Для повышения эффективности молекул антител в качестве диагностических принято присоединять или ковалентно связывать или получать комплекс по меньшей мере с одной желаемой молекулой или фрагментом. Такая молекула или фрагмент может представлять собой по меньшей мере одну репортерную молекулу, но не ограничиваясь ею. Репортерная молекула определена как любой фрагмент, который может быть обнаружен с использованием анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, которые были конъюгированы с антителами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, люминесцентные молекулы, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы и/или лиганды, такие как биотин.

Конъюгаты антитела или антигенсвязывающего фрагмента для детекции, предусмотренные в настоящем изобретении, включают конъюгаты для детекции для применения *in vitro*, где антитело или фрагмент связано/связан с вторичным связывающим лигандом и/или ферментом (ферментной меткой), который будет образовывать окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Антитела к CD37 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем описании, в частности пригодны для применения в способах с применением конъюгатов, поскольку, например, они позволяют обна-

руживать динамический диапазон CD37. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу (хрена) и/или глюкозооксидазу. В некоторых вариантах реализации вторичные связывающие лиганды представляют собой соединения биотина и/или авидина и стрептавидина. В случае ферментов интенсивность развившегося и измеренного окрашивания будет представлять собой непосредственное измерение количества присутствующего CD37. Если ПХ является меткой, окрашивание может быть обнаружено с использованием субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ), например, по поглощению при длине волны 450 нм. В качестве альтернативы могут быть использованы другие хромогенные субстраты для ПХ, такие как 3,3'-диаминобензидин (DAB) или 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) (ABTS). Субстраты, такие как ТМВ, DAB и ABTS, могут быть применены, например, в способах иммунодетекции с использованием ELISA.

3,3'-Диаминобензидин (DAB) является субстратом для ферментов, таких как ПХ, образующим коричневый конечный продукт, который очень малорастворим в спирте и других органических растворителях. Окисление DAB также вызывает полимеризацию, приводящую к способности взаимодействовать с тетраоксидом осмия и, таким образом, увеличению интенсивности его окрашивания и электронной плотности. Из нескольких металлов и способов, используемых для усиления оптической плотности полимеризованного DAB, хлорид золота в сочетании с сульфидом серебра представляется наиболее эффективным.

3-Амино-9-этилкарбазол (АЕС) является субстратом для ферментов, таких как ПХ, и при окислении образует розово-красный конечный продукт, который растворим в спирте. Поэтому образцы, обработанные АЕС, не следует погружать в спирт или спиртовые растворы (например, гематоксилин Гарриса (Harris)). Вместо этого следует использовать водную среду для контрастного окрашивания и заключения.

4-Хлор-1-нафтол (CN) является субстратом для ферментов, таких как ПХ, который выпадает в осадок в виде синего конечного продукта. Поскольку CN растворим в спирте и других органических растворителях, образец нельзя обезвоживать, подвергать действию спиртовых контрастных красителей или заключать под покровное стекло с применением сред для заключения, содержащих органические растворители. В отличие от DAB, CN имеет свойство диффундировать от места осаждения.

p-Фенилендиамина дигидрохлорид/пирокатехин (реактив Ханкера-Яте (Hanker-Yates)) является субстратом для ферментов, таких как ПХ, который образует сине-черный продукт реакции, нерастворимый в спирте и других органических растворителях. Подобно полимеризованному DAB, этот продукт реакции может быть обработан осмиевой кислотой. Были получены различные результаты с применением реактива Ханкера-Яте в иммунопероксидажном методе.

Могут быть применены хемилюминесцентные субстраты, такие как ECL. Субстраты, такие как ECL, могут быть применены, например, в способах иммунодетекции с использованием вестерн-блоттинга.

Иллюстративные флуоресцентные метки, предназначенные для применения в конъюгатах связывающего агента (например, антитела), включают, например, Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Dylight 488, флуоресцеина изотиоцианат (FITC), зеленый флуоресцентный белок (GFP), HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, Phycoerythrin, REG, родамин зеленый, родамин красный, тетраметилродамин (TMR) ренографин, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин, тexasский красный и производные этих меток (т.е. галогенированные аналоги, модифицированные изотиоцианатом или другими линкерами для конъюгирования т.д.). Примером радиоактивной метки является тритий.

Молекулы, содержащие азидогруппы, также могут быть использованы для образования ковалентных связей с белками через реакционноспособные нитреновые промежуточные соединения, которые образуются под действием ультрафиолетового излучения низкой интенсивности (Potter & Haley, 1983). В частности, 2- и 8-азидо аналоги пуриновых нуклеотидов были использованы в качестве сайт-направленных фотозондов для идентификации нуклеотид-связывающих белков в неочищенных экстрактах клеток (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- и 8-азидонуклеотиды также были использованы для картирования нуклеотид-связывающих доменов очищенных белков (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989 и Dholakia et al., 1989) и могут быть использованы в качестве антителосвязывающих агентов.

В других вариантах реализации настоящего изобретения связывающиеся с CD37 агенты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты) или вторичные связывающие агенты являются радиоактивно мечеными нуклидами, такими как тритий. В дополнительных вариантах реализации применяют наночастицы золота (такие как размером от приблизительно 0,5 до 40 нм) и/или квантовые точки (Quantum Dots) (Хейвард, Калифорния).

В некоторых вариантах реализации CD37 обнаруживают с использованием реагента Optiview DAB IHC Detection reagent (каталог Ventana # 760-700).

В некоторых вариантах реализации CD37 обнаруживают с использованием системы окрашивания BenchMark Ultra.

В некоторых вариантах реализации CD37 обнаруживают с использованием системы окрашивания BenchMark Ultra с применением реагента Optiview DAB IHC Detection reagent (каталог Ventana

760-700).

VIII. Композиции и наборы.

Также в настоящем описании предложены композиции и наборы для применения в практическом осуществлении способов, раскрытых в настоящем описании. Такие наборы могут содержать емкости, каждая из которых содержит один или более различных реагентов (обычно в концентрированной форме), используемых в указанных способах, включая, например, один или более связывающихся с CD37 агентов (например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов), буферы и/или реагенты и оборудование для обнаружения CD37 для обеспечения практического применения настоящего изобретения. Набор может дополнительно содержать второй связывающий агент, который связывается со связывающимся с CD37 агентом, и необязательно третий связывающий агент, который связывается со вторым связывающимся агентом. Связывающийся с CD37 агент, второй связывающий агент или третий связывающий агент могут быть связаны с реагентом для детекции или набор может содержать реагенты для присоединения реагента для детекции к связывающемуся с CD37 агенту, второму связывающему агенту или третьему связывающему агенту. Описание метки или индикатора или набор инструкций по применению компонентов набора в способе обнаружения лиганда согласно настоящему изобретению обычно также будут включены, причем инструкции могут содержаться в листке-вкладыше и/или на упаковке набора или его компонентов.

В некоторых вариантах реализации набор содержит первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD37, второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антителом или антигенсвязывающим фрагментом, третье антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со вторым антителом или антигенсвязывающим фрагментом, где указанное третье антитело или антигенсвязывающий фрагмент связано/связан с реагентом для детекции (например, ферментной меткой), необязательно субстрат для реагента для детекции (например, TMB, DAB или ABTS) и необязательно белок CD37 или образец клеток, содержащий CD37 (например, залитый парафином образец). Наборы могут дополнительно содержать терапевтический агент для лечения рака, такой как иммуноконъюгат к CD37.

В одном из вариантов реализации связывающийся с CD37 агент представляет собой 1B11-2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов реализации связывающийся с CD37 агент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом CD37, что и 1B11-2. В одном из вариантов реализации связывающийся с CD37 агент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который содержит шесть участков CDR 1B11-2.

В одном из вариантов реализации связывающийся с CD37 агент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который содержит VH и VL 1B11-2.

В одном из вариантов реализации специфичное к CD37 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мкг/мл, от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 мкг/мл, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мкг/мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 15 мкг/мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 15 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мкг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 15 мкг/мл или от приблизительно 2 до приблизительно 10 мкг/мл.

В другом варианте реализации специфичное к CD37 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрации приблизительно 1,5 мкг/мл, приблизительно 2 мкг/мл, приблизительно 3 мкг/мл, приблизительно 4 мкг/мл, приблизительно 5 мкг/мл, приблизительно 6 мкг/мл, приблизительно 7 мкг/мл, приблизительно 8 мкг/мл, приблизительно 9 мкг/мл или приблизительно 10 мкг/мл. В другом варианте реализации специфичное к CD37 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрации приблизительно 2 мкг/мл. В другом варианте реализации специфичное к CD37 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрации приблизительно 10 мкг/мл.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструкциями по разведению для достижения конечной концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 15 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мкг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 15 мкг/мл или от приблизительно 2 до приблизительно 10 мкг/мл.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструкциями по разведению для достижения конечной концентрации приблизительно 1,5 мкг/мл, приблизительно 2 мкг/мл, приблизительно 3 мкг/мл, приблизительно 4 мкг/мл, приблизительно 5 мкг/мл, приблизительно 6 мкг/мл, приблизительно 7 мкг/мл, приблизительно 8 мкг/мл, приблизительно 9 мкг/мл или приблизительно 10 мкг/мл. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструкциями по разведению для достижения конечной концентрации приблизительно 2 мкг/мл. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструк-

циями по разведению для достижения конечной концентрации приблизительно 2,1 мкг/мл. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструкциями по разведению для достижения конечной концентрации приблизительно 4,2 мкг/мл. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструкциями по разведению для достижения конечной концентрации приблизительно 8,4 мкг/мл. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в концентрированный раствор с инструкциями по разведению для достижения конечной концентрации приблизительно 10 мкг/мл. Набор может также содержать инструкции по обнаружению и оценке экспрессии CD37. Набор может также содержать контрольные или эталонные образцы. Неограничивающие примеры контрольных или эталонных образцов включают осадки клеток или линии клеток культуры тканей, полученные из нормальных (нормальный контроль) или опухолевых (положительный контроль) образцов. Иллюстративные линии клеток включают линии клеток, стабильно или временно трансфицированные вектором экспрессии, который экспрессирует CD37. Дополнительные примеры включают осадки клеток и образцы тканей, описанные в примерах. Положительные линии клеток включают клетки Дауди (высокая экспрессия), клетки Ramos (умеренная экспрессия) и клетки Намальвы (от умеренной до низкой экспрессии). Миндалины человека служат как положительной, так и отрицательной контрольной тканью, поскольку зародышевые центры и мантийные зоны демонстрируют высокую экспрессию, а межфолликулярная область демонстрирует отсутствие экспрессии. В некоторых вариантах реализации контрольные или эталонные образцы представляют собой залитые парафином образцы.

В некоторых вариантах реализации набор представляет собой упакованную комбинацию, включающую основные элементы: (а) захватывающие реагенты, состоящие из моноклональных антител против CD37 человека; и (б) реагенты, которые также могут содержать моноклональные антитела к CD37, но могут также содержать обнаруживаемые (меченые или немеченые) антитела, которые связываются с CD37. Эти основные элементы определены в настоящем описании.

В одном из вариантов реализации набор дополнительно содержит твердый носитель для захватывающих реагентов, который может быть представлен в виде отдельного элемента или на котором захватывающие реагенты уже иммобилизованы. Следовательно, захватывающие антитела в наборе могут быть иммобилизованы на твердом носителе или они могут быть иммобилизованы на таком носителе, который включен в набор или предоставляется отдельно от набора.

В одном из вариантов реализации захватывающий реагент наносят на планшеты для микротитрования. Реагент для детекции может представлять собой меченые антитела, обнаруживаемые непосредственно, или немеченые антитела, которые обнаруживают с помощью меченых антител, направленных против немеченых антител, полученных от других видов. В случае, когда метка представляет собой фермент, набор будет обычно содержать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента, а в случае, когда метка представляет собой флуорофор - предшественник красителя, который обеспечивает обнаруживаемый хромофор. В случае, когда реагент для детекции является немеченым, набор может дополнительно содержать средство для обнаружения обнаруживаемых антител, такое как меченые антитела, направленные на немеченые антитела, например, во флуориметрически обнаруживаемой форме. В случае, когда метка представляет собой фермент, набор будет обычно содержать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента, когда метка представляет собой флуорофор предшественник красителя, который обеспечивает обнаруживаемый хромофор, а когда метка представляет собой биотин - авидин, такой как авидин, стрептавидин или стрептавидин, конъюгированный с ПХ или α -галактозидазой совместно с 4-метилумбеллиферил-бета-D-глюкуронидом (MUG).

В одном из вариантов реализации захватывающий реагент представляет собой антитело 1B11-2 к CD37 или антитело, содержащее последовательности антитела 1B11-2. В одном из вариантов реализации реагент для детекции представляет собой антитело 1B11-2 к CD37 или антитело, содержащее последовательности антитела 1B11-2. В другом варианте реализации реагент для детекции 1B11-2 антитело к CD37 или антитело, содержащее последовательности антитела 1B11-2, является биотинилированным.

В другом варианте реализации набор дополнительно содержит реагент для детекции, выбранный из группы, состоящей из фермента, флуорофора, радиоактивной метки и люминофора. В другом варианте реализации реагент для детекции выбран из группы, состоящей из биотина, дигоксигенина, флуоресцеина, трития и родамина. Набор может также содержать инструкции по проведению анализа и/или белок CD37 или его фрагменты (например, внеклеточный домен CD37 или внеклеточный домен CD37 с полным доменом связывания GPI или его частью) в качестве стандарта антигена, а также другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы для промывки и инкубирования и т.п. В одном из вариантов реализации стандарт антигена CD37 представляет собой белок CD37, описанный в примерах в настоящем документе. Набор может также содержать инструкции по обнаружению и оценке экспрессии CD37. Компоненты набора могут быть представлены в заранее определенных соотношениях, при этом соответствующие количества различных реагентов подходящим образом варьируют для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые существенно усиливают чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть представлены в виде сухих порошков, обычно лиофилизованных, включая вспомогательные вещества, которые при растворении будут обеспечивать раствор реагента, имеющий подходящую

концентрацию для соединения с исследуемым образцом. Также предложены композиции, содержащие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании. В одном из вариантов реализации композиция содержит антитело к CD37 или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем описании, и буфер, например буфер, который может быть применен в анализе на обнаружение, таком как ИГХ, ELISA или FACS. Такие буферы известны средним специалистам в данной области техники и включают разбавители. В качестве примера, буферы для ИГХ могут содержать, например, казеин, сыворотку или альбумин (такие как телячья сыворотка, сыворотка козла или БСА), Tween или тритон, ФСБ и/или азид натрия или любое их сочетание. Буферы для ИГХ также предложены в настоящем описании и известны средним специалистам в данной области техники. Буферы для ELISA также предложены в настоящем описании и известны средним специалистам в данной области техники. Буферы для ELISA могут содержать, например, сыворотку или альбумин (такие как телячья сыворотка, сыворотка козла или БСА), обезжиренное сухое молоко, казеин и/или желатин или любое их сочетание. Некоторые буферы для FACS предложены в настоящем описании, например, в рабочих примерах. Буферы для FACS также могут содержать, например, сыворотку или альбумин (такие как телячья сыворотка, сыворотка козла или БСА) и/или азид натрия. Буферы для FACS также могут содержать ФСБ, ЭДТА и/или ДНКазу или любое их сочетание.

Варианты реализации согласно настоящему описанию могут быть дополнительно определены посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры, которые подробно описывают получение некоторых антител согласно настоящему описанию и способов применения антител согласно настоящему описанию. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что многие модификации как материалов, так и способов могут быть осуществлены на практике без отклонения от объема настоящего описания.

IX. Примеры.

Понятно, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей и что специалистам в данной области техники будут предложены различные модификации или изменения в свете этого, и такие модификации или изменения должны быть включены в сущность и объем настоящей заявки.

Пример 1. Получение гибридом CD37.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к CD37 человека, которые подходят для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания (антитела согласно настоящему описанию), были выбраны приблизительно из 4800 гибридом. Гибридомы получали иммунизацией мышей Balb/c дикого типа рекомбинантным антигеном CD37 hCD37-LEL, полученным в *E. coli*. Этот антиген содержит аминокислоты со 107 по 242 CD37 с 6xHis-меткой, добавленной к 3'-концу для облегчения очистки (SEQ ID NO: 15). Иммунизацию рекомбинантным белком CD37 проводили посредством подкожной инъекции белка, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (CFA) или неполном адьюванте Фрейнда для стимуляции (Sigma) или адьюванте для мышей Magic mouse adjuvant (Creative Diagnostics). Как правило, мышей иммунизировали пять раз с интервалом в две недели до получения окончательной стимуляции посредством внутривенной инъекции иммунизирующего вещества за три дня до слияния. Всего было проведено 5 независимых слияний с использованием клеток селезенки, которые были получены от иммунизированных мышей Balb/c дикого типа и клеток мышинной миеломы P3X63Ag8.653 (клетки P3). Слияние клеток проводили с использованием инструмента для электрослияния ECM200 (BTX Harvard Apparatus) в соответствии со стандартными протоколами. Каждое слияние приводило к образованию более 1000 гибридом.

Антитела, продуцируемые этими гибридомами, подвергали скринингу и подтверждали с помощью ELISA с использованием различных рекомбинантных версий антигена CD37. hCD37-LEL содержит аминокислоты со 107 по 242 CD37 человека с 6xHis-меткой, добавленной к 3'-концу для облегчения очистки (SEQ ID NO: 15), и было получено в *E. coli*. hCD37-Fc-LAGA содержит аминокислоты со 107 по 235 CD37 человека с Fc-доменом IgG1 человека, добавленным к 3'-концу для облегчения очистки (SEQ ID NO: 17), и было получено в клетках НЕК-293Т. hCD37-ECD-Fc содержит аминокислоты со 107 по 235 CD37 человека с Fc-доменом IgG2a мыши, добавленным к 3'-концу для облегчения очистки (SEQ ID NO: 16), и было получено в клетках НЕК-293Т.

Для создания нативных условий рекомбинантные белки разводили непосредственно в 50 мМ натрий-бикарбонатном буфере для сорбции (Sigma-Aldrich). Для создания денатурирующих условий рекомбинантные белки инкубировали в 1% додецилсульфате натрия (ДСН) с 50 мМ дитиотреитолом (ДТТ) в течение 30 мин при 65°C с последующим инкубированием со 100 мМ иодацетамидом в течение 30 минут при комнатной температуре и затем разводили в 50 мМ натрий-бикарбонатном буфере для сорбции. Каждый рекомбинантный белок иммобилизовали в концентрации приблизительно 25-100 нг/лунку в планшетах для микротитрования путем инкубирования в течение ночи при 4°C.

Планшеты промывали один раз ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 и блокировали ФСБ с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Планшеты промывали три раза ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 и добавляли в планшеты супернатанты гибридом. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали три раза, как описано выше, и инкубировали с меченым ПХ

вторичным антителом козла к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, разведение 1:5000) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза, как описано выше, и обнаруживали связавшееся конъюгированное с ПХ антитело посредством добавления субстрата ПХ TMB (Bio-FX). Планшеты инкубировали в течение приблизительно 10 мин и затем развитие окрашивания останавливали добавлением останавливающего раствора (Bio-FX). Для каждого планшета измеряли поглощение при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра. Супернатант гибридомы от 1B11 обуславливал сильный положительный сигнал ELISA как в нативных, так и в денатурирующих условиях (см. фиг. 1А) и был выбран для субклонирования. Из клона 1B11 были получены два субклона: 1B11-2 и 1B11-20. Супернатант гибридомы от обоих субклонов обуславливал сильный положительный сигнал ELISA как в нативных, так и в денатурирующих условиях (см. фиг. 1В), и клон 1B11-2 был выбран для дополнительного анализа.

Пример 2. Определение характеристик антител к CD37 посредством ELISA.

Антитело из 1B11-2 очищали с использованием стандартной хроматографии на белке А. Для сравнения использовали антитело к CD37, реализуемое Leica Biosystems (код продукта NCL-CD37). Связывание антител к CD37 исследовали с помощью ELISA с рекомбинантными белками CD37 в качестве антигена. Каждый рекомбинантный белок иммобилизовали в концентрации приблизительно 25-100 нг/лунку в планшетах для микротитрования в натрий-бикарбонатном буфере для сорбции (Sigma-Aldrich) с использованием либо нативных, либо денатурирующих условий, как описано выше. Планшеты промывали один раз ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 и блокировали ФСБ с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Планшеты промывали три раза ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 и добавляли в планшеты очищенные антитела. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали три раза, как описано выше, и инкубировали с меченым ПХ вторичным антителом козла к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, разведение 1:5000) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза, как описано выше, и обнаруживали связавшееся конъюгированное с ПХ антитело посредством добавления субстрата ПХ (Bio-FX). Планшеты инкубировали в течение приблизительно 10 минут и затем развитие окрашивания останавливали добавлением останавливающего раствора (Bio-FX). Для каждого планшета измеряли поглощение при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра. Характерные результаты связывания с нативными hCD37-Fc-LAGA и hCD37-LEL приведены на фиг. 2. Антитело 1B11-2 связывается с обоими нативными белками CD37 со значительно улучшенной аффинностью по сравнению с NCL-CD37. Результаты связывания с денатурированным белком hCD37-LEL приведены на фиг. 3. Антитело 1B11-2 связывается с денатурированным белком hCD37-LEL со значительно улучшенной аффинностью по сравнению с NCL-CD37.

Пример 3. Определение характеристик эпитопа антигена.

Связывание антител к CD37 дополнительно исследовали с помощью ELISA с рекомбинантным белком CD37 hCD37-ECD-S2-Fc, используемым в качестве антигена в нативных условиях, как описано выше. (S2 относится ко второму сегменту большого внеклеточного домена CD37, содержащего аминокислоты со 138 по 176). Характерные результаты приведены на фиг. 4. hCD37-ECD-S2-Fc содержит аминокислоты со 107 по 109 и со 138 по 235 CD37 человека с Fc-доменом IgG2a мыши, добавленным к 3'-концу для облегчения очистки (SEQ ID NO: 18), и был получен в клетках HEK-293T. Антитело 1B11-2 не связывается с hCD37-ECD-S2-Fc, в то время как NCL-CD37 сохраняет способность к связыванию с этим фрагментом белка CD37. Похожие результаты наблюдали при анализе методом вестерн-блоттинга.

Пример 4. Иммуногистохимическая оценка антител к CD37 FFPE CD37 ИГХ.

Очищенное антитело из клона 1B11-2 анализировали и сравнивали с моноклональным антителом мыши NCL-CD37 (Leica) с помощью ИГХ. Анализ проводили с использованием автоматизированного приспособления для окрашивания Leica Bond RX и реагентов и условий, перечисленных в табл. 1.

Таблица 1

Реагенты для ИГХ и условия анализа

Стадия	Действие/Реагент (Vendor)	Время
Сушка	Температура: 60°C	30 минут
Депарафинизация	раствор Bond Dewax Solution (Leica), 100% этанол чистый для анализа (Arantik)	Установленное
Демаскировка антигена	раствор Bond Epitope Retrieval 1 (цитратный буфер на основе раствора с pH 6,0)	20 минут
Блокирование эндогенной пероксидазы	Пероксид (Leica)	5 минут
Исследуемый образец	полученные ImmunoGen, Inc. антитела в различных концентрациях, полученные разведением в растворе для разведения антител Leica Antibody Diluent	15 минут

Обнаружение	реагент Post Primary Regent (Leica)	8 минут
	Полимер (Leica)	8 минут
	Смешанный DAB (Leica)	10 минут
Контрастное окрашивание	Гематоксилин (Leica)	5 минут

Препараты, содержащие фиксированные в формалине и залитые парафином (FFPE) образцы клеток, нормальные ткани, биоптаты опухолей от пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой, биоптаты опухолей от пациентов с фолликулярной лимфомой и биоптаты опухолей от пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом/лимфомой из малых лимфоцитов высушивали при 60°C и депарафинизировали с использованием раствора Bond Dewax Solution и 100% этанола. Проводили высокотемпературную демаскировку эпитопа с использованием раствора Bond Epitope Retrieval 1 (цитратный буфер на основе раствора с pH 6,0) в течение 20 мин и блокировали эндогенную пероксидазу пероксидом в течение 5 минут. Препараты инкубировали с полученным ImmunoGen, Inc. антителом 1B11-2, антителом NCL-CD37 (клон CT1) (Leica/Novocastra) или контрольным антителом muIgG1 (Leica/Novocastra) в различных концентрациях в течение 15 мин. Связанные антитела обнаруживали путем инкубирования с системой обнаружения Leica Bond Refine. После нанесения антител препараты инкубировали с реагентом Post Primary Reagent (IgG кролика к IgG мыши) в течение 8 мин, полимером (полимер козла к IgG кролика) в течение 8 мин и DAB (3,3-диаминобензида тетрагидрохлорид) в течение 10 мин. Это обеспечивало сигнал коричневого цвета. Проводили контрастное окрашивание препаратов гематоксилином в течение 5 мин.

FFPE образцы нормальной ткани селезенки и миндалина получали из блоков тканей человека, полученных от Mercy Health Systems и Ardais Corporation, как указано ниже. FFPE образцы клеток получали из линий клеток Дауди и Ramos, поставляемых DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур), а линия клеток Намальвы была предоставлена Американской коллекцией тканевых культур. Препараты, содержащие срезы образцов, получали из FFPE блоков с использованием микротомы, установленного на 5 мкм, и заключали под положительно заряженные предметные стекла. Эти препараты оставляли для сушки на воздухе в течение ночи перед окрашиванием. Микропанели нормальных тканей человека были приобретены у Pantomics, а микропанели тканей неходжкинской лимфомы были приобретены у TriStar Technology Group LLC.

Таблица 2

FFPE исследуемые образцы

Тип ткани человека	Коммерческий источник
Нормальная селезенка (2)	Mercy Health Systems
Нормальная миндалина (3)	Mercy Health Systems (2) and Ardais Corporation (1)
Микропанель нормальных тканей	Pantomics
Микропанель тканей неходжкинской лимфомы	TriStar Technology Group LLC

Интенсивность окрашивания CD37 и структуру распределения оценивали по сравнению с контрольным окрашиванием IgG (неспецифического), а окрашивание 1B11-2 сравнивали с окрашиванием, наблюдаемым для моноклонального антитела мыши NCL-CD37 (Leica). Интенсивность оценивали по шкале от 0 до 3, где 0 = отсутствие окрашивания, 1 = слабое окрашивание, 2 = умеренное окрашивание и 3 = сильное окрашивание. Равномерность окрашивания оценивали как отрицательную (отсутствие положительно окрашенных клеток), фокальную (<25% окрашенных клеток), гетерогенную (25-75% окрашенных клеток) и гомогенную (>75% окрашенных клеток). Интенсивность окрашивания и шкалы оценки описаны ниже. Все окрашивания были оценены патологом, прошедшим профессиональную сертификацию.

Таблица 3

Интенсивность и равномерность окрашивания

Интенсивность (количество окрашивания мембран)		Равномерность (процент положительных клеток)	
0	Отрицательная	0	Отрицательная
1	Слабая	Фокальная	<25%
2	Умеренная	Гетерогенная (гетеро)	25-75%
3	Сильная	Гомогенная (гомо)	>75%

Валидация очищенного антитела 1B11-2 для FFPE CD37 ИГХ.

Очищенное антитело из клона 1B11-2, разбавленное до концентрации 8,4, 4,2 и 2,1 мкг/мл в раство-

ре для разведения антител Leica Antibody Diluent (забуференный трисом солевой раствор, поверхностно-активное вещество и стабилизатор белка с 0,35% ProClin™ 950) использовали для окрашивания CD37-положительных контрольных образцов (нормальной миндалины человека, клеток Дауди, клеток Ramos и клеток Намальвы). Антитело оценивали по специфичности к CD37, определяемой приемлемым окрашиванием мембраны и специфичностью в CD37-положительных образцах. Этот клон также сравнивали с МАТ мыши NCL-CD37 (клон СТ1), разбавленным до 4,2 мкг/мл в растворе для разведения антител Leica Antibody Diluent с использованием тех же CD37-положительных ткани и клеток человека. Антитело NCL-CD37 (Leica) обеспечивало приемлемое окрашивание мембран в каждом из CD37-положительных осадков клеток и приемлемое окрашивание мембран в зародышевых центрах и мантийных зонах ткани миндалин (и те, и другие положительны по CD37) наряду в некоторой степени с низким ядерным фоном и отсутствием окрашивания в межфолликулярной области миндалины (отрицательна по CD37). 1B11-2 демонстрировало приемлемое окрашивание мембран в CD37-положительных образцах и хорошую специфичность с дополнительным преимуществом в виде полного отсутствия окрашивания ядерного фона (см. фиг. 5 для сравнения изображений для 1B11-2 и МАТ мыши NCL-CD37 (Leica)). 1B11-2 обеспечивало окрашивание мембран со структурой, аналогичной той, которую наблюдали при применении моноклонального антитела мыши NCL-CD37 (Leica); однако это окрашивание мембран было более специфичным и более четким, чем получаемое при применении антитела NCL-CD37 (Leica). Также важно отметить, что 1B11-2 не приводило к окрашиванию в межфолликулярной области миндалины (отрицательна по экспрессии CD37), что демонстрирует повышенную специфичность. Для 1B11-2 была экспериментально определена подходящая для окрашивания концентрация, составляющая 4,2 мкг/мл.

1B11-2, разбавленное до концентрации 4,2 мкг/мл в растворе для разведения антител Leica Antibody Diluent, также использовали для окрашивания микропанели нормальных тканей человека (приобретенной у Pantomics) и тканей миндалины и селезенки человека для оценки специфичности. 1B11-2 снова сравнивали с моноклональным антителом мыши NCL-CD37 (Leica), разбавленным до концентрации 4,2 мкг/мл в растворе для разведения антител Leica Antibody Diluent, на тех же нормальных тканях миндалины и селезенки, а также микропанели нормальных тканей человека. В большинстве нормальных тканей (за исключением миндалины и селезенки) моноклональное антитело мыши NCL-CD37 (Leica) демонстрировало окрашивание только в рассеянных лимфоцитарных клетках, оставляя остальную часть тканей отрицательной. Наблюдали некоторое фоновое розовое окрашивание в цитоплазме клеток Панета тонкого кишечника и в островковых клетках поджелудочной железы (см. фиг. 6). Антитело NCL-CD37 (Leica) обеспечивало приемлемое окрашивание мембран в зародышевых центрах и мантийных зонах нормальной миндалины человека и в краевой зоне в нормальных тканях селезенки человека, хотя и с некоторым низкоуровневым ядерным фоном. Отсутствовало окрашивание в межфолликулярной области миндалины или красной пульпе селезенки при применении антитела NCL-CD37 (Leica). 1B11-2 демонстрировало приемлемое окрашивание мембран в зародышевых центрах и мантийных зонах нормальной миндалины человека и в краевой зоне в нормальных тканях селезенки человека и окрашивание только в рассеянных лимфоцитах в оставшихся нормальных тканях без какого-либо фонового окрашивания (см. фиг. 6). Отсутствовало окрашивание в межфолликулярной области миндалины или красной пульпе селезенки. Эти результаты показывают, что 1B11-2 является предпочтительным с точки зрения чувствительности окрашивания, специфичности и пониженного фона, все из которых имеют решающее значение для высококачественного выполнения и анализа исследований методом ИГХ.

Пример 5. Оценка антитела 1B11-2 к CD37 с помощью ИГХ с использованием образцов опухолей человека.

Образцы опухолей человека, типичные для диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (n=52), фолликулярной лимфомы (n=20) и хронического лимфоцитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов (n=8) (все включены в микропанель тканей неходжкинской лимфомы, приобретенную у TriStar Technology Group LLC), оценивали в отношении экспрессии CD37 с помощью ИГХ с использованием антитела 1B11-2. Интенсивность окрашивания CD37 и распределение значений суммированы в табл. 4 ниже. На фиг. 7 показан пример окрашивания тканей диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и фолликулярной лимфомы с применением антитела 1B11-2. Эти результаты демонстрируют преимущества 1B11-2 в качестве более специфичного и чувствительного антитела для применения в исследованиях с помощью ИГХ для оценки экспрессии CD37 в тканях пациентов с неходжкинской лимфомой.

Таблица 4

Распределение значений (% положительных результатов)

ТИП ОПУХОЛИ:	ДИФFUЗНАЯ КРУПНОКЛЕТОЧНАЯ В-КЛЕТОЧНАЯ ЛИМФОМА n=52	ФОЛЛИКУЛЯРНАЯ ЛИМФОМА n=20	ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИМФОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ/ЛИМФОМА ИЗ МАЛЫХ ЛИМФОЦИТОВ n=8
Положительная (любая интенсивность):	96%	95%	100%
≥ уровня 2 интенсивность при окрашивании по меньшей мере 25% опухолевых клеток:	58%	35%	50%
≥ уровня 3 интенсивность при окрашивании по меньшей мере 25% опухолевых клеток:	60%	100%	100%

Антитело 1B11-2 и моноклональное антитело мыши NCL-CD37 (Leica) сравнивали с использованием микропанели тканей неходжкинской лимфомы (ТМА) (приобретенной у TriStar Technology Group LLC). При применении антитела NCL-CD37 в ИГХ анализе (анализ CD37) 27% образцов диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (14 из 52), 85% образцов фолликулярной лимфомы (17 из 20) и 37% образцов хронического лимфоцитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов (3 из 8) были отнесены к высшей категории (уровень 3 интенсивности окрашивания на по меньшей мере 25% опухолевых клеток, табл. 5). Напротив, антитело 1B11-2 в анализе ИГХ, описанном выше, с использованием набора Leica Bond Refine Detection Kit на автоматизированном приспособлении для окрашивания препаратов Leica Bond Rx обеспечивало окрашивание с повышенной чувствительностью и специфичностью 59% образцов диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (31 из 52), 95% образцов фолликулярной лимфомы (19 из 20) и 100% образцов хронического лимфоцитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов (8 из 8), обеспечивая окрашивание, которое было отнесено к высшей категории (уровень 3 интенсивности окрашивания на по меньшей мере 25% опухолевых клеток, табл. 5). Антитело 1B11-2 также позволяло обнаруживать экспрессию CD37 на низком уровне в трех образцах диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, тогда как антитело NCL-CD37 (Leica) не позволяло обнаружить этот низкий уровень экспрессии. Эти результаты показывают, что 1B11-2 является предпочтительным с точки зрения чувствительности и специфичности окрашивания и обеспечивает больший динамический диапазон окрашивания CD37.

Таблица 5

Сравнение распространенности CD37 в ТМА неходжкинской лимфомы

Значения	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (n=52)		Фолликулярная лимфома (n=20)		Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (n=8)	
	NCL-CD37	1B11-2	NCL-CD37	1B11-2	NCL-CD37	1B11-2
Положительное (любая интенсивность)	47 (90%)	50 (96%)	19 (95%)	19 (95%)	8 (100%)	8 (100%)
≥ уровня 1 интенсивность при окрашивании по меньшей мере 25% опухолевых клеток:	26 (50%)	11 (21%)	0	0	0	0
≥ уровня 2 интенсивность при окрашивании по меньшей мере 25% опухолевых клеток:	33 (63%)	30 (58%)	12 (60%)	7 (35%)	7 (88%)	4 (50%)
≥ уровня 3 интенсивность при окрашивании по меньшей мере 25% опухолевых клеток:	14 (27%)	31 (60%)	17 (85%)	19 (95%)	3 (38%)	8 (100%)

Пример 6. Картирование домена.

Картирование домена с помощью денатурирующего электрофореза в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга.

Способность распознавать различные препараты слитых с Fc CD37-ECD исследовали в денатурирующем электрофорезе в ДСН-ПААГ с последующим вестерн-блоттингом для 1B11-2 (левая панель) при прямом сравнении с поставляемым на рынок антителом к CD37 (Leica; правая панель). Препараты слитых с Fc CD37-ECD денатурировали путем инкубирования в буфере Лэммли (Laemmli), содержащем 70 мМ β-меркаптоэтанол, при 100°C в течение 10 мин и разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН, с последующим электрофоретическим переносом на мембраны из ПВДФ. Мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком в забуференном трисом солевом растворе с 0,1% Tween-20 (TBST) в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичные антитела применяли в течение ночи с последующим обнаружением с помощью вторичного F(ab)₂ к IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при комнатной температуре. Блоты проявляли с использованием усиленного обнаружения хемиллюминесценции после применения стандартных техник. Результаты показаны на фиг. 8. В то время как антитело Leica распознает все три препарата Fc-CD37 ECD, антитело 1B11-2 согласно настоящему изобретению распознает только hCD37-ECD-Fc и hCD37-Fc-LAGA, но не hCD37-ECD-S2-Fc. Конструкция hCD37-ECD-S2-Fc не содержит сегмента S1 (аминокислоты 110-137) CD37 ECD. Таким образом, область аминокислот 110-137 имеет критическое значение для распознавания эпитопа с применением 1B11-2, но не антитела Leica. Картирование домена с помощью нативного электрофореза в ПААГ и вестерн-блоттинга

Способность распознавать различные препараты слитых с Fc CD37-ECD исследовали в нативном электрофорезе в ПААГ с последующим вестерн-блоттингом для 1B11-2. Препараты слитых с Fc CD37-ECD загружали в буфер для образцов для нативного электрофореза и разделяли электрофорезом SDS в полиакриламидном геле с последующим электрофоретическим переносом на мембраны из ПВДФ или окрашиванием геля Кумасси бриллиантовым синим. Мембраны из ПВДФ блокировали 5% обезжиренным молоком в забуференном трисом солевом растворе с 0,1% Tween-20 (TBST) в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичное антитело применяли в течение ночи с последующим обнаружением с помощью вторичного F(ab)₂ к IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при комнатной температуре. Блот проявляли с использованием усиленного обнаружения хемиллюминесценции после применения стандартных техник. Результаты показаны на фиг. 9. В соответствии с данными денатурирующего электрофореза в ДСН-ПААГ (фиг. 8) и экспериментов ELISA (см. фиг. 4) антитело 1B11-2 согласно настоящему изобретению распознает только hCD37-ECD-Fc и hCD37-Fc-LAGA, но не hCD37-ECD-S2-Fc. Эти данные показывают, что сегмент S1 (аминокислоты 110-137) CD37 ECD или его часть имеет критическое значение для распознавания эпитопа 1B11-2 (левая панель фиг. 9). Окрашивание геля Кумасси бриллиантовым синим (правая панель фиг. 9) показывает, что белок hCD37-ECD-S2-Fc присутствовал в достаточных для обнаружения с применением 1B11-2 количествах.

Пример 7. Клонирование и секвенирование областей VL и VH антитела к CD37 человека.

Общее количество клеточной РНК получали из 5×10^6 клеток гибридомы против CD37 человека 1B11-2, описанной выше, с использованием набора RNeasy kit (QIAGEN) в соответствии с протоколом производителя. Затем синтезировали кДНК с первой цепи общей РНК с использованием набора для синтеза кДНК Superscript III (Invitrogen).

Процедуры ПЦР для амплификации кДНК варибельной области антитела, полученной из клеток гибридомы, были основаны на способах, описанных Wang et al. ((2000), J. Immunol. Methods. 233:167-77) и Co et al. ((1992), J. Immunol. 148:1149-54). Последовательности варибельной области легкой цепи (VL) и варибельной области тяжелой цепи (VH) амплифицировали с помощью вырожденных праймеров на 5'-конце и специфичных к константной области мышиного каппа или IgG1 праймеров на 3'-конце. Реакционные смеси после ПЦР затем подвергали электрофорезу в геле из 1% легкоплавкой агарозы, затем вырезали зоны ампликона от 300 до 400 п.о., которые затем очищали с использованием мини-колонок Zymo DNA. Очищенные ампликоны отправляли в Beckman Coulter Genomics для секвенирования с использованием тех же 5'- и 3'-праймеров реакций ПЦР для получения последовательности кДНК варибельной области в обоих направлениях.

Вырожденные праймеры, используемые для клонирования последовательностей кДНК VL и VH, изменяют 5'-конец, поэтому были необходимы дополнительные действия по секвенированию для проверки полных последовательностей кДНК варибельной области. Предварительные последовательности были введены в поисковый запрос сайта NCBI IgBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) для идентификации последовательностей мышиных зародышевых линий, из которых были получены последовательности антител. Праймеры для ПЦР затем были сконструированы таким образом, чтобы отжиг происходил на связанной с зародышевой линией лидерной последовательности мышиного антитела, чтобы эта новая реакция ПЦР приводила к полной последовательности кДНК варибельной области, не измененной праймерами для ПЦР. Реакции ПЦР, очистку зон и секвенирование выполняли, как описано выше. Последовательности кДНК варибельных областей, полученные для антитела к CD37 человека, объединяли

с последовательностями константных областей зародышевой линии, чтобы получить последовательности кДНК полноразмерного антитела. Молекулярные массы тяжелой и легкой цепей затем вычисляли с помощью трансляций последовательностей кДНК и сравнивали с молекулярными массами, полученными анализом методом LC/MS очищенного мышинного антитела к CD37 человека. Наблюдаемые молекулярные массы для легкой и тяжелой цепей мышинного 1B11-2 соответствовали ожидаемым значениям, подтверждая правильность последовательностей кДНК.

Последовательности CDR VH и VL приведены в табл. 1 и 2 соответственно. Последовательности VH и VL приведены в табл. 3 и 4 соответственно. Полноразмерные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи приведены в табл. 5 и 6 соответственно. Полинуклеотидные последовательности VH и VL приведены в табл. 8.

Все публикации, патенты, заявки на патенты, интернет-сайты и номера доступа/последовательности баз данных (включая как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности), цитируемые в настоящем описании, настоящим включены посредством ссылки во всей их полноте во всех отношениях в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент, интернет-сайт или номер доступа/последовательности баз данных была конкретно и индивидуально обозначена как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, которые специфично связываются с CD37, где указанные антитело или его фрагмент содержат последовательности VH CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 3-5 и последовательности VL CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 6-8 соответственно.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, где указанное антитело или его фрагмент содержат полипептидные последовательности, содержащие аминокислоты последовательностей SEQ ID NO: 9 и/или 10.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело мыши или его антигенсвязывающий фрагмент, гуманизированное, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой полноразмерное антитело.

5. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, который выбран из группы, содержащей Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv или scFv, стабилизированный дисульфидной связью Fv, интраантитело, IgGACH₂, мини-антитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, DVD-Ig, mAb₂, (scFv)₂ и scFv-Fc.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-5, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечены меткой с возможностью обнаружения.

7. Способ обнаружения экспрессии CD37 в образце *in vitro*, включающий приведение указанного образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом указанного антитела по любому из пп.1-6, и определение уровня экспрессии CD37 в указанном образце.

8. Способ по п.7, где экспрессию CD37 определяют с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа, радиоиммуноанализа, вестерн-блоттинга, цитометрии, иммунофлуоресцентного анализа, иммуноферментного анализа, иммунопреципитационного анализа или хемилюминесцентного анализа.

9. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-6 в способе лечения пациента, имеющего рак, путем введения терапевтически активного агента, представляющего собой конъюгат антитело-майтаниноид, включающий антитело к CD37, которое содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 29, причем указанное применение включает обнаружение повышенной экспрессии CD37 в образце рака от указанного пациента.

10. Применение по п.9, где указанное обнаружение осуществляют методом иммуногистохимии (ИГХ).

11. Применение по любому из пп.9 или 10, где указанный рак представляет собой лейкоз или лимфому.

12. Применение по любому из пп.9 или 10, где указанный рак выбран из группы, состоящей из В-клеточных лимфом, неходжкинской лимфомы (НХЛ), В-клеточного лимфобластного лейкоза/лимфомы из клеток-предшественников и новообразований из зрелых В-клеток, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ)/лимфомы из малых лимфоцитов (ЛМЛ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмочитарной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (МКЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), ФЛ низкой степени злокачественности, средней степени злокачественности и высокой степени злокачественности, кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, MALT-типа В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, узлового типа В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, В-клеточной лим-

фомы из клеток маргинальной зоны селезенки, волосатоклеточного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, плазмоцитомы, плазмноклеточной миеломы, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, макроглобулинемии Вальденстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы (АККЛ).

13. Применение по п.12, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

14. Применение по п.9, где терапевтически активный агент содержит майтанзиноид DM1 и нерасщепляемый N-сукцинимидил-4-(maleimidometil)циклогексанкарбоксилатный (SMCC) линкер, и при этом указанное антитело к CD37 содержит полноразмерную тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30, и полноразмерную легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 31.

15. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-6 для обнаружения экспрессии CD37 в образце рака от пациента.

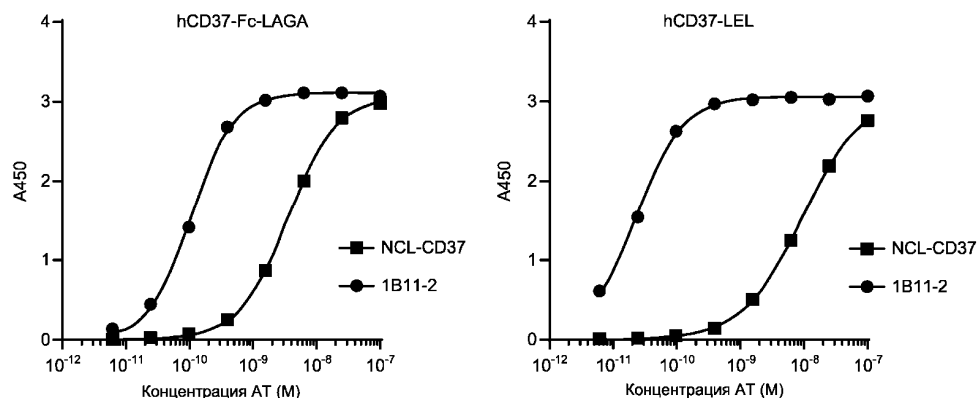
16. Применение по п.15, отличающееся тем, что, в случае если обнаружена повышенная экспрессия CD37 в образце рака от указанного пациента, указанное применение дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-майтанзиноид, включающего антитело к CD37, которое содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 29, указанному пациенту.

Антитело	Концентрация	hCD37-Fc-LAGA		hCD37-ECD-Fc		hCD37-LEL	
		нативное	денатурированное	нативное	денатурированное	нативное	денатурированное
1B11	супернатант	3,0	3,1	3,0	3,1	3,0	1,7
Leica NCL-CD37	10 мг/мл	2,8	3,2	2,7	3,1	3,0	2,8
	5 мг/мл	2,6	3,1	2,4	3,1	3,0	2,0
	2,5 мг/мл	2,4	3,1	2,2	3,1	3,0	1,8

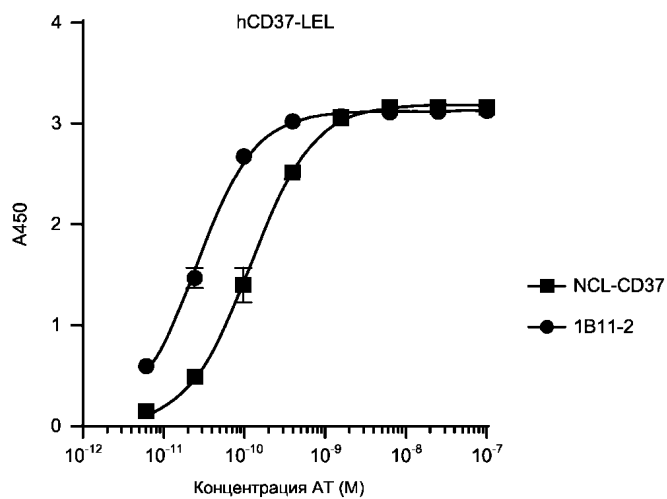
Фиг. 1А

Антитело	Концентрация	hCD37-Fc-LAGA		hCD37-LEL	
		Нативное	Денатурир.-Восстановл.	Нативное	Денатурир.-Восстановл.
1B11-2	супернатант	3,3	3,3	3,2	3,3
1B11-20	супернатант	3,2	3,2	3,2	3,2
Leica NCL-CD37	10 мг/мл	2,9	3,3	2,7	3,3
	5 мг/мл	2,5	3,2	2,4	3,2
	2,5 мг/мл	2,1	3,2	2,0	3,2

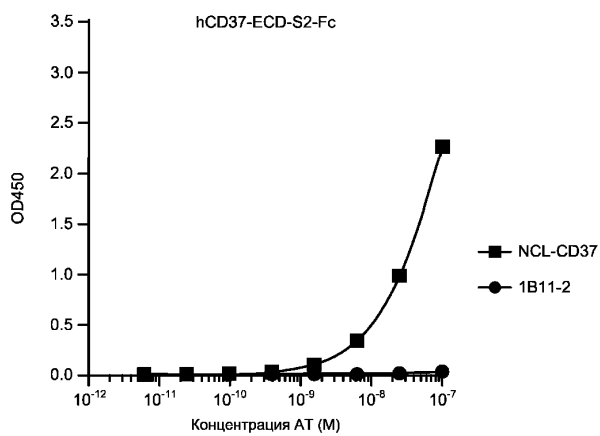
Фиг. 1В



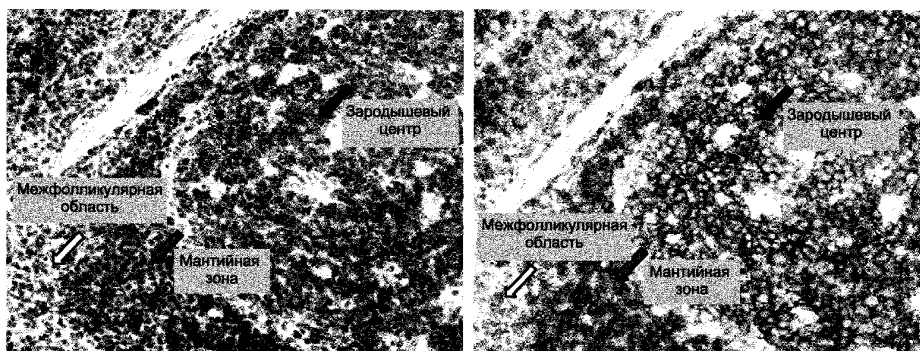
Фиг. 2



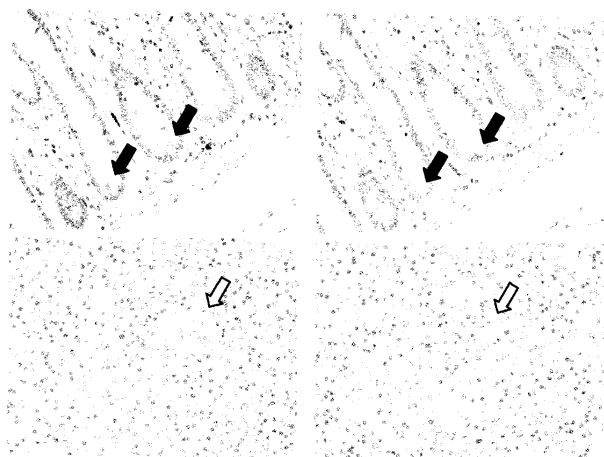
Фиг. 3



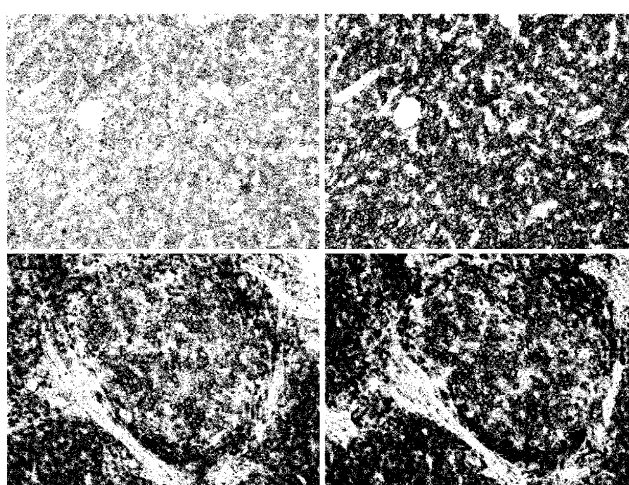
Фиг. 4



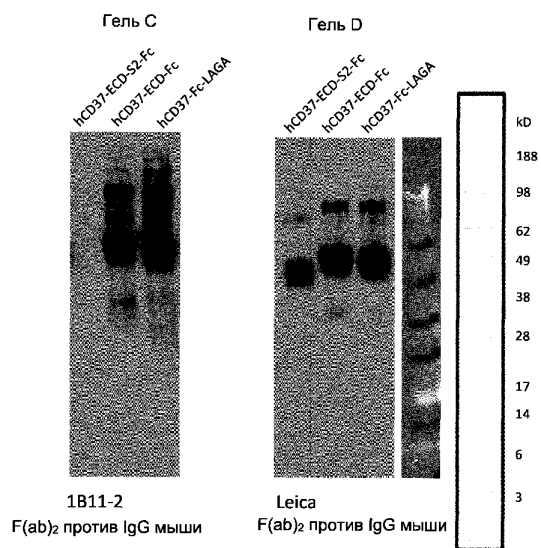
Фиг. 5



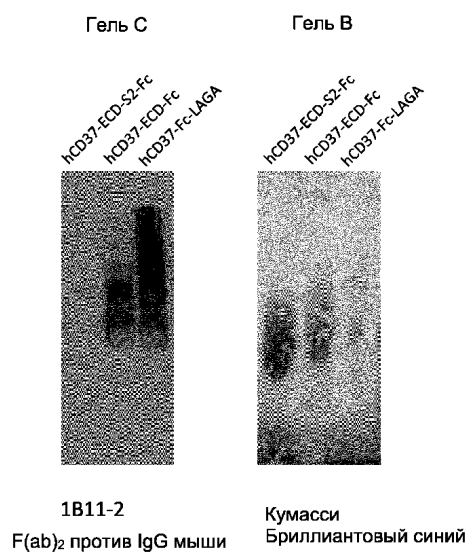
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

