

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045548**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.05**

(21) Номер заявки  
**201891299**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.01.06**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К CD9**(31) **16150698.5**(32) **2016.01.08**(33) **EP**(43) **2019.01.31**(86) **PCT/NL2017/050003**(87) **WO 2017/119811 2017.07.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КЛИНГ БИОТЕРАПЬЮТИКС Б.В.  
(NL)**

(72) Изобретатель:  
**Спитс Херген, Ван Хельден Паула  
Мария Вильгельмина, Шотте Ремко,  
Пос Ваутер, Фатмавати Кристиен, Го  
Данил Михил, Вагнер Кун, Виллауди  
Юлин Христиан (NL)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) **WO-A1-2009157623**

**MENENDEZ J. ET AL.:** "506 POSTER  
The apogenic anti-CD9 antibody, AR40A746.2.3,  
inhibits tumor growth in breast and pancreatic cancer  
and targets cancer stem cells in acute myeloid  
leukemia", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER.  
SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB,  
vol. 6, no. 12, 1 October 2008 (2008-10-01),  
page 161, XP025534570, ISSN: 1359-6349,  
DOI: 10.1016/51359-6349(08)72440-6 [retrieved on  
2008-10-01], abstract

**MENENDEZ J. ET AL.:** "Anti-CD9  
antibody, AR40A746.2.3, inhibits tumor growth  
in pancreatic and breast cancer models and  
recognizes CD9 on CD34+CD38- leukemic  
cancer stem cells", AMERICAN ASSOCIATION  
FOR CANCER RESEARCH. PROCEEDINGS  
OF THE ANNUAL MEETING; [CANCER  
RESEARCH; APRIL 2004, VOLUME 64, ISSUE  
7, SUPPLEMENT], AMERICAN ASSOCIATION  
FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 49, 12 April  
2008 (2008-04-12), page 949, XP001525541, ISSN:  
0197-016X, abstract

EP-A1-2803673

WO-A1-2010054007

WO-A2-2008084410

(57) Изобретение относится к областям биологии, иммунологии и медицины. Предложено антитело или его функциональный участок, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, VI72 и L173 последовательности CD9, и которое(ый) содержит последовательности CDR которые имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностями DYAMH, GISWNSGSIVYADSVKKG, AVSGYYPYFDY, KSSQSVLYSSNNKNYLG, WASTRES и QQYYTTP. Также антитело относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность варибельной области тяжелой цепи и/или последовательность варибельной области легкой цепи указанного антитела или его функционального участка, вектору и клетке для экспрессии указанного антитела или функционального фрагмента, композиции и набору для предотвращения и/или лечения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9. Дополнительно предложены другие варианты применения антитела или его фрагмента согласно изобретению, содержащие их продукты и способы, в которых они используются.

**045548 B1****045548 B1**

### **Изобретение относится к областям биологии, иммунологии и медицины.**

Причиной меланомы являются злокачественные меланоциты. Она главным образом формируется под воздействием ультрафиолетового излучения. Из всех различных типов рака кожи злокачественная меланома характеризуется самым высоким уровнем смертности. По оценкам, в 2012 г. в мире от метастатической меланомы умерло около 55 000 человек, и это число ежегодно неизменно растет. Если метастазирование еще не произошло, большинство пациентов можно излечить удалением меланомы. Пациенты с метастазирующей меланомой получают химиотерапию, радиационную терапию и/или разработанную недавно иммунотерапию, например адоптивную Т-клеточную терапию или так называемые антитела ингибитора контрольных точек. Такие новые подходы к иммунотерапии однозначно показывают, что иммунная система в состоянии распознавать и атаковать опухолевые клетки меланомы. При этом частота ответа на такие способы лечения составляет менее 50%, а 5-летние уровни выживаемости составляют около 30%. Поэтому существует острая потребность в дополнительных вариантах лечения. В настоящем изобретении предлагаются средства и способы противодействия, профилактики и/или диагностирования меланомы и других заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается полученное от пациента человеческое антитело, которое специфично к CD9. Важно, что такое антитело получено на поздней IV стадии меланомы в состоянии полной ремиссии после иммунотерапии от пациента, который по-прежнему жив и чувствует себя хорошо через 10 лет после лечения. Человеческое антитело с кодовым номером AT14-012 в состоянии связываться с содержащими CD9 клетками, например с клетками меланомы, карциномы поджелудочной железы, карциномы пищевода и карциномы толстой кишки.

Трансмембранный белок CD9, также, помимо прочего, называемый MRP-1, MIC3, DRAP-27 и TSPAN-29, представляет собой тетраспанин с молекулярной массой около 23-27 кДа. Он повсеместно присутствует на поверхности многих видов клеток, включая меланоциты, эндотелиальные клетки, определенные типы нервных клеток, мышечноскелетные клетки и определенные типы иммунных клеток. CD9 также присутствует на поверхности тромбоцитов. CD9 включает четыре трансмембранных домена, небольшую внутриклеточную петлю и две внеклеточных петли, которые называют доменом EC1 и доменом EC2 (фиг. 1). CD9 взаимодействует с множеством других белков, например, с наиболее важными интегринами (интегрин бета-1), белками EWI (EWI-2 и EWI-F), CD81, CD63 и EGFR. Среди прочего, CD9 играет роль в адгезии, пролиферации и миграции клеток, включая пролиферацию опухоли и метастазирование. В связи с наличием CD9 на клеточной поверхности многих видов клеток, включая тромбоциты, существует опасность неблагоприятных побочных эффектов для известных в настоящее время специфических к CD9 антител. Действительно, в работе Kawakatsu et al. 1993 описано, что эффекты агрегации тромбоцитов антител к CD9 вызывали летальный тромбоз в модели приматов. Обезьяны, которым вводили антитела к CD9, погибали от легочного тромбоза в течение 5 мин. Такое наблюдение подтверждается примерами настоящей заявки: известное антитело к CD9 ALB6 индуцирует активную агрегацию тромбоцитов (пример 3). Несмотря на то, что в прошлом было разработано и описано множество антител к CD9, вследствие упомянутого тяжелого побочного эффекта ни одно из таких известных антител к CD9 до настоящего времени не доходило до этапа клинических испытаний.

Тем не менее, как показано в примерах, интересно, что антитело AT14-012 отличается более высокой аффинностью связывания с клетками меланомы по сравнению с первичными меланоцитами. Кроме того, AT14-012 обладает более высокой активностью связывания с клетками карциномы толстой кишки по сравнению с первичными эпителиальными клетками толстой кишки. Более того, AT14-012 связывает несколько первичных бластов ОМЛ и клеточные линии множественной миеломы, при этом проявляя лишь слабую реакционную способность в отношении первичных клеток миндалин человека. Примеры показывают, что антитело AT14-012 предпочтительно связывается с кластерами CD9 в отличие от связывания с мономерным CD9. Известно, что образование гомокластеров CD9 стимулируется пальмитилированием CD9, и что уровни гомокластеров CD9 повышаются на первичных опухолевых клетках и, в частности, на метастатических опухолевых клетках (Yang et al., 2006). Таким образом, предпочтительное связывание AT14-012 может подкреплять вывод от том, что антитело AT14-012 обладает более высокой аффинностью связывания с несколькими опухолевыми клетками по сравнению с экспрессирующими CD9 неопухолевыми клетками. Кроме того, мультимеризация AT14-012 в результате связывания с кластерами CD9 может приводить в действие механизм, специфически ингибирующий рост опухоли или распространение заболевания.

Важно отметить, что несмотря на то, что известные в настоящее время специфические к CD9 антитела, такие как, например, ALB6, являются, как описано выше, причиной серьезного побочного эффекта агрегации тромбоцитов, а потому связаны с риском тромбоза как побочного эффекта, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что антитело AT14-012 и несколько вариантов AT14-012, которые связываются с одинаковым уникальным эпитопом, не вызывают никакой поддающейся регистрации агрегации тромбоцитов *in vitro*. Несмотря на то, что AT14-012 и такие варианты связываются с тромбоцитами и даже незначительно активируют их, агрегация не наблюдалась. Это является важным преимуществом AT14-012 и таких вариантов по сравнению с известными в настоящее время специфическими к CD9 антителами, поскольку риск тромбоза значительно снижается. Действительно, у страдающего мела-

номой пациента, от которого было получено АТ14-012, не наблюдалось никаких признаков тромбоза. В действительности, у этого больного меланомой пациента не отмечалось никаких признаков неблагоприятных побочных эффектов, вызванных проводимой для него иммунотерапией, даже витилиго-заболевания кожи, приводящего к разрушению пигмента.

В свете приведенных выше характеристик антитела АТ14-012 или его функциональный участок или функциональный эквивалент, или его варианты, обладающие такой же специфичностью связывания, являются привлекательными кандидатами для противодействия, предотвращения и/или обнаружения нарушений, связанных с экспрессирующими CD9 клетками, например клетками меланомы. Терапевтическая эффективность уже очевидна исходя из того, что данное антитело было получено от больного меланомой пациента, который достиг стадии полной ремиссии и продемонстрировал продолжительную выживаемость после заболевания меланомой. Более того, как показано в примерах, АТ14-012 связывается с клетками меланомы, карциномы поджелудочной железы, карциномы пищевода и карциномы толстой кишки, несколькими бластами ОМЛ и некоторыми клеточными линиями множественной миеломы. Более того, примеры продемонстрировали, что АТ14-012 в значительной мере противодействует росту опухолей и развитию метастазов *in vivo* в мышинной модели меланомы. Поэтому антитело АТ14-012, а также его функциональные участки и его функциональные эквиваленты с такой же специфичностью связывания, и другие связывающие соединения, которые обладают специфичностью к тому же эпитопу, что и АТ14-012, и/или конкурируют с АТ14-012 за связывание с тем же эпитопом CD9, в особенности подходят для обнаружения и/или предотвращения заболеваний, которые связаны с содержащими CD9 клетками, таких как, например, CD9-положительные опухоли, остеопороз, артрит, воспаление легких, ХОЗЛ, колит, болезнь Альцгеймера и нарушения, связанные с врожденными лимфоидными клетками. Более того, поскольку CD9 также экспрессируется на внеклеточных везикулах, подобные везикулы также представляют собой интересные мишени для антитела АТ14-012 или перечисленных выше связывающих соединений.

Как показано в примерах, антитело АТ14-012 связывается с эпитопом CD9, который находится в области m4. ЭТОТ ЭПИТОП включает по меньшей мере аминокислоты CD9, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В частности, было показано, что АТ14-012 связывается с аминокислотами K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

Специфические антитела к CD9 известны в данной области техники. Вместе с тем такие антитела часто не являются человеческими и распознают другой эпитоп. Описанные человеческие антитела получены из искусственных библиотек со случайным образованием пар тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. АТ14-012, напротив, было получено от пациента-человека с естественным парным взаимодействием тяжелой и легкой цепей. Например, в международной патентной заявке WO 2009/157623 описано антитело 10E4, полученное из человеческой библиотеки фагового дисплея, которое связывается с аминокислотными положениями 186-191 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

В WO 2014/145940 описаны мышинные специфические к CD9 моноклональные антитела Z9.1 и Z9.2, которые демонстрируют связывание с аминокислотными положениями 112-191 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, а в WO 2013/099925 описано мышинное антитело CD9-12A12, которое связывается с аминокислотными положениями 112-194 последовательности CD9, как описано на фиг. 2.

В WO 2004/007685 рассматривается антитело mAb7, связывающее аминокислотную последовательность PKKDV, которая присутствует в аминокислотных положениях 167-171 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

В WO 95/033823 рассматривается мышинное моноклональное антитело ES5.2D8, которое связывает последовательность GLWLRFD в CD9. Такая последовательность располагается между аминокислотными положениями 31 и 37 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

Европейский патент EP 0508417 истребует приоритет по мышинным антителам к аминокислотным последовательностям CD9, которые выбирают из аминокислотных положений 35-60, 113-142, 131-166 и 163-191 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

К другим специфическим к CD9 антителам, известным в данной области, относятся мышинные антитела ALB6 и H19a. Как показано в примерах, такие мышинные антитела также связываются с другим эпитопом, в отличие от АТ14-012. Например, АТ14-012 в значительной мере связывается с аминокислотами CD9 K169, D171, V172, L173 и F176, как показано на фиг. 2, тогда как ALB6 не демонстрирует существенного связывания с перечисленными аминокислотными остатками. Кроме того, как показано в примерах, антитело АТ14-012 в состоянии связываться с мутантом CD9 (мутантом m1), в котором остатки 112-134 CD9 (нумерация соответствует приведенной на фиг. 2) заменены соответствующей областью CD81, тогда как антитела ALB6 и H19a не в состоянии связываться с данным мутантом. Дополнительно, H19a в состоянии связываться с мутантом m4 (в котором остатки 168-180 CD9 заменены соответствующей областью CD81), тогда как АТ14-012 не связывается с таким мутантом m4. Наконец, примеры показывают, что антитело ALB6 связывается с аминокислотами Q161 в m3 и F176 в m4. Таким образом, ALB6 и H19a связываются с другим эпитопом, в отличие от АТ14-012.

В примерах дополнительно показано, что реакционная способность АТ14-012 ограничивается при-

матами, и связывание с тромбоцитами мыши и кролика, экспрессирующими CD9, не наблюдалось. Это подтверждает уникальный характер эпитопа в CD9, который связывает AT14-012 по сравнению с, например, мышинными антителами ALB6 и H19a, которые, напротив, связывают мышинный CD9.

В заключение следует отметить, что в настоящем изобретении предлагается новое человеческое специфическое к CD9 антитело, которое специфично по отношению к новому эпитопу CD9.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) является специфичным к (то есть способным специфически связываться) по меньшей мере 6 аминокислотам, расположенным в аминокислотных положениях 154-181 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Предпочтительно упомянутое антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент является специфичным к по меньшей мере 6 аминокислотам, расположенным в аминокислотных положениях 168-181 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Также предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) является специфичным к (то есть способным специфически связываться) по меньшей мере 5 аминокислотам, расположенным в аминокислотных положениях 168-181 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, при этом упомянутый эпитоп включает по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислот K169, D171, V172, L173 и T175 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, при этом упомянутый эпитоп включает по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислот K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением предпочтительно также в состоянии специфически связываться с аминокислотой F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, при этом упомянутый эпитоп включает по меньшей мере два аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислот K169, D171, V172, L173, T175 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент является специфичным к эпитопу CD9, при этом упомянутый эпитоп включает по меньшей мере три, или по меньшей мере четыре, или по меньшей мере пять аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислот K169, D171, V172, L173, T175 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Упомянутый эпитоп предпочтительно включает по меньшей мере три, четыре или пять аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислот K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В предпочтительных вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, содержащему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, содержащему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

При использовании в настоящем документе термин "последовательность CD9, как показано на фиг. 2", означает аминокислотную последовательность человеческого белка CD9, показанную на фиг. 2 (номер UniProt P21926; номер доступа в Genbank NP-001760).

При использовании в настоящем документе выражения "расположенные в аминокислотных положениях CD9 X и Y, как показано на фиг. 2" и "расположенные в аминокислотных положениях X и Y последовательности CD9, как показано на фиг. 2" включают последовательности, которые расположены между упомянутыми положениями и которые включают аминокислоту(ы) в положении X и/или Y. Кроме того, термин включает последовательности, которые расположены между упомянутыми положениями и которые не содержат аминокислоту(ы) в положениях X и/или Y.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к иммуноглобулиновому белку, содержащему по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи (VH) в сочетании с вариабельной областью легкой цепи (VL), который специфичен к эпитопу мишени.

В настоящем документе "функциональный участок антитела" определяется как участок, который обладает по меньшей мере одним общим свойством с упомянутым антителом с такой же природой, но необязательно в таких же масштабах. Упомянутый функциональный участок всостоянии связываться с тем же антигеном, что и упомянутое антитело, но необязательно с такой же степенью связывания. В од-

ном варианте осуществления функциональный участок антитела содержит по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи (VH). Не имеющими ограничительного характера примерами функционального участка антитела являются однодоменное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело, унитело, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), фрагмент Fd, Fab-фрагмент и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент.

В настоящем документе "функциональный эквивалент антитела" определяется как искусственное связывающее соединение, содержащее по меньшей мере одну последовательность определяющей комплементарности области (CDR) антитела, предпочтительно последовательность CDR3 тяжелой цепи. Упомянутый функциональный эквивалент предпочтительно включает последовательность CDR3 тяжелой цепи антитела, а также последовательность CDR3 легкой цепи упомянутого антитела. Упомянутый функциональный эквивалент более предпочтительно включает последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела, а также последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи упомянутого антитела. Функциональный эквивалент антитела, например, получают путем изменения антитела таким образом, что по меньшей мере антигенсвязывающее свойство полученного соединения по существу является таким же по своей природе, но необязательно в таких же масштабах. Это осуществляют различными способами, например посредством консервативной замены аминокислот, при этом аминокислотный остаток заменяют другим остатком с по существу аналогичными свойствами (размер, гидрофобность и т.д.) таким образом, что функционирование антитела в целом по существу не затрагивается.

Как хорошо известно специалисту в области, тяжелая цепь антитела является наибольшей из двух типов цепей, образующих молекулу иммуноглобулина. Тяжелая цепь включает константный домен и переменный домен, причем переменный домен участвует в связывании антигена. Легкая цепь антитела представляет собой меньший из двух типов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Легкая цепь содержит константный домен и переменный домен. Переменный домен часто, но не во всех случаях, задействован в связывании антигена вместе с переменным доменом тяжелой цепи.

Участки, определяющие комплементарность (CDR), представляют собой гиперпеременные области, расположенные в переменных доменах тяжелой цепи и переменных доменах легкой цепи. В случае полных антител CDR 1-3 тяжелой цепи и CDR 1-3 связанной легкой цепи вместе образуют антигенсвязывающий сайт.

Используемый в настоящем документе термин "антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением" также называется "связывающим соединением в соответствии с изобретением".

Термины "специфичный к", "способный специфически связываться" и "в состоянии специфически связываться" в настоящем документе используются взаимозаменяемо и относятся к взаимодействию между антителом или его функциональным участком или функциональным эквивалентом с его эпитопом. Это означает, что упомянутое антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент предпочтительно связываются с упомянутым эпитопом в отличие от других антигенов или аминокислотных последовательностей. Таким образом, несмотря на то что антитело, функциональный участок или эквивалент в состоянии неспецифически связываться с другими антигенами или аминокислотными последовательностями, аффинность связывания упомянутого антитела или функционального участка, или функционального эквивалента для его эпитопа значительно выше, чем аффинность неспецифического связывания упомянутого антитела или функционального участка, или функционального эквивалента для других антигенов или аминокислотных последовательностей.

Антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, которое(ый) в состоянии связываться с конкретным эпитопом CD9, может также являться специфичным к другим не содержащим CD9 клеткам, если упомянутый эпитоп CD9 присутствует в другом белке. В этом случае антитело, называемое в настоящем документе специфичным к CD9, также является специфическим к таким другим белкам, содержащим такой же эпитоп.

"Аффинностью связывания" называют прочность полной суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента и его партнером связывания (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1 : 1 между участниками пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность по существу может определяться равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ), которая рассчитывается как отношение  $k_a$  к  $k_d$ , см., например, работу Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Аффинность может быть измерена с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как, например, анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например с помощью оборудования BiaCore (GE Healthcare) или IBIS-iSPR в IBIS Technologies BV (г. Хенгело, Нидерланды), или посредством анализа растворенной фазы, например Kipexa.

Процент идентичности аминокислотной или нуклеотидной последовательности или термин "% идентичности последовательности" в настоящем документе определяется как процент остатков в аминокислотной или нуклеотидной последовательности кандидата, идентичных остаткам сопоставляемой последовательности после выравнивания двух последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности. Способы и компьютерные программы для

выравнивания хорошо известны в данной области, например "Align 2".

Антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением предпочтительно в состоянии связываться с клетками меланомы, клетками карциномы толстой кишки, клетками карциномы поджелудочной железы и клетками карциномы пищевода. Такое связывающее соединение пригодно для противодействия различным формам рака, а потому отличается широкими возможностями применения. Предпочтительна специфичность по меньшей мере к меланоме.

В некоторых вариантах осуществления антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением представляет собой человеческое антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент. Наличие человеческих аминокислотных последовательностей снижает вероятность неблагоприятных побочных эффектов в ходе терапевтического применения для пациентов-людей, в отличие от мышиных или гуманизированных антител, в которых не относящиеся к человеку последовательности CDR или вариабельной области, как правило, вызывают антимышиный иммунный ответ у реципиентов-людей.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, при этом упомянутое антитело представляет собой изотип IgG, предпочтительно IgG1 или IgG3. Это обеспечивает преимущества для медицинских применений у людей.

Предпочтительным антителом в соответствии с настоящим изобретением является антитело AT14-012. Такое антитело является предпочтительным, поскольку оно связывается по меньшей мере с клетками меланомы, карциномы поджелудочной железы, карциномы пищевода и карциномы толстой кишки, несколькими бластами ОМЛ и некоторыми клеточными линиями множественной миеломы. Более того, было показано, что AT14-012 противодействует метастазированию *in vivo*. Поэтому настоящее антитело в особенности подходит для противодействия заболеваниям, связанным с экспрессирующими CD9 клетками, таким как, например, рак с CD9-положительными опухолевыми клетками, например меланома. Интересно, что AT14-012 представляет собой изотип IgG3 и относится к семейству VH3-09.

Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела AT14-012 приведены в табл. 1 и на фиг. 3.

Используемый в настоящем документе термин "AT14-012" включает все антитела и их функциональные участки, и их функциональные эквиваленты, содержащие по меньшей мере последовательности CDR1-3 тяжелой цепи и легкой цепи, предпочтительно по меньшей мере последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела AT14-012. Такие антитела и функциональные участки, и функциональные эквиваленты, например, включают выделенные и/или очищенные антитела, рекомбинантные антитела и/или антитела, получаемые с использованием нуклеотидной последовательности AT14-012 с оптимизацией кодонов для продуцирующей клетки-хозяина, такой как, например, клетка CHO.

На основании последовательностей AT14-012, приведенных в табл. 1 и на фиг. 3, можно продуцировать антитело, или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое (-ый) содержит по меньшей мере одну последовательность CDR из AT14-012, которая специфична к CD9. Таким образом, предлагается выделенное, рекомбинантное и/или синтетическое антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое (-ый) включает по меньшей мере одну последовательность CDR антитела AT14-012, как показано в табл. 1 и на фиг. 3. Упомянутая по меньшей мере одна последовательность CDR предпочтительно включает по меньшей мере последовательность CDR3. Таким образом, дополнительно предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое (-ый) включает по меньшей мере последовательность CDR3 тяжелой цепи с последовательностью AVSGYYYPYFDY и последовательность CDR3 легкой цепи с последовательностью QQYYTTP. Предлагаются связывающие соединения, которые предпочтительно содержат по меньшей мере две CDR, более предпочтительно по меньшей мере три CDR антитела AT14-012. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две или три CDR тяжелой и легкой цепей антитела AT14-012 одновременно присутствуют в одном связывающем соединении в соответствии с изобретением. Связывающее соединение в соответствии с изобретением предпочтительно включает все три CDR тяжелой цепи и все три CDR легкой цепи антитела AT14-012.

Необязательно по меньшей мере одну из упомянутых последовательностей CDR оптимизируют, тем самым позволяя получать вариант связывающего соединения, предпочтительно с целью улучшения эффективности связывания, селективности и/или стабильности. Для этого, например, проводят процедуры мутагенеза, после которых предпочтительно исследуют стабильность и/или эффективность связывания соединений и отбирают наилучшее специфическое к CD9 связывающее соединение. Специалист в данной области может легко получать варианты, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR в соответствии с изобретением. Например, применяют консервативные аминокислотные замены. Примеры консервативной аминокислотной замены включают в себя замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток и замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, такую как замена аргинина на лизин,

глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамина на аспарагин. Предлагается антители, или функциональный участок, или функциональный эквивалент, которое(ый) предпочтительно включает последовательность CDR, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDR антитела AT14-012, чтобы сохранять или даже улучшать параметры связывания CD9. Поэтому варианты связывающих соединений, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDR антитела AT14-012, также входят в объем настоящего изобретения. Упомянутые связывающие соединения предпочтительно включают последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны последовательностям CDR 1-3 тяжелой и легкой цепи антитела AT14-012. Последовательности CDR таких вариантов предпочтительно отличаются не более чем на три, предпочтительно не более чем на две, предпочтительно не более чем на одну аминокислоту от исходных последовательностей CDR антитела AT14-012.

Кроме оптимизации последовательностей CDR, для повышения эффективности или стабильности связывания может быть оптимизирована по меньшей мере одна последовательность в по меньшей мере одной из каркасных областей. Такую процедуру предпочтительно проводят для повышения эффективности или стабильности связывания. Каркасные последовательности, например, оптимизируют посредством мутации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такую каркасную последовательность, после чего предпочтительно проводят исследование свойств полученного связывающего соединения. Такой подход позволяет получать улучшенные связывающие соединения. В предпочтительном варианте осуществления для каркасных областей в антителах в соответствии с изобретением используют последовательности зародышевой линии человека. Использование последовательностей зародышевой линии человека сводит к минимуму риск иммуногенности упомянутых антител, поскольку такие последовательности с меньшей вероятностью включают соматические изменения, уникальные для людей, от которых получены каркасные области, и могут вызывать иммуногенный ответ при введении другому человеку. Таким образом, дополнительно предлагается синтетическое или рекомбинантное антители или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, которое(ый) включает по меньшей мере одну мутацию в каркасной области по сравнению с каркасной областью AT14-012. Дополнительно или в альтернативном варианте осуществления предлагается синтетическое или рекомбинантное антители или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, которое(ый) включает по меньшей мере одну мутацию в константной области по сравнению с константной областью антитела AT14-012. Такое связывающее соединение по меньшей мере с одной мутацией по сравнению с AT14-012 не встречается в природе. Напротив, оно было получено искусственным путем. В одном варианте осуществления область Fc IgG3 антитела AT14-012 по меньшей мере частично замещают областью Fc IgG1. Как правило, при этом увеличивается стабильность и период полужизни получаемого иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления связывающее соединение в соответствии с настоящим изобретением включает человеческую переменную область. В некоторых вариантах осуществления упомянутое связывающее соединение включает человеческую константную область и человеческую переменную область. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанное связывающее соединение представляет собой человеческое антители. При терапевтическом применении у людей использование человеческих специфических к CD9 антител обладает преимуществами по сравнению с использованием не относящихся к человеку антител. Использование *in vivo* не относящихся к человеку антител для диагностики и/или лечения заболеваний человека осложняется рядом факторов. В частности, организм человека может распознавать не относящиеся к человеку антитела как чужеродные, что будет приводить к иммуногенному ответу на не относящиеся к человеку антитела, вызывающему неблагоприятные побочные эффекты и/или быстрое выведение антител из системы кровообращения. Использование человеческого антитела уменьшает вероятность побочных эффектов при введении человеку и часто обеспечивает более продолжительный период полужизни в системе кровообращения вследствие ограниченного выведения по сравнению с не относящимися к человеку антителами.

В некоторых вариантах осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением представляет собой химерное антители. В таком химерном антителе для связывающего соединения в соответствии с изобретением предлагаются рассматриваемые последовательности, такие как, например, рассматриваемый дополнительный сайт связывания.

Связывающие соединения в соответствии с изобретением предпочтительно представляют собой моноклональные антитела. Моноклональное антители представляет собой антители, состоящее из отдельных молекулярных частиц. Моноклональные антитела могут быть получены в больших количествах с помощью клеток, продуцирующих моноклональные антитела, или технологии рекомбинантной ДНК.

Таким образом, можно получать варианты связывающих соединений на основе антитела AT14-012 с использованием методик, известных в данной области, таких как, например, мутагенез. Как правило, допускаются отклонения в последовательности от 80 до 99% при сохранении специфичности к антигену. Таким образом, в одном варианте осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антители или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое (-ый) содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSFVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP. Упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент предпочтительно является специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано

на фиг. 2, более предпочтительно специфичным к эпитопу CD9, включающему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

Упомянутая идентичность последовательности предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Нумерация CDR и определение, используемые в настоящем документе, приводятся в соответствии с работой Kabat et al (1991), если не указано иное. Взаимное соответствие между различными системами нумерации, в том числе нумерацией Kabat, нумерацией ЕС и нумерацией IMGT, хорошо известно специалистам в области.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSFVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP. Упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент предпочтительно является специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, более предпочтительно специфичным к эпитопу CD9, включающему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSFVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 97% идентичности по-

следовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP. Упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент предпочтительно является специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, более предпочтительно специфичным к эпитопу CD9, включающему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

В примерах показано, что мутация в CDR1 тяжелой цепи и/или одна или две мутации в CDR3 тяжелой цепи, и/или мутация в CDR2 легкой цепи приводят к образованию антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело AT14-012, и которые обладают аффинностью связывания, равной или превышающей аффинность связывания AT14-012. Как дополнительно показано в примерах, важно, что варианты антитела AT14-012, которые включают такие мутации в CDR1 тяжелой цепи, и/или CDR3 тяжелой цепи, и/или CDR2 легкой цепи, также обладают свойством не вызывать агрегацию тромбоцитов, даже если такие варианты отличаются более высокой аффинностью к CD9 по сравнению с AT14-012. Таким образом, примеры показывают, что антитела, включающие последовательности CDR1 тяжелой цепи и/или CDR3 тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны последовательностям CDR1 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи и CDR2 легкой цепи антитела AT14-012, обладают такими же новыми и уникальными свойствами, в том числе специфичностью к новому эпитопу CD9 и отсутствием агрегации тромбоцитов, как и антитело AT14-012. Аффинность антитела AT14-012 не связана с отсутствием агрегации тромбоцитов, напротив, важнейшим свойством, связанным с отсутствием агрегации тромбоцитов, является распознавание уникального эпитопа на CD9.

Поэтому в одном варианте осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аминокислот K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и которое(ый) включает

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи QQYYTTP. Упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент предпочтительно является специфичным к эпитопу CD9, включающему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

Способы определения того, является ли антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, хорошо известны в данной области и, например, описаны в примерах, приведенных в настоящем документе. Действительно, в примерах показано, каким образом можно определять связывание с CD9, эпитопом CD9, который связан с антителом, а также аффинность антитела по отношению к CD9.

Примеры также показывают, что мутации в каркасных областях могут быть выполнены без влияния на специфичность связывания и аффинность и/или без воздействия на степень специфичности связывания и аффинности. Действительно, мутация T29N в каркасной области 1 тяжелой цепи, мутация L94P в каркасной области 3 легкой цепи и мутация L120V в каркасной области 4 легкой цепи (нумерация по IMGT) не оказывали заметного воздействия на связывание AT14-012 или на более эффективное связывание вариантов AT14-012, которые демонстрировали улучшенные параметры связывания по сравнению с AT14-012.

Как отмечалось выше, обычно можно изменять максимум 3 аминокислотных остатка в заданной последовательности CDR, сохраняя при этом неизменный характер активности связывания (по природе, но необязательно по масштабам). Таким образом, связывающее соединение в соответствии с изобретением предпочтительно содержит последовательности CDR1-3 тяжелой цепи и легкой цепи, при этом максимум 3, предпочтительно максимум 2, более предпочтительно максимум 1 аминокислота отличается (-ются) от последовательностей CDR1-3 тяжелой и легкой цепей антитела AT14-012. В некоторых вариан-





последовательность CDR1 легкой цепи с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и последовательность CDR2 легкой цепи с последовательностью WASIRES; и последовательность CDR3 легкой цепи с последовательностью QQYYTTP.

Особенно предпочтительное антитело содержит:

последовательность CDR1 тяжелой цепи с последовательностью DYAMY; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи с последовательностью GISWNSGSFVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи с последовательностью AVSGYFPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи с последовательностью QQYYTTP. Как показано в примерах, такое антитело имеет особенно высокую аффинность (см. фиг. 19B).

Связывающее соединение в соответствии с изобретением предпочтительно содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную последовательность легкой цепи антитела AT14-012, или вариабельные последовательности тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80% идентичны. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела AT14-012 также представлены в табл. 1 и на фиг. 3. Таким образом, дополнительно предлагается антителу, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, которое (-ый) включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA

DSVKGRFTISRDNANKSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGGILVTVSS,

и/или последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG

VPDRFSGSGGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQTRLEIK, или

последовательности, которые по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% или даже на 100% идентичны упомянутым выше последовательностям вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи AT14-012. В вариабельных областях тяжелой цепи и легкой цепи последовательности тяжелой цепи CDR1, CDR2 и CDR3 предпочтительно имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностями DYAMH (CDR1), GISWNSGSIVYADSVKG (CDR2) и AVSGYYPYFDY (CDR3), А ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностями KSSQSVLYSSNNKNYLG (CDR1), WASTRES (CDR2) и QQYYTTP (CDR3). Упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент предпочтительно является специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, более предпочтительно специфичным к эпитопу CD9, включающему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Чем выше процент идентичности, тем в большей степени связывающее соединение подобно антителу AT14-012. Связывающее соединение в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи антитела AT14-012, как показано в табл. 1 и на фиг. 3, или последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 86%, или по меньшей мере на 87%, или по меньшей мере на 88%, или по меньшей мере на 89%, или по меньшей мере на 90%, или 91%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 94%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 96%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны им.

Особенно предпочтительным является антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(-ый) является специфичным к эпитопу CD9, включающему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, предпочтительно специфичным по отношению к эпитопу CD9, включающему аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и которое(-ый) содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGGILVTVSS, или  
 EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGGILVTVSS, или  
 EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGGILVTVSS, или  
 EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGGILVTVSS, или  
 EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGGILVTVSS, или  
 EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYA  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGGILVTVSS,  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGGILVTVSS,

и/или последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIK,

при этом последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 предпочтительно имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностями KSSQSVLYSSNNKNYLG (CDR1), WASTRES (CDR2) и QQYYTTP (CDR3), более предпочтительно последовательность вариабельной области легкой цепи

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIK или  
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIK.

Как уже упоминалось выше, антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой изотип IgG, более предпочтительно IgG1 или IgG3, в связи со стабильностью такого иммуноглобулина *in vivo*. Кроме того, как показано в примерах, антитело AT14-012 в состоянии приводить в действие механизм комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) в опухолевых клетках, если антитело представляет собой основную цепь IgG3. Более того, мутация в концевой части Fc IgG (E345R, нумерация EC, как описано в работе Kabat 1991) вызывает гексамеризацию антитела при связывании с мишенью, размещение Clq на поверхности опухолевой клетки, и дополнительно индуцирует зависимую от концентрации гибель клеток посредством CDC (De Jong 2016). Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления антитело, функциональный участок или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением представляет собой изотип IgG3. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело, функциональный участок или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением представляет собой изотип IgG, предпочтительно IgG1 или IgG3, более предпочтительно IgG3, а также содержит аргинин в аминокислотном положении 345 (по нумерации EC).

Как показано в примерах, антитело AT14-012 в состоянии специфически связываться с аминокислотами K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Теперь, после того как эта информация стала известной, можно получать или конструировать связывающие соединения, которые конкурируют с AT14-012 за один и тот же эпитоп. Например, предлагается пептид CD9, содержащий по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 5 или 6 из упомянутых выше аминокислотных остатков, или пептид CD9, состоящий из по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 5 или 6 из упомянутых выше аминокислотных остатков, после чего проводится иммунизация не относящегося к человеку животного таким пептидом CD9 или содержащим такой пептид CD9 иммуногенным соединением, или молекулой нуклеиновой кислоты, или ее функциональным эквивалентом, кодирующим такой пептид CD9, предпочтительно с последующими одним или более стимулирующих введений. Затем от упомянутого не относящегося к человеку животного получают антитела, специфичные к CD9. В альтернативном варианте осуществления или дополнительно от указанного не относящегося к человеку животного получают специфические к CD9 В-клетки. Такие специфические к CD9 В-клетки особенно подходят для продукции специфических к CD9 антител. Специфические к CD9 В-клетки, полученные от упомянутого иммунизированного животного, используют, например, для продукции гибридом, из которых получают специфические к CD9 антитела. В других вариантах осуществления упомянутые специфические к CD9 В-клетки, полученные от упомянутого иммунизированного животного, трансдуцируют вместе с нуклеиновой кислотой Bcl-6 и с анти/апоптозной нуклеиновой кислотой, такой как, например, Bcl-xL или Mc1-1, и культивируют в течение продолжительного времени *ex vivo* в культурах В-клеток, как, например, описано в Европейском патенте № 1974017 и патенте США № 9127251. Таким способом получают долговременно реплицирующие культуры В-клеток, причем В-клетки одновременно

реплицируются и продуцируют антитело. В некоторых вариантах осуществления специфические к CD9 антитела, продуцируемые упомянутыми гибридами или такими культурами В-клеток, собирают и, например, используют для терапии против CD9, предпочтительно после гуманизации антител с целью уменьшения побочных эффектов. В некоторых вариантах осуществления исследуют конкуренцию связывания с CD9 антитела и/или В-клетки, полученных от упомянутого не относящегося к человеку животного, с антителом АТ14-012. Для этого, например, проводят инкубацию экспрессирующих CD9 клеток с упомянутым антителом или В-клетками, полученными от упомянутого не относящегося к человеку животного, с последующим добавлением антитела АТ14-012. В качестве контроля экспрессирующие CD9 клетки предпочтительно инкубируют с антителом АТ14-012 в отсутствие любого другого антитела или В-клеток. Если предварительная инкубация экспрессирующих CD9 клеток с антителом или В-клетками, полученными от упомянутого не относящегося к человеку животного, оказывает очевидное влияние на связывание АТ14-012 с упомянутыми клетками, делают вывод от том, что упомянутые антитело или В-клетки, полученные от упомянутого не относящегося к человеку животного, конкурируют с антителом АТ14-012 за связывание с CD9.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие переменный домен, специфических к CD9 В-клеток, полученных от упомянутого не относящегося к человеку животного, секвенируют, чтобы получать нуклеотидные последовательности специфических к CD9 переменных доменов, после чего одну или более молекул нуклеиновой кислоты таких последовательностей вводят в продуцирующие клетки, такие как, например, *E. coli*, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO (мышинной миеломы) или клетки 293(T), для продукции специфических к CD9 антител. Упомянутые одна или более нуклеотидных последовательностей предпочтительно являются кодон-оптимизированными для указанной продуцирующей клетки. Используемый в настоящем документе термин "кодон" означает триплет нуклеотидов (или их функциональных эквивалентов), который кодирует определенный аминокислотный остаток. Термин "кодон-оптимизированный" означает, что один или более кодонов из исходной нуклеотидной последовательности животного заменяют одним или более кодонами, которые предпочтительны для определенной продуцирующей клетки. Такие замещающие кодоны предпочтительно кодируют тот же аминокислотный остаток, что и исходный кодон животного, который был заменен.

В некоторых вариантах осуществления специфические к CD9 антитела, полученные от упомянутого не относящегося к человеку животного или от иммунных клеток упомянутого не относящегося к человеку животного, гуманизируют, а значит по меньшей мере часть аминокислотной последовательности животного, предпочтительно по меньшей мере часть или полные каркасные последовательности, заменяют человеческими последовательностями, чтобы уменьшать неблагоприятные побочные эффекты у людей.

Протоколы иммунизации животных, включая подходящие процедуры введения и вспомогательные вещества, процедуры получения и очистки антител и/или иммунных клеток от таких иммунизированных животных, эксперименты по конкуренции и процедуры гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны в данной области. Можно, например, сослаться на работу Hanly et al., 1995.

В некоторых вариантах осуществления пептид CD9, содержащий или состоящий из по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 5 или 6 аминокислотных остатков CD9, выбранных из группы, состоящей из K169, D171, V172, L173, T175 и F176, как показано на фиг. 2, предпочтительно аминокислотных остатков CD9, выбранных из группы, состоящей из K169, D171, V172, L173 и F176, или соединение, содержащее такой пептид CD9, используют для скрининга библиотеки фагового дисплея, чтобы идентифицировать и/или выделять специфические к CD9 иммуноглобулины (как правило, Fab-фрагменты). В некоторых вариантах осуществления используют интактную библиотеку фагового дисплея. В предпочтительных вариантах осуществления используют библиотеку фагового дисплея, полученную от одного или более пациентов, больных меланомой, таким образом, чтобы в библиотеке уже присутствовал сдвиг. В некоторых вариантах осуществления проводили исследование конкуренции специфического к CD9 иммуноглобулина из упомянутой библиотеки фагового дисплея с антителом АТ14-012 за связывание с CD9. Для этого, например, проводят испытание на конкуренцию, описанное в настоящем документе.

Антитела, полученные, продуцированные или отобранные с использованием описанного выше способа, как правило, будут конкурировать с антителом АТ14-012 по меньшей мере за часть одного и того же эпитопа CD9. Таким образом, дополнительно предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с CD9. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с по меньшей мере 4 аминокислотами CD9, выбранными из группы, состоящей из K169, D171, V172, L173 и F176, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотами CD9, выбранными из группы, состоящей из

K169, D171, V172, L173 и F176, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент конкурирует с антителом AT14-012 за связывание с аминокислотами CD9 K169, D171, V172, L173 и F176, как показано на фиг. 2.

В другом аспекте изобретения предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, который(ое) связан(о) с другим соединением. В одном варианте осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением связано с другой терапевтической функциональной группой, например химиотерапевтическим препаратом или другим токсическим соединением, или радиоактивным соединением с образованием так называемого "конъюгата антитело-лекарственный препарат". В другом варианте осуществления функциональная группа, которая связана со связывающим соединением в соответствии с изобретением, представляет собой иммуномодулирующую молекулу, такую как, например, специфическое к CD3 антитело. Такое специфическое к CD3 антитело в состоянии связываться с Т-клетками, и в сочетании со связывающим соединением в соответствии с изобретением оно будет ориентировать Т-клетки на клетки, содержащие CD9, например клетки меланомы, тем самым усиливая противомеланомный Т-клеточный ответ. Это обеспечивает еще более сильный противомеланомный эффект. Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения предлагается биспецифическое или мультиспецифическое связывающее соединение, содержащее специфическое к CD9 связывающее соединение в соответствии с настоящим изобретением и иммуномодулирующую молекулу, предпочтительно специфическое к CD3 связывающее соединение. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагается соединение против CD9, содержащее связывающее соединение в соответствии с настоящим изобретением, которое специфично к CD9, а также токсичную функциональную группу. В некоторых других вариантах осуществления связывающее соединение в соответствии с настоящим изобретением связано с меткой. Это позволяет обнаруживать клетки, содержащие CD9, такие как, например, клетки меланомы, с использованием такого меченого связывающего соединения. В других вариантах осуществления предлагается связывающее соединение в соответствии с изобретением, которое соединено с другим специфическим к CD9 связывающим соединением. В некоторых вариантах осуществления такое другое специфическое к CD9 связывающее соединение также является связывающим соединением в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, предлагается соединение, содержащее два связывающих соединения в соответствии с изобретением, которые связаны друг с другом, таких как, например, два связанных антитела AT14-012 или их функциональных участка, или их функциональных эквивалента. В некоторых вариантах осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением связано с другим специфическим к CD9 связывающим соединением, таким как, например, известное в настоящее время антитело к CD9, с целью получения биспецифического соединения. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь антитела AT14-012 объединяют с тяжелой цепью другого специфического к CD9 антитела с целью получения биспецифического антитела. Биспецифические соединения и биспецифические антитела в соответствии с изобретением обеспечивают, например, более прочное связывание с клетками, содержащими CD9, особенно если два объединенных связывающих соединения специфичны к различным эпитопам CD9. Поэтому такое биспецифическое соединение и/или биспецифическое антитело весьма подходит для терапевтических или диагностических применений. Существует также возможность использовать биспецифические соединения и биспецифические антитела в соответствии с изобретением для анализа в тех случаях, когда различные клетки, содержащие CD9, связываются с таким же биспецифическим связывающим соединением.

В некоторых вариантах осуществления предлагается синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) содержит один Fab-фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно Fab-фрагмент антитела AT14-012, и один Fab-фрагмент другого специфического к CD9 антитела. Полученное связывающее соединение моноспецифично к CD9, но каждое Fab-плечо будет, как правило, связываться со своим собственным эпитопом CD9. В некоторых вариантах осуществления эпитопы, распознаваемые Fab-фрагментами, отличаются друг от друга. В другом варианте осуществления эпитопы не отличаются друг от друга. Fab-плечи могут связывать эпитопы с различной аффинностью. В альтернативном варианте осуществления Fab-плечи связывают свои эпитопы по существу с одинаковой аффинностью, а значит, KD Fab-плеч отличаются не более чем на 30%, предпочтительно не более чем на 20% или не более чем на 10% друг от друга.

В некоторых вариантах осуществления предлагается синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) содержит один Fab-фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно Fab-фрагмент антитела AT14-012, и один Fab-фрагмент другого антитела. Например, такое антитело содержит один Fab-фрагмент антитела в соответствии с изобретением и один Fab-фрагмент блокирующего антитела, специфического к регуляторному белку комплемента, или блокирующего антитела, специфического к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки. Предпочтительными примерами блокирующего антитела, специфического к регуляторному белку комплемента, Fab-фрагмент которого присутствует в таком антителе, являются блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, бо-

лее предпочтительно блокирующее CD55 антитело. К предпочтительным примерам блокирующего антитела против блокирующего антитела, специфичного к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки, Fab-фрагмент которого в присутствии в таком антителе, относятся антитело к CTLA4, антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к PD-L2, антитело к SIRP $\alpha$ , антитело к TIM3, антитело к LAG3, антитело к CD276, антитело к CD272, антитело к KIR, антитело к A2AR, антитело к VISTA и антитело к IDO, предпочтительно антитело к PD-1 или антитело к PD-L1.

Таким образом, дополнительно предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, который(ое) связан(о) с другим соединением. В некоторых вариантах осуществления упомянутое другое соединение представляет собой обнаруживаемую метку, химиотерапевтический препарат, токсичную функциональную группу, иммуномодулирующую молекулу, другое специфическое к CD9 связывающее соединение или радиоактивное соединение. В некоторых вариантах осуществления предлагается антитело AT14-012, которое связано с другим соединением, например любым из упомянутых выше соединений. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) содержит Fab-фрагмент антитела AT14-012 и Fab-фрагмент другого специфического к CD9 антитела. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) содержит тяжелую цепь антитела AT14-012 в сочетании с тяжелой цепью другого специфического к CD9 антитела.

В некоторых вариантах осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением связывается с другой функциональной группой, такой как, например, химиотерапевтический препарат или специфическое к CD3 антитело, посредством линкера, такого как, например, кислото-неустойчивый гидразоновый линкер, или посредством пептидного линкера, например, цитруллин-валина, или через тиоэфирную связь, или посредством катализируемого сортазой А трансамидирования, которое подробно описано в WO 2010/087994.

Катализируемое сортазой трансамидирование предусматривает конструирование сайта распознавания сортазы (LPETGG) на тяжелой цепи антитела, предпочтительно на С-концевом участке тяжелой цепи и на функциональной группе, которая будет связываться с упомянутым антителом. Как правило, антитело и функциональная группа дополнительно содержат последовательность GGGGS и метку для целей очистки, например HIS-метку. Затем проводят опосредованное сортазой трансамидирование с последующим образованием связи посредством клик-химической реакции. В катализируемом сортазой трансамидировании "связь посредством клик-химической реакции" обычно предусматривает химическое связывание, например, алкинсодержащего реагента и, например, азидсодержащего реагента, которые связываются сортазой за счет добавления глицинов к мотиву сортазы на тяжелой цепи антитела и к мотиву сортазы на функциональной группе (например, на белке, пептиде или антителе), которые будут связываться с антителом. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения предлагается антитело в соответствии с изобретением, в котором сайт распознавания сортазы (LPETGG) сконструирован на тяжелой цепи антитела, предпочтительно на С-концевом участке тяжелой цепи, причем антитело предпочтительно дополнительно содержит последовательность GGGGS и метку очистки, например HIS-метку.

В другом варианте осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением соединено с другой функциональной группой посредством тиоэфирной связи. В этом случае в связывающее соединение в соответствии с изобретением предпочтительно включают один или более цистеинов. Цистеины содержат тиоловую группу, а потому включение одного или более цистеинов в связывающее соединение в соответствии с изобретением или замена одной или более аминокислот на один или более цистеинов в связывающем соединении в соответствии с изобретением обеспечивает возможность сочетания упомянутого связывающего соединения с другой функциональной группой. Упомянутые один или более цистеинов предпочтительно вводят в связывающее соединение в соответствии с изобретением в том положении, где они не оказывают существенного влияния на фолдинг упомянутого связывающего соединения и существенно не меняют связывание антигена или эффекторную функцию. Таким образом, в изобретении также предлагается связывающее соединение в соответствии с изобретением, которое содержит последовательность тяжелой цепи антитела AT14-012, при этом по меньшей мере одна аминокислота в упомянутой последовательности AT14-012 (кроме цистеина) была заменена на цистеин.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, который(ое) соединен(о) с другим терапевтическим агентом. Например, антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением соединено (соединен) с другим агентом, который в состоянии по меньшей мере частично оказывать лечебное воздействие или предотвращать нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно нарушение, выбранное из группы, состоящей из CD9-положительного рака, остеопороза, артрита, воспаления легких, ХОЗЛ, колита, и нарушения, связанного с врожденными лимфоидными клетками. Антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, который(ое) соединен(о) с другим терапевтическим агентом, применяющимся для лечения и/или предотвращения CD9-положительного рака. Приме-

рами таких агентов являются регуляторные белки комплемента, антитела, специфичные к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки, малые молекулы против мутаций BRAF (например, вемурафениб и дабрафениб) и другие химиотерапевтические препараты. Таким образом, предлагается использование или способ по меньшей мере частичного лечения или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, в соответствии с изобретением, при этом антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением соединяют с терапевтическим агентом, применяемым для лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно CD9-положительного рака. Также предлагается набор компонентов, включающий антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением и терапевтический агент, применяемый для лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно CD9-положительного рака. Предпочтительными, но не имеющими ограничительного характера примерами таких агентов являются регуляторные белки комплемента, антитела, специфичные к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки, малые молекулы против мутаций BRAF (например, вемурафениб и дабрафениб) и другие химиотерапевтические препараты. Например, в примерах показано, что антитело AT14-012 E345R эффективно уничтожает опухолевые клетки посредством механизма CDC в присутствии факторов комплемента человека, где отсутствует экспрессия CD55, ингибитора образования C3-конвертазы. Таким образом, при соединении антитела с агентом, способным стимулировать образование C3-конвертазы или способным противодействовать ингибированию образования C3-конвертазы, например блокирующим CD55 антителом, можно индуцировать комплемент-зависимую гибель опухолевых клеток. Антитела против других регуляторных белков комплемента, блокирование которых усиливает CDC, например блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, также преимущественно могут быть объединены с антителом, функциональным участком или функциональным эквивалентом в соответствии с изобретением.

Таким образом, предлагается использование или способ по меньшей мере частичного лечения или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, в соответствии с изобретением, при этом антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением соединяют с агентом, который в состоянии стимулировать образование C3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования C3-конвертазы. Упомянутым агентом предпочтительно является блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, предпочтительно блокирующее CD55 антитело. Упомянутым нарушением предпочтительно является CD9-положительный рак, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких.

Также предлагается набор компонентов, включающий антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением и терапевтический агент, применяемый для лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно CD9-положительного рака. В предпочтительном варианте осуществления упомянутым агентом является агент, который в состоянии стимулировать образование C3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования C3-конвертазы. Упомянутым агентом предпочтительно является блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, предпочтительно блокирующее CD55 антитело. Также предлагается набор компонентов, включающий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, вектор или клетку в соответствии с изобретением и агент, который в состоянии стимулировать образование C3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования C3-конвертазы. Упомянутым агентом предпочтительно является блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, предпочтительно блокирующее CD55 антитело.

Антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением необязательно дополнительно комбинируют с антителом, специфичным к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки, например антителом, блокирующим ось PD1-PDL1. Антитела, блокирующие ось PD1-PDL1, в частности связывающиеся с PD1, в настоящее время широко используют для лечения широкого круга пациентов на поздних стадиях рака. Примеры показывают, что в случае сочетания антитела AT14-012 с ниволумабом (Opdivo, Bristol-Myers Squibb), антителом к PD-1, уровень ингибирования роста опухоли значительно повышался по сравнению с лечением одним только AT14-012.

Антитело к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки предпочтительно является блокирующим антителом. Используемый в настоящем документе термин "блокирующее антитело" относится к антителу или фрагменту, связывание которого с антигеном снижает или блокирует взаимодействие между антигеном и его мишенью. Например, блокирующим антителом к CTLA-4 является антитело, которое снижает или блокирует связывание растворимого человеческого CTLA-4 с экспрессируемыми клетками

CD80 и CD86 (B7-1 и B7-2), а потому подавляет Т-клеточную ингибирующую активность CTLA-4. Подходящие антитела к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки включают, без ограничений, блокирующее антитело, специфичное к антигену-4 цитотоксического Т-лимфоцита (CTLA-4), белку запрограммировано!! гибели клеток-1 (PD-1), PD-лиганду I (PD-L1), PD-L2, сигнальному регуляторному белку альфа (SIRPa), молекуле-3, содержащей домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина-3 (TIM3), гену активации лимфоцитов 3 (LAG3), иммуноглобулиноподобному рецептору клеток-киллеров (KIR), CD276, CD272, A2AR, VISTA и индоламин-2,3-диоксигеназе (IDO).

Таким образом, предлагается использование или способ по меньшей мере частичного лечения или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, в соответствии с изобретением, при этом антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением соединяют с блокирующим антителом, специфичным к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки. Упомянутое антитело предпочтительно выбрано из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRPa, антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA и антитела к IDO. Подходящие антитела, используемые в качестве дополнительного компонента иммунотерапии, включают ниволумаб, пембролизумаб, ламбролизумаб, ипилимумаб и лирилумаб. В особенно предпочтительном варианте осуществления упомянутое антитело представляет собой антитело, блокирующее ось PD1-PDL1, например антитело к PD1 или антитело к PDL1, более предпочтительно антитело к PD1. Упомянутым нарушением предпочтительно является CD9-положительный рак, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких.

Также предлагается набор компонентов, включающий антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением и блокирующее антитело, специфичное к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки. Также предлагается набор компонентов, включающий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, вектор или клетку в соответствии с изобретением и блокирующее антитело, специфичное к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки. Упомянутое антитело предпочтительно выбрано из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRPa, антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA и антитела к IDO. Подходящие антитела, используемые в качестве дополнительного компонента иммунотерапии, включают ниволумаб, пембролизумаб, ламбролизумаб, ипилимумаб и лирилумаб. В особенно предпочтительном варианте осуществления упомянутое антитело представляет собой антитело, блокирующее ось PD1-PDL1, например блокирующее PD1 антитело или блокирующее PDL1 антитело, более предпочтительно блокирующее PD1 антитело.

Набор компонентов в соответствии с изобретением может включать один или более контейнеров, заполненных фармацевтической композицией, содержащей антитело, функциональный участок или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, и фармацевтической композицией, содержащей агент, который в состоянии стимулировать образование С3-конвертазы или противодействовать ингибированию образования С3-конвертазы, предпочтительно блокирующее CD55 антитело или блокирующее антитело, специфичное к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки, предпочтительно блокирующее PD1 или PDL1 антитело. Набор компонентов или один или более контейнеров необязательно дополнительно включают один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. К такому набору компонентов или контейнеру (-ам) могут прилагаться различные документальные материалы, например инструкции по применению или уведомление в форме, предписанной государственным учреждением, регулирующим производство, применение или оборот фармацевтических продуктов, причем упомянутые уведомления отражают разрешение такого учреждения на производство, применение или оборот препарата. Предпочтительно набор компонентов включает инструкции по применению.

Также предлагается фармацевтическая композиция, включающая антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент по любому из пп.1-15, терапевтический агент, который может применяться для лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно CD9-положительного рака, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. В предпочтительном варианте осуществления упомянутый агент представляет собой агент, который в состоянии стимулировать образование С3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования С3-конвертазы, предпочтительно блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, более предпочтительно блокирующее CD55 антитело. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления упомянутый агент представляет собой блокирующее антитело, специфичное к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки, которое предпочтительно выбрано из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антите-

ла к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRP $\alpha$ , антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA и антитела к IDO, более предпочтительно блокирующее PD1 антитело или блокирующее PDL1 антитело.

В настоящем документе также предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты и их функциональные эквиваленты, а также векторы, кодирующие по меньшей мере одну область CDR антитела, функционального участка или функционального эквивалента, или связывающего соединения в соответствии с изобретением. По меньшей мере области CDR1-3 тяжелой цепи и области CDR 1-3 легкой цепи такого связывающего соединения предпочтительно кодируются одной или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления кодируются переменные области тяжелой и легкой цепей связывающего соединения в соответствии с изобретением. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается выделенная, синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, длина которой составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов, или ее функциональный эквивалент, или вектор, кодирующий по меньшей мере одну область CDR антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением. Упомянутая область CDR предпочтительно представляет собой область CDR антитела AT14-012 или его варианта, как описано в настоящем документе, имеющего одинаковую или более высокую аффинность связывания по сравнению с антителом AT14-012.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением имеет длину, составляющую по меньшей мере 30 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 75 нуклеотидов. Молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, например, выделяют из В-клетки, которая в состоянии продуцировать антитело в соответствии с изобретением. Упомянутая В-клетка предпочтительно продуцирует антитело AT14-012 или его вариант, как описано в настоящем документе, имеющий одинаковую или более высокую аффинность связывания по сравнению с антителом AT14-012. В некоторых вариантах осуществления предлагается одна или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов, кодирующих, по меньшей мере, последовательность CDR3 тяжелой цепи и последовательность CDR3 легкой цепи антитела AT14-012 или его варианта, как описано в настоящем документе, имеющего одинаковую или более высокую аффинность связывания по сравнению с антителом AT14-012.

Используемый в настоящем документе термин "выделенная, синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, длина которой составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов, или ее функциональный эквивалент, кодирующая(ий) по меньшей мере одну область CDR антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением" в настоящем документе также соответствует термину "молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением".

Используемая в настоящем документе молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность изобретения предпочтительно содержит цепь нуклеотидов, более предпочтительно ДНК, кДНК или РНК. В других вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность изобретения включают другие виды структур нуклеиновых кислот, такие как, например, спираль ДНК/РНК, пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), закрытая нуклеиновая кислота (ЗНК) и/или рибозим. Такие другие структуры нуклеиновой кислоты называют функциональными эквивалентами нуклеотидной последовательности. Таким образом, термин "функциональный эквивалент молекулы нуклеиновой кислоты" включает цепь, содержащую синтетические нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и/или нуклеотидные структурные звенья, которые обладают такими же функциями, что и природные нуклеотиды.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие области CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела AT14-012, представлены в табл. 1 и на фиг. 3. Молекулы нуклеиновых кислот с последовательностью, которая отличается от любой из последовательностей CDR нуклеиновых кислот, представленных в табл. 1 и на фиг. 3, но в которых присутствуют кодоны нуклеотидов, кодирующие такую(ие) же нуклеотидная(ые) последовательность(и) CDR, что и представленные в табл. 1 и на фиг. 3, также входят в объем изобретения. Такие молекулы нуклеиновых кислот, например, включают нуклеотидные последовательности, которые были кодон-оптимизированы для продуцирующей клетки, такой как, например, E.coli или клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO (мышинная миелома) или клетки 293 (T), что обеспечивает широкомасштабную продукцию связывающих соединений в соответствии с изобретением с такой(ими) же аминокислотной(ыми) последовательностью(ями) CDR, как и антитело AT14-012. Следует отметить, что продукцию антител можно осуществлять с помощью любой системы продукции рекомбинантного антитела; четыре системы продуцирующих клеток, упомянутых в настоящем документе, лишь несколько примеров множества систем, доступных на сегодняшний день. Используемый в настоящем документе термин "кодон" означает триплет нуклеотидов (или их функциональных эквивалентов), который кодирует определенный аминокислотный остаток. Термин "кодон-оптимизированный" означает, что один или более кодонов из исходной нуклеотидной последовательности человека заменяют од-

ним или более кодонами, которые предпочтительны для определенной системы продукции антитела. Такие замещающие кодоны предпочтительно кодируют тот же аминокислотный остаток, что и исходный кодон человека, который был заменен. В альтернативном варианте осуществления один или более замещающих кодонов кодируют отличающийся аминокислотный остаток. Это предпочтительно приводит к консервативному замещению аминокислот, хотя это и не является необходимым. Как правило, в константных областях и каркасных областях обычно допускается одна или более аминокислотных замен. В областях CDR предпочтительно используют кодоны, которые кодируют тот же аминокислотный остаток, что и исходный человеческий кодон, который был заменен.

Более того, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие CDR тяжелой или легкой цепи, которые не идентичны, но основаны на последовательности CDR антитела AT14-012, также входят в объем изобретения при условии того, что получаемая CDR имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью CDR антитела AT14-012.

Таким образом, дополнительно предлагается молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, или вектор, которая(ый) включает последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с последовательностью CDR антитела AT14-012. Полученная CDR предпочтительно отличается не более чем на три, предпочтительно не более чем на два, предпочтительно всего на одну аминокислоту от исходной последовательности CDR антитела в соответствии с изобретением.

В некоторых вариантах осуществления предлагается одна или более молекул нуклеиновых кислот или функциональных эквивалентов, или векторов в соответствии с изобретением, которые кодируют по меньшей мере области CDR 1-3 тяжелой цепи и области CDR 1-3 легкой цепи антитела AT14-012 или его вариантов с одинаковой или более высокой аффинностью связывания. Таким образом, дополнительно предлагается одна или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов в соответствии с изобретением, которые включают

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR1 тяжелой цепи, которая кодирует последовательность DYAMH или DYAMY, и/или

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, которая кодирует последовательность GISWNSGSIVYADSVKG, и/или

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, которая кодирует последовательность AVSGYYPYFDY или AVSGYFPYFDY, или AVSGYYPYFHY, ИЛИ AVSGYFPYFHY, и/или

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR1 легкой цепи, которая кодирует последовательность KSSQSVLYSSNNKNYLG, и/или

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR2 легкой цепи, которая кодирует последовательность WASTRES или WASIRES, и/или

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR3 легкой цепи, которая кодирует последовательность QQYYTTP.

Дополнительно предлагается одна или более молекул нуклеиновых кислот или функциональных эквивалентов, или векторов, содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с одной или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

gat tat gcc atg cac; и

ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc; и

gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac; и

aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt; и

tgg gca tct acc cgg gaa tcc; и cag caa tat tat act act cct.

Это нуклеотидные последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепи антитела AT14012, которые представлены в табл. 1 и на фиг. 3. В некоторых вариантах осуществления указанные идентичности последовательности составляют по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%.

Предпочтительно присутствуют все перечисленные выше последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепей AT14-012 или последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны им. Таким образом, дополнительно предлагается одна или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов, которые включают

нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью gat tat gcc atg cac, и

последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg

aag ggc, и

последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac, и

последовательность, кодирующую CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt, и

последовательность, кодирующую CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью tgg gca tet acc cgg gaa tcc, и

последовательность, кодирующую CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью cag caa tat tat act act cct. В некоторых вариантах осуществления указанные идентичности последовательности составляют по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%. Кодированные аминокислотные последовательности CDR предпочтительно отличаются на более чем на три, предпочтительно не более чем на две, предпочтительно всего на одну аминокислоту от аминокислотных последовательностей CDR1-3 тяжелой и легкой цепей антитела AT14-012.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты или функциональные эквиваленты, или векторы в соответствии с изобретением, которые кодируют по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением. Упомянутые по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или вектор предпочтительно кодируют по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела AT14-012, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична им.

Таким образом, дополнительно предлагается одна или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов, включающих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

```
gaa gtg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc
acc ttt gat gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca ggt att agt tgg aat
agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg
caa ctg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttc tat tac tgt gca aaa gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac
tac tgg ggc cag gga att ttg gtc acc gtc tcc tca, и/или включающих последовательность, которая
имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью gac atc
gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg tct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt
tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg
gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc
ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat act act cct tcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg
gag att aaa.
```

Одна или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов в соответствии с изобретением предпочтительно кодируют и вариабельную область тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, которые подобны вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи AT14-012, как показано в табл. 1 и на фиг. 3. Таким образом, дополнительно предлагается одна или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов, или векторов, включающих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

gaa gtg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc  
acc ttt gat gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca ggt att agt tgg aat  
agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg  
caa ctg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttc tat tac tgt gca aaa gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac  
tac tgg ggc cag gga att ttg gtc acc gtc tcc tca, и включающих последовательность, которая имеет  
по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью gac atc gtg atg  
acc cag tct cca gac tcc ctg tct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac  
agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct  
acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg  
cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat act act cct tcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag  
att aaa.

В некоторых вариантах осуществления указанные идентичности последовательности составляют по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты и их функциональные эквиваленты и векторы, которые кодируют антитело или функциональный участок, или эквивалент в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты и их функциональные эквиваленты и векторы, которые кодируют антитело AT14-012 или его функциональный участок или функциональный эквивалент. В некоторых вариантах осуществления упомянутые молекулы нуклеиновой кислоты или функциональные эквиваленты, или векторы кодон-оптимизированы для не относящихся к человеку рекомбинантных систем экспрессии, таких как не относящаяся к человеку клетка-хозяин, например, *E. coli*, клетки CHO, NSO или 293.

В некоторых вариантах осуществления предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением. Используемый в настоящем документе термин "вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением" также называется "вектором в соответствии с изобретением". Эти термины включают один или более векторов в соответствии с изобретением, содержащих одну или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов в соответствии с изобретением. При использовании в настоящем документе термин в единственном числе включает термин "один или более".

Способы конструирования векторов, содержащих одну или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов в соответствии с изобретением, хорошо известны в данной области. Не имеющие ограничительного характера примеры векторов, подходящих для получения вектора в соответствии с изобретением, представляют собой ретровирусные и лентивирусные векторы. Такие векторы подходят для различных применений. Например, вектор в соответствии с изобретением, содержащий терапевтически эффективную нуклеотидную последовательность в соответствии с изобретением, подходит для профилактических или терапевтических применений против меланомы. Введение такого(их) вектора(ов) нуждающемуся в этом субъекту, предпочтительно человеку, приводит к экспрессии упомянутой профилактической или терапевтической нуклеотидной последовательности *in vivo*, что, по меньшей мере, частично обеспечивает лечение или профилактику меланомы. Упомянутый вектор также можно использовать в применениях, включающих экспрессию *in vitro* рассматриваемой молекулы нуклеиновой кислоты, например для (коммерческого) производства антител или функциональных эквивалентов в соответствии с изобретением. Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты, функциональные эквиваленты и векторы в соответствии с изобретением особенно эффективны для продукции антител или функциональных участков, или функциональных эквивалентов в соответствии с изобретением, которые специфичны к CD9. Для этого, например, такую(ие) молекулу(ы) нуклеиновой кислоты или функциональный(ые) эквивалент(ы), или вектор(ы) вводят в клетку таким образом, что механизм трансляции нуклеиновой кислоты клетки будет продуцировать кодируемые антитела или функциональные участки, или функциональные эквиваленты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или вектор, кодирующий переменную область тяжелой и легкой цепи связывающего соединения в соответствии с изобретением, экспрессируется в так называемых продуцирующих клетках, таких как, например, *E. coli*, клетки CHO, NSO или 293(T), некоторые из которых выполнены с возможностью продукции коммерческих антител. Следует отметить, что для этого пригодна любая система продукции рекомбинантного антитела; такие четыре упомянутые системы продуцирующих клеток-лишь несколько примеров множества систем, которые доступны на сегодняшний день. Как было описано выше в настоящем документе, в таких случаях предпочтительно использовать молекулы нуклеиновой кислоты или их функциональные эквиваленты, в которых исходные человеческие последовательности AT14-012, как предлагается в настоящем документе, кодон-

оптимизированы для продуцирующей клетки. Пролиферация упомянутых продуцирующих клеток позволяет получать линию продуцирующих клеток, которая в состоянии продуцировать связывающие соединения в соответствии с изобретением. Упомянутая линия продуцирующих клеток предпочтительно подходит для продукции антител для применения у людей. Таким образом, упомянутая линия продуцирующих клеток предпочтительно не содержит патогенных агентов, таких как патогенные микроорганизмы. В некоторых вариантах осуществления антитело АТ14-012 продуцируется такой линией продуцирующих клеток.

Таким образом, дополнительно предлагается выделенная или рекомбинантная клетка, содержащая по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты и/или функциональный эквивалент, и/или вектор в соответствии с изобретением. Такая клетка предпочтительно является продуцирующей антитело клеткой, которая в состоянии продуцировать связывающее соединение в соответствии с изобретением, такое как, например, антитело АТ14-012. Дополнительно предлагается способ продуцирования антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением, включающий обеспечение клетки с по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты или функциональным эквивалентом, или вектором в соответствии с изобретением, и обеспечение упомянутой клетке условий для трансляции упомянутой по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента, или вектора, что приводит к продукции упомянутого антитела или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления упомянутое антитело представляет собой АТ14-012, при необходимости включающее одну или более мутаций тяжелой цепи Н40У, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи Т66I (нумерация по IMGT) или функциональный участок или функциональный эквивалент. Упомянутый способ в соответствии с изобретением предпочтительно дополнительно включает стадию сбора, очистки и/или выделения упомянутого антитела или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением. Полученные связывающие соединения в соответствии с изобретением, например, подходят для применения для лечения или диагностики человека, необязательно после дополнительных стадий очистки, выделения или обработки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или вектор в соответствии с изобретением вводят не относящемуся к человеку животному, например для продукции антитела *in vivo*. Таким образом, дополнительно предлагается выделенное или рекомбинантное не относящееся к человеку животное, включающее по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или вектор в соответствии с изобретением. Способы получения трансгенных не относящихся к человеку животных известны в данной области. Можно, например, сослаться на работу EC Lee, *Nature Biotechnology*, 2013.

Связывающие соединения в соответствии с настоящим изобретением подходят для применения против меланомы. Дополнительно, CD9 также играет роль в других заболеваниях, таких как, например, другие формы опухолей, которые также экспрессируют CD9. Другими не имеющими ограничительного характера примерами заболеваний, которые связаны с CD9-положительными клетками, являются остеопороз и артрит (Iwai et al. и Hattori et al.), воспаление легких и ХОЗЛ (Takeda et al. и Jin et al.), а также колит (Wagner et al.). Например, CD9 обильно экспрессируется в активированных остеокластах при вызванном овариэктомией остеопорозе и при эрозии кости в случае коллаген-индуцированного артрита (Iwai et al. и Hattori et al.). CD9 также экспрессируется врожденными лимфоидными клетками. Другими не имеющими ограничительного характера примерами заболеваний, связанных с CD9-положительными клетками, являются вирусные инфекции (например, ВИЧ или герпес, или грипп), бактериальные инфекции, ЦМВ-ретинит, кандидоз ротовой полости, тромбастения Гланцмана и дифтерия.

Поскольку связывающие соединения в соответствии с настоящим изобретением специфичны к CD9, они также подходят для применения против перечисленных заболеваний. Таким образом, связывающие соединения в соответствии с настоящим изобретением особенно подходят для применения в качестве лекарственного средства или профилактического агента. Таким образом, предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением для применения в качестве лекарственного средства и/или профилактического агента. В некоторых вариантах осуществления применяют связывающие соединения в соответствии с изобретением, которые включают человеческие последовательности, чтобы уменьшать вероятность неблагоприятных побочных эффектов при лечении людей. Упомянутое антитело предпочтительно включает антитело АТ14-012. Таким образом, дополнительно предлагается антитело АТ14-012 для применения в качестве лекарственного средства и/или профилактического агента. В некоторых вариантах осуществления человеческие последовательности получают синтетически или рекомбинантным способом на основании последовательности АТ14-012, при необходимости используя кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности, которые кодируют такую же аминокислотную последовательность АТ14-012, или последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны им.

Также предлагается молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, или вектор в соответствии с изобретением, которая(ый) включает такую молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или клетка в соответствии с изобретением для

применения в качестве лекарственного средства и/или профилактического агента. При введении (содержащих вектор) одной или более молекул нуклеиновой кислоты или функциональных эквивалентов в соответствии с изобретением молекула(ы) нуклеиновой кислоты или функциональный(ые) эквивалент(ы) будут транслироваться *in situ* в связывающее соединение в соответствии с изобретением. Полученные связывающие соединения в соответствии с изобретением будут затем противодействовать или предотвращать нарушения, связанные с клетками, экспрессирующими CD9, такие как, например, экспрессирующие CD9 опухоли, остеопороз, артрит, воспаление легких, ХОЗЛ, колит, или нарушения, связанные с врожденными лимфоидными клетками. Аналогичным образом, введение клетки в соответствии с изобретением нуждающемуся в этом пациенту будет приводить к образованию *in vivo* терапевтических или профилактических антител к CD9 или функциональных участков, или функциональных эквивалентов в соответствии с изобретением.

В некоторых вариантах осуществления предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, или молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или вектор в соответствии с изобретением, или клетка в соответствии с изобретением для применения в рамках способа по меньшей мере для частичного лечения или профилактики нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9. В некоторых вариантах осуществления предлагается антитело AT14-012 для применения в рамках способа, по меньшей мере, для частичного лечения или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9. При использовании в настоящем документе термин "нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими CD9" означает любое заболевание, при котором отмечается присутствие специфических для данного заболевания клеток, экспрессирующих CD9. В некоторых вариантах осуществления такие клетки являются этиологическим фактором заболевания, как это часто бывает в случае злокачественных клеток, экспрессирующих CD9. В некоторых вариантах осуществления присутствие таких клеток вызывает неблагоприятные симптомы, такие как, например, воспаление и/или боль. Не имеющим ограничительного характера примером нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, является рак с опухолевыми клетками, экспрессирующими CD9, такой как, например, меланома, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак легких, рак молочной железы, рак яичников, рак желудка, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, ОМЛ, множественная миелома, рак ЖКТ, рак печени, рак шейки матки, почечно-клеточная карцинома, рак предстательной железы, рак головного мозга, саркома Капоши, мукоэпидермоидная карцинома, хориокарцинома, фибросаркома, карцинома шейки матки, глиома, аденокарцинома, аденокарцинома легких, немелкоклеточная карцинома легких, рак мочевого пузыря и мелкоклеточный рак легких.

Упомянутая в настоящем документе опухолевая клетка, которая экспрессирует CD9, также называется CD9-положительной опухолевой клеткой или CD9-положительной злокачественной клеткой. Рак, при котором по меньшей мере часть опухолевых клеток экспрессирует CD9, называется "CD9-положительным раком". Другими не имеющими ограничительного характера примерами нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, являются остеопороз, артрит, воспаление легких, ХОЗЛ, колит и нарушения, связанные с врожденными лимфоидными клетками.

Таким образом, дополнительно предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, или молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, или вектор в соответствии с изобретением, или клетка в соответствии с изобретением для применения в рамках способа для по меньшей мере частичного лечения или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, при этом упомянутое нарушение выбрано из группы, состоящей из CD9-положительного рака, остеопороза, артрита, воспаления легких, ХОЗЛ, колита и нарушения, связанного с врожденными лимфоидными клетками. Упомянутый CD9-положительный рак предпочтительно выбран из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких.

В примерах показано, что AT14-012 в состоянии уничтожать клетки меланомы посредством механизма антителозависимой цитотоксичности (ADCC), при этом минимальная гибель клеток отмечалась для эндотелиальных клеток артерии человека (HAECs). Кроме того, было показано, что антитело AT14-012 в состоянии приводить в действие механизм комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), если структура антитела включает основную цепь IgG3. Таким образом, без ограничений, накладываемых теорией, считается, что противоопухолевая активность AT1412, по меньшей мере, частично опосредована ADCC. Поэтому в предпочтительном варианте осуществления антитело, функциональный участок или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением или для применения в соответствии с изобретением в состоянии индуцировать антителозависимую цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) в клетках, экспрессирующих CD9.

Предпочтительным антителом для применения в любом из упомянутых способов является антитело

AT14-012 или вариант антитела AT14-012, который, как описано в настоящем документе, имеет одинаковую или более высокую аффинность по сравнению с антителом AT14-012.

В некоторых вариантах осуществления антитело AT14-012, необязательно включающее одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или функциональный участок или функциональный эквивалент, или по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующая AT14-012, которая(ый) при необходимости включает одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или ее функциональный участок, или функциональный эквивалент, или по меньшей мере один вектор или клетка, который(ая) содержит упомянутую молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, предпочтительно используются, по меньшей мере, для частичного лечения и/или предотвращения меланомы. Используемый в настоящем документе термин "по меньшей мере, частичное лечение и/или предотвращение меланомы" включает противодействие опухолевому росту меланомы и/или смягчение симптомов, возникающих вследствие присутствия клеток меланомы в организме пациента. Таким образом, также предлагается использовать антитело AT14-012, необязательно включающее одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или функциональный участок, или функциональный эквивалент, или по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая(ый) кодирует AT14-012, необязательно включающие одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или ее функциональный участок, или функциональный эквивалент, или по меньшей мере один вектор или клетку, который(ая) включает упомянутую молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, для приготовления лекарственного средства и/или профилактического агента по меньшей мере для частичного лечения и/или предотвращения меланомы. Дополнительно предлагается антитело AT14-012, необязательно включающее одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или его функциональный участок или функциональный эквивалент, или по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая (-ый) кодирует AT14-012, необязательно включающие одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или ее функциональный участок, или ее функциональный эквивалент, или по меньшей мере один вектор или клетка, который(ая) содержит упомянутую молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, для применения в рамках способа для по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения меланомы.

В некоторых вариантах осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением связывают с терапевтической функциональной группой, например химиотерапевтическим препаратом или другим токсичным соединением, или радиоактивным соединением, или иммуномодулирующей молекулой, такой как, например, антитело, специфическое к CD3, с образованием так называемого "конъюгата антитело-лекарственный препарат" или "Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR)", соответственно, которые в состоянии противодействовать миелопролиферативным или лимфолиферативным заболеваниям.

В дополнительных вариантах осуществления предлагается композиция, содержащая антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением. Также предлагается композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, а также композиция, включающая вектор или клетку в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления упомянутое антитело представляет собой AT14-012, необязательно включающее одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT). В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит антитело AT14-012, необязательно включающее одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или его функциональный участок, или его функциональный эквивалент, и другое антитело, специфическое к CD9. Упомянутое другое антитело, специфическое к CD9, предпочтительно связывается с другим эпитопом CD9 в отличие от AT14-012. Такая комбинация различных связывающих соединений, специфических к CD9, особенно подходит для связывания и/или противодействия CD9-положительным клеткам, например клеткам меланомы или другим CD9-положительным опухолевым клеткам.

В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с изобретением представляет собой фармацевтическую композицию. Такая фармацевтическая композиция также предпочтительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Не имеющими ограничительного характера примерами подходящих носителей, например, являются гемоцианин лимфы улитки (KLH), сывороточный альбумин (например, BSA или RSA) и овальбумин. В одном предпочтительном варианте осуществления упомянутый подходящий носитель представляет собой раствор, например солевой раствор.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением предпочтительно пригодна для введения человеку.

В изобретении дополнительно предлагается способ для, по меньшей мере, частичного лечения

и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением, и/или молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента в соответствии с изобретением, и/или вектора или клетки в соответствии с изобретением, и/или композиции в соответствии с изобретением. При использовании в настоящем документе термин "субъект" относится к человеку или к не относящемуся к человеку животному, предпочтительно к пациенту-человеку, страдающему CD9-положительным раком, остеопорозом, артритом, воспалением легких, ХОЗЛ, колитом или нарушением, связанным с врожденными лимфоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления упомянутым субъектом-человеком является пациент, страдающий меланомой. Упомянутая композиция предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением. Связывающее соединение или молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или вектор, или фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением предпочтительно вводят посредством одного или более введений. Стандартные дозы введения связывающего соединения в соответствии с изобретением находятся в диапазоне от 0,1 до 10 мг на кг массы тела.

Связывающее соединение в соответствии с изобретением также особенно пригодно для обнаружения клеток, экспрессирующих CD9. Например, если существуют подозрения, что субъект, предпочтительно человек, страдает нарушением, связанным с клетками, экспрессирующими CD9, пробу, например пробу крови или ткани, взятую у упомянутого субъекта, можно исследовать на предмет присутствия клеток, экспрессирующих CD9 (также называемых CD9-положительными клетками), с использованием связывающего соединения в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления упомянутую пробу смешивают со связывающим соединением в соответствии с изобретением, которое будет специфически связываться с CD9-положительными клетками. CD9-положительные клетки, такие как, например, клетки меланомы, связанные со связывающим соединением в соответствии с изобретением, могут быть выделены из образца и/или обнаружены с использованием любого способа, известного в данной области, например, без ограничений, выделения с использованием магнитных гранул, гранул с покрытием стрептавидином или выделения с использованием вторичных антител, иммобилизованных на колонке. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления в связывающее соединение в соответствии с изобретением вносят метку, чтобы обеспечивать возможность обнаружения упомянутого связывающего соединения. Такое связывающее соединение, например, содержит флуоресцентную метку, ферментативную метку или радиоактивную метку. В альтернативном варианте осуществления связывающее соединение в соответствии с изобретением обнаруживают с использованием вторичного антитела с меткой, мишенью которого является упомянутое связывающее соединение.

Если связывающее соединение в соответствии с изобретением оказывается связанным с компонентом пробы пациента, это указывает на присутствие CD9-положительных клеток. Такой способ позволяет обнаруживать специфические для заболевания CD9-положительные клетки, например клетки меланомы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается применение антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением для определения того, содержит ли проба клетки, экспрессирующие CD9. В некоторых вариантах осуществления упомянутое антитело или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением применяют для определения того, содержит ли проба опухолевые клетки, экспрессирующие CD9. Также предлагается способ определения присутствия в пробе клеток, экспрессирующих CD9, предпочтительно CD9-положительных опухолевых клеток, включающий

приведение упомянутой пробы в контакт с антителом, или функциональным участком, или функциональным эквивалентом в соответствии с изобретением, и

обеспечение условий для связывания упомянутого антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента с клетками, экспрессирующими CD9, если таковые присутствуют, и

определение наличия или отсутствия связывания клеток, экспрессирующих CD9, таких как, например, CD9-положительные опухолевые клетки, с упомянутым антителом или функциональным участком, или функциональным эквивалентом, и таким образом определение наличия или отсутствия (опухолевых) клеток, экспрессирующих CD9, в упомянутой пробе. В некоторых вариантах осуществления упомянутыми опухолевыми клетками, экспрессирующими CD9, являются клетки меланомы.

Как показано в примерах, антитело AT14-012 в особенности пригодно для обнаружения CD9-положительных клеток, таких как, например, CD9-положительные опухолевые клетки. Таким образом, дополнительно предлагается применение антитела AT14-012, необязательно содержащего одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или его функционального участка или функционального эквивалента для определения наличия или отсутствия в пробе клеток, экспрессирующих CD9. Также предлагается применение антитела AT14-012, необязательно содержащего одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или его функционального участка или функционального эквивалента для определения наличия в пробе клеток, экспрессирующих CD9, таких как, например, клетки меланомы или клетки колоректального рака, или клетки рака поджелудочной железы, или клетки рака пищевода, или клетки рака

легких, или клетки рака молочной железы, или клетки рака яичников, или клетки рака желудка, или клетки плоскоклеточной карциномы, или клетки ОМЛ, или клетки множественной миеломы, или клетки рака ЖКТ, или клетки рака печени, или клетки рака головного мозга, или клетки саркомы Капоши, или клетки мукоэпидермоидной карциномы, или клетки хориокарциномы, или клетки фибросаркомы, или клетки карциномы шейки матки, или клетки глиомы, или клетки аденокарциномы, или клетки аденокарциномы легких, или клетки немелкоклеточного рака легких, или клетки рака мочевого пузыря, или клетки мелкоклеточного рака легких.

Также предлагается способ определения присутствия в пробе клеток, экспрессирующих CD9, предпочтительно CD9-положительных опухолевых клеток, включающий

приведение упомянутой пробы в контакт с антителом АТ14-012, необязательно содержащим одну или более мутаций Н40У, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи Т66I (нумерация по IMGT), или его функциональным участком или функциональным эквивалентом, и

обеспечение условий для связывания антитела АТ14-012, необязательно содержащего одну или более мутаций Н40У, Y112F и D116H (нумерация по IMGT), или его функционального участка, или его упомянутого функционального эквивалента с клетками, экспрессирующими CD9, если таковые присутствуют, и

определение наличия или отсутствия связывания клеток, экспрессирующих CD9, таких как, например, CD9-положительные опухолевые клетки, с антителом АТ14-012, необязательно содержащим одну или более мутаций Н40У, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи Т66I (нумерация по IMGT), или его упомянутым функциональным участком, или его функциональным эквивалентом, и таким образом определение наличия или отсутствия в упомянутой пробе клеток, экспрессирующих CD9.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ в соответствии с изобретением, в котором упомянутая проба включает пробу крови или пробу красного костного мозга, или материал для биопсии. В некоторых вариантах осуществления упомянутый материал для биопсии отбирают из кожной ткани для проведения исследования на меланому и/или плоскоклеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления упомянутый материал для биопсии отбирают из кишечника для проведения исследования на рак ЖКТ, колоректальный рак, рак пищевода или рак желудка. В некоторых вариантах осуществления упомянутый материал для биопсии отбирают из ткани поджелудочной железы для проведения исследования на рак поджелудочной железы или из ткани легких для проведения исследования на рак легких, или из ткани молочной железы для проведения исследования на рак молочной железы, или из ткани яичников для проведения исследования на рак яичников, или из ткани печени для проведения исследования на рак печени, или из ткани головного мозга для проведения исследования на рак головного мозга, или из мукоэпидермоидной ткани для проведения исследования на мукоэпидермоидную карциному, или из ткани шейки матки для проведения исследования на карциному шейки матки, или из ткани мочевого пузыря для проведения исследования на рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления упомянутая проба представляет собой пробу крови, которую, например, можно использовать для проведения исследования на ОМЛ, множественную миелому, связанные с раком внеклеточные везикулы (экзосомы) или наличие метастазов любой из перечисленных выше солидных опухолей.

Результаты исследования со связывающим соединением в соответствии с изобретением используют для типирования пробы. Например, если проба субъекта очевидно содержит злокачественные CD9-положительные клетки, такую пробу типировать как содержащую связанные с заболеванием клетки. Такое типирование затем можно использовать для диагностики заболевания, связанного с клетками, экспрессирующими CD9. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается антитело, или функциональный участок, или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением для применения в диагностике нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9. Упомянутое нарушение предпочтительно выбрано из группы, состоящей из CD9-положительного рака, артрита, воспаления легких, ХОЗЛ, колита и нарушения, связанного с врожденными лимфоидными клетками. Упомянутый CD9-положительный рак предпочтительно выбран из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело АТ14-012, необязательно включающее одну или более мутаций Н40У, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи Т66I (нумерация по IMGT), или функциональный участок, или функциональный эквивалент используют для упомянутого выше обнаружения и диагностики. Таким образом, также дополнительно предлагается антитело АТ14-012, необязательно содержащее одну или более мутаций Н40У, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи Т66I (нумерация по IMGT), или его функциональный участок или функциональный эквивалент для применения в диагностике нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9. В некоторых вариантах осуществления предлагается антитело АТ14-012, необязательно содержащее одну или более мутаций Н40У, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи Т66I (нумерация по IMGT), или его функциональный участок или функциональ-

ный эквивалент для применения в диагностике меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря или мелкоклеточного рака легких.

Также предлагается способ *ex vivo* для определения того, страдает ли субъект CD9-положительным раком, включающий

приведение опухолевых клеток, взятых от упомянутого субъекта, в контакт с антителом, или функциональным участком, или функциональным эквивалентом в соответствии с изобретением,

обеспечение условий для связывания упомянутого антитела, или функционального участка, или функционального эквивалента с клетками, экспрессирующими CD9, если таковые присутствуют, и

определение наличия или отсутствия связывания клеток, экспрессирующих CD9, с упомянутым антителом, или функциональным участком, или функциональным эквивалентом, и таким образом определение того, страдает ли упомянутый субъект CD9-положительным раком.

Не имеющие ограничительного характера примеры такого CD9-положительного рака перечислены выше. В упомянутом способе предпочтительно используют антитело AT14-012, необязательно включающее одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или его функциональный участок или функциональный эквивалент. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается способ *ex vivo* для определения того, страдает ли субъект CD9-положительным раком, включающий

приведение опухолевых клеток, взятых у упомянутого субъекта, в контакт с антителом AT14-012, необязательно содержащим одну или более мутаций H40Y, Y112F и D116H и/или мутацию легкой цепи T66I (нумерация по IMGT), или его функциональным участком или функциональным эквивалентом,

обеспечение условий для связывания упомянутого антитела или функционального участка, или функционального эквивалента с клетками, экспрессирующими CD9, если таковые присутствуют, и

определение наличия или отсутствия связывания клеток, экспрессирующих CD9, с упомянутым антителом, или функциональным участком, или функциональным эквивалентом, и таким образом определение того, страдает ли упомянутый субъект CD9-положительным раком.

Как показано в примерах, антитело AT14-012 связывается по меньшей мере с 5 аминокислотами CD9, размещенными в положениях 154-181, предпочтительно 168-181 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Антитело AT14-012 связывается с эпитопом CD9, включающим аминокислоты CD9, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В частности, AT14-012 связывается с аминокислотами K169, D171, V172, L173 и F176 такой последовательности CD9. Теперь, после того как эта информация стала известной, стало возможным получать или генерировать дополнительные антитела со специфичностью к CD9. Как было описано ранее в настоящем документе, это может достигаться, например, посредством иммунизации не относящегося к человеку животного пептидом CD9, включающим по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 5 из упомянутых выше аминокислотных остатков, или пептидом CD9, состоящим по меньшей мере из 4, предпочтительно по меньшей мере из 5 упомянутых выше аминокислотных остатков, или содержащим такой пептид CD9 иммуногенным соединением, или молекулой нуклеиновой кислоты или ее функциональным эквивалентом, которая(ый) кодирует такой пептид CD9, предпочтительно с последующими одним или более стимулирующих введений. Затем от упомянутого не относящегося к человеку животного можно получать антитела и/или В-клетки, специфичные к CD9. В некоторых вариантах осуществления проводят исследование конкуренции упомянутого антитела или В-клетки с антителом AT14-012 за связывание с CD9.

В альтернативном или дополнительном варианте осуществления упомянутый пептид CD9 используют для скрининга библиотеки фагового дисплея, чтобы идентифицировать и/или выделять специфические к CD9 иммуноглобулины, как правило, Fab-фрагменты. Полученные антитела, В-клетки или Fab-фрагменты будут, как правило, конкурировать с антителом AT14-012 за связывание с CD9. В некоторых вариантах осуществления проводят испытание на конкуренцию.

Перечисленные выше пептиды CD9 и их применение также входят в объем настоящего изобретения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, длина которого составляет максимум 60 аминокислотных остатков, причем упомянутый пептид содержит по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 5 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 154-181, предпочтительно в аминокислотных положениях 168-181, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, длина которого составляет 60 аминокислотных остатков, причем упомянутый пептид включает по меньшей мере 6 аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 6 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 154-181, предпочтительно в аминокислотных положениях 168-181, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления упомянутый пептид CD9

включает 5 или 6 аминокислотных остатков, которые идентичны 5 или 6 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 169-176, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления упомянутый выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, по меньшей мере, содержит аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления упомянутый выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, по меньшей мере, содержит аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и T175 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Упомянутый пептид CD9 предпочтительно дополнительно содержит аминокислоту, соответствующую F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

При использовании в настоящем документе любой из перечисленных выше пептидов рассматривается как "пептид CD9 в соответствии с изобретением".

В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с изобретением имеет длину, составляющую максимум 55 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением имеет длину, составляющую максимум 50 аминокислотных остатков, или максимум 45 аминокислотных остатков, или максимум 40 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением имеет длину, составляющую максимум 35 аминокислотных остатков, или максимум 30 аминокислотных остатков, или максимум 25 аминокислотных остатков, или максимум 20 аминокислотных остатков, или максимум 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением имеет длину, составляющую 10 аминокислотных остатков, или 9 аминокислотных остатков, или 8 аминокислотных остатков.

Кроме упомянутых аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 6 аминокислотным остаткам, размещенным в положениях 154-181 человеческого белка CD9, как показано на фиг. 2, предпочтительно в положениях 168-181 упомянутого белка CD9, пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно включать другие аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления упомянутые другие аминокислотные остатки не являются производными последовательности CD9 человека. Упомянутые другие аминокислотные остатки, которые называются "не относящимися к CD9 аминокислотными остатками", могут, например, обладать функцией повышения стабильности и/или увеличения иммуногенности, и/или связывания пептида CD9 с другой функциональной группой, такой как, например, молекулярный каркас или носитель. К не имеющим ограничительного характера примерам такого каркаса или носителей относятся гемоцианин лимфы улитки и каркасы CLIPS (такие как, например, бис-(бромометил)бензол, трис(бромометил)бензол и тетра(бромометил)бензол, описанные в WO 2004/077062). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, длина которого составляет максимум 60 аминокислотных остатков, причем упомянутый пептид содержит по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 5 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 154-181, предпочтительно в аминокислотных положениях 168-181, как показано на фиг. 2. Упомянутый пептид предпочтительно содержит по меньшей мере 6 аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 6 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 154-181, предпочтительно в аминокислотных положениях 168-181, как показано на фиг. 2, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, более предпочтительно по меньшей мере включающие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и при этом упомянутый пептид дополнительно включает по меньшей мере 1 или по меньшей мере 2, или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50 не относящихся к CD9 аминокислотных остатков, при этом полноразмерная последовательность упомянутых не относящихся к CD9 аминокислотных остатков не присутствует в соответствующих аминокислотных положениях CD9, как показано на фиг. 2. Такой пептид предпочтительно содержит по меньшей мере 6 аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 6 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 154-181, предпочтительно в аминокислотных положениях 168-181, как показано на фиг. 2, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из K169, D171, V172, L173, T175 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, более предпочтительно по меньшей мере включающие K169, D171, V172, L173, T175 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2. Такой пептид также входит в охват термина "пептид CD9 в соответствии с изобретением". В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, длина которого составляет максимум 60 аминокислотных остатков, причем упомянутый пептид содержит по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, которые идентичны по меньшей мере 6 аминокислотным остаткам, размещенным в CD9 в аминокислотных положениях 154-181, как показано на фиг. 2, предпочтительно в аминокислотных положениях 168-181, предпочтительно по меньшей мере включающие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, более предпочтительно K169, D171, V172, L173, T175 и F176, которые связаны с другим пептидом, содержащим не относящиеся к CD9

аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9, длина которой составляет максимум 60 аминокислотных остатков, причем упомянутый пептид содержит по меньшей мере K169, D171, V172 и L173 и T175 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и предпочтительно также остаток F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, при этом упомянутый пептид связан с другим пептидом, содержащим не относящиеся к CD9 аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления упомянутые пептиды связаны друг с другом посредством пептидной связи. В других вариантах осуществления упомянутые пептиды связаны друг с другом посредством другой связи, отличной от пептидной, такой как, например, линкер.

Как известно специалисту в данной области, после получения иммуногенной последовательности стало возможным вносить в последовательность определенные изменения, тем самым предпочтительно оптимизируя иммуногенность и/или стабильность полученного иммуногена. Для этого, например, проводят процедуры мутагенеза, после которых предпочтительно исследуют стабильность и/или иммуногенность полученных соединений и отбирают наилучшее антигенное к CD9 соединение. Специалист в данной области способен генерировать варианты антигенов, начиная с определенной аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления проводят полный анализ замещений, который предусматривает замещение одного или более аминокислотных остатков любым другим аминокислотным остатком и исследование полученных соединений. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления используют консервативную аминокислотную замену. Примеры консервативных аминокислотных замен включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток и замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, такую как замена аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамина на аспарагин. Другим примером консервативных аминокислотных замен является замена треонина на серин и фенилаланина на тирозин.

Таким образом, дополнительно предлагается выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD9 в соответствии с изобретением, в котором по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из K169, D171, V172, L173, T175 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, замещен на другой аминокислотный остаток, при этом упомянутый пептид содержит аргинин в аминокислотном положении, соответствующем K169 последовательности CD9, представленной на фиг. 2, и/или глутаминовую кислоту в аминокислотном положении, соответствующем D171 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и/или аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из изолейцина, лейцина и метионина, в аминокислотном положении, соответствующем V172 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и/или аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из изолейцина, валина и метионина, в аминокислотном положении, соответствующем L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и/или серин в аминокислотном положении, соответствующем T175 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и/или тирозин в аминокислотном положении, соответствующем F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2.

Иными словами, предлагаются пептиды CD9 в соответствии с изобретением, в которых лизин в положении 169 был заменен на аргинин, и/или в которых аспарагиновая кислота в положении 171 была заменена на глутаминовую кислоту, и/или в которых валин в положении 172 был заменен на изолейцин, лейцин или метионин, и/или в которых лейцин в положении 173 был заменен на изолейцин, валин или метионин, и/или в которых фенилаланин в положении 176 был заменен на тирозин. Такие аминокислотные замены являются консервативными, так что полученные пептиды будут по-прежнему в состоянии связывать антитело AT14-012. Полученные пептиды будут также в состоянии связывать или продуцировать антитела или их функциональные участки, или их функциональные эквиваленты, которые конкурируют с антителом AT14-012 за связывание с CD9, предпочтительно с тем же эпитопом в CD9.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки пептида CD9 в соответствии с изобретением выбирают из 20 аминокислотных остатков, которые встречаются в природе в организме эукариотов, которые также называют "стандартными" или "каноническими" аминокислотами. В альтернативном варианте осуществления не встречающиеся в природе аминокислотные остатки включают в пептид CD9 в соответствии с изобретением, такие как, например, D-аминокислоты (то есть D-стереоизомеры аминокислот) или N-метил аминокислоты.

Молекулы нуклеиновых кислот или их функциональные эквиваленты, кодирующие пептид CD9 в соответствии с изобретением, также входят в объем настоящего изобретения. Таким образом, дополнительно предлагается выделенная, синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая(ый) кодирует пептид CD9 в соответствии с изобретением. Упомянутая молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент предпочтительно содержит цепь нуклеотидов, более предпочтительно ДНК, кДНК или РНК. В других вариантах осуществления упомянутая молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент включает другие виды структур нуклеиновой кислоты, такие как, например, спираль ДНК/РНК, пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), закрытая нуклеиновая кислота (ЗНК) и/или рибозим.

Упомянутые молекулы нуклеиновой кислоты или функциональные эквиваленты, например, используют для продукции пептида CD9 в соответствии с настоящим изобретением посредством системы экс-

прессии нуклеиновой кислоты, такой как, например, клетка-хозяин, например E.coli, клетки CHO, NSO или 293 (T). В некоторых вариантах осуществления упомянутая молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением присутствуют в средстве доставки генов, что обеспечивает введение упомянутой молекулы нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента в рассматриваемую клетку. Таким образом, дополнительно предлагается средство доставки генов, предпочтительно вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением. В настоящем документе также предлагается клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент в соответствии с изобретением, и/или средство доставки генов в соответствии с изобретением.

Как описано выше, пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением или молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, кодирующие пептид CD9 в соответствии с изобретением, используют, например, для получения антитела, специфического к CD9, в соответствии с изобретением, такого как, например, антитело, которое конкурирует с антителом AT14-012 за связывание с CD9. Для этого, например, проводят иммунизацию не относящегося к человеку животного упомянутым пептидом CD9 или (содержащей вектор) молекулой нуклеиновой кислоты, или функциональным эквивалентом, который(ая) кодирует пептид CD9 в соответствии с изобретением. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления проводят скрининг библиотеки фагового дисплея. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается использование пептида CD9 в соответствии с изобретением или использование молекулы нуклеиновой кислоты, или функционального эквивалента в соответствии с изобретением, или использование вектора в соответствии с изобретением для продукции, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки, такой как, например, В-клетка, и/или антитела или его функционального участка или функционального эквивалента, такого как, например, Fab-фрагмент, который специфичен к CD9. Упомянутая иммунная клетка или антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент предпочтительно в состоянии специфически связываться с клетками меланомы. Таким образом, в настоящем документе также предлагается пептид CD9 в соответствии с изобретением для применения в качестве иммуногена, а также молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, кодирующие пептид CD9 в соответствии с изобретением для применения в качестве иммуногена.

Также предлагается способ продукции иммунной клетки, специфической к CD9, или антитела, специфического к CD9, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного пептидом CD9 в соответствии с изобретением или молекулой нуклеиновой кислоты, или функциональным эквивалентом, или вектором в соответствии с изобретением. Упомянутый способ предпочтительно дополнительно включает получение иммунной клетки или антитела, специфических к CD9, от упомянутого не относящегося к человеку животного. Как отмечалось выше, упомянутая иммунная клетка или антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент предпочтительно в состоянии специфически связываться с клетками меланомы.

При этом также предлагается антитело, специфическое к CD9, или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) модно получать с помощью способа в соответствии с изобретением, а также иммунная клетка, которую можно получать с помощью способа в соответствии с изобретением. Упомянутое антитело, специфическое к CD9, функциональный участок, функциональный эквивалент или иммунная клетка предпочтительно конкурирует с антителом AT14-012 за связывание с CD9.

Упомянутое не относящееся к человеку животное предпочтительно является млекопитающим, например грызуном или особью крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления упомянутым не относящимся к человеку животным является мышь, крыса, кролик, лама, верблюд, свинья, домашняя птица, корова, коза, лошадь, обезьяна и/или горилла.

В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция, предпочтительно иммуногенная композиция, содержащая пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления упомянутый пептид CD9 связан с фармацевтически приемлемым носителем или каркасом. В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция, предпочтительно иммуногенная композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая(ый) кодирует пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция, предпочтительно иммуногенная композиция, содержащая вектор, который включает упомянутую молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент. Иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно дополнительно включает биосовместимую добавку, такую как, например, носитель, разбавитель, эксципиент или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления предлагается вакцина, содержащая пептид CD9 в соответствии с изобретением, или вакцина, содержащая соединение, которое содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, или вакцина, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая(ый) кодирует пептид CD9 в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция в соответствии с изобретением, при этом упомянутая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая дополнительно включает фар-

мацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Пептиды CD9 в соответствии с настоящим изобретением также используют для определения наличия в биологической пробе связывающих соединений, специфических к CD9, таких как, например, антитела, специфические к CD9, или иммунные клетки, специфические к CD9, такие как В-клетки или Т-клетки. Например, взятую у субъекта пробу или часть такой пробы, которая содержит антитела, В-клетки и/или Т-клетки, инкубируют с пептидом CD9 в соответствии с настоящим изобретением или с соединением, которое содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, чтобы проводить скрининг на наличие антител, специфических к CD9, и/или иммунных клеток, специфических к CD9. Если оказывается, что такие антитела или иммунные клетки присутствуют в упомянутой пробе или в части упомянутой пробы и связываются с упомянутым пептидом CD9 в соответствии с настоящим изобретением, упомянутую пробу типизируют как положительную на связывающие соединения, специфические к CD9 (то есть антитела и/или иммунные клетки).

Например, антитело, специфическое к CD9, или иммунную клетку, специфическую к CD9, обнаруживают и/или количественно определяют посредством иммуноанализа, такого как, например, вестерн-блоттинг, ИФА (захват) или РИА. Эти анализы хорошо известны в данной области. Меченые пептиды CD9 в соответствии с изобретением (необязательно в главном комплексе гистосовместимости (комплекс МНС) для обнаружения Т-клеток), например, инкубируют с пробой крови или с пробой ткани, такой как, например, проба кожи, или с частью такой пробы, содержащей антитела, В-клетки и/или Т-клетки, после чего свободные связывающие соединения смывают. Затем определяют, связаны ли упомянутые меченые пептиды CD9 в соответствии с изобретением с антителами или иммунными клетками, специфическими к CD9. В некоторых вариантах осуществления немеченый пептид CD9 в соответствии с изобретением или немеченое соединение, содержащее пептид CD9 в соответствии с изобретением (необязательно в комплексе МНС), приводят в контакт с пробой, содержащей антитела и/или иммунные клетки, такой как, например, проба крови или проба ткани, такая как, например, проба кожи, или с частью такой пробы, содержащей антитела, В-клетки и/или Т-клетки. После инкубации предпочтительно проводят одну или более стадий отмывки для удаления несвязанных антител и несвязанных иммунных клеток. Затем устанавливают, были ли антитела или иммунные клетки связаны с упомянутым пептидом CD9 в соответствии с изобретением, например, с помощью антитела, специфического к человеческим антителам или человеческим иммунным клеткам и связанного с маркером, таким как, например, флуоресцентное соединение или, например, пероксидаза из хрена или щелочная фосфатаза. После дополнительной стадии отмывки предпочтительно устанавливают, было ли связано второе антитело, например, посредством измерения испускаемого света или добавления субстрата пероксидазы из хрена или щелочной фосфатазы. Эти способы обнаружения хорошо известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с изобретением или соединение, или композицию, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением (необязательно в комплексе МНС), приводят в контакт с частью пробы, которая была обогащена антителами и/или иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления упомянутая часть представляет собой культуру В-клеток *in vitro* или культуру Т-клеток *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с изобретением или соединение, или композицию, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, приводят в контакт с антителами и/или иммунными клетками, которые были по существу очищены из биологической пробы, такими как, например, очищенная фракция В-клеток, которая была получена селекцией CD19-положительных клеток, и/или фракция антитела/В-клеток, которая была очищена с использованием антитела к Ig или способом очистки с использованием белка А или G. Способы очистки с использованием белка А или G хорошо известны в данной области, а протоколы и реагенты доступны в продаже. В настоящем документе термин "иммунные клетки, по существу очищенные из пробы" означает, что по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток полученной фракции представляют собой иммунные клетки. В настоящем документе термин "антитела, по существу очищенные из пробы" означает, что по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% массы полученной фракции состоит из антител.

Таким образом, дополнительно предлагается использование пептида CD9 в соответствии с изобретением или использование соединения или композиции, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, для связывания и/или обнаружения иммунной клетки, специфической к CD9, и/или антитела, специфического к CD9, или его функционального участка или функционального эквивалента. Упомянутая иммунная клетка и/или антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент предпочтительно в состоянии специфически связываться с CD9-положительными опухолевыми клетками, такими как, например, клетки меланомы. При этом также предлагается пептид CD9 в соответствии с изобретением или соединение, которое содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, для применения в качестве функциональной группы для обнаружения связывающих соединений, специфических к CD9, таких как антитела и/или иммунные клетки, а также способ определения того, содержатся ли в пробе антитела, специфические к CD9, и/или иммунные клетки, специфические к CD9,

включающий инкубирование пептида CD9 в соответствии с изобретением или соединения, или композиции, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, с упомянутой пробой или с частью упомянутой пробы, которая содержит антитела и/или иммунные клетки, с последующим определением того, связывается ли упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением с антителами, специфическими к CD9, и/или иммунными клетками, специфическими к CD9, или того, связывается ли упомянутое соединение, которое содержит упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением, с антителами, специфическими к CD9, и/или с иммунными клетками, специфическими к CD9. При обнаружении такого связывания делают вывод о том, что упомянутая проба содержит антитела, специфические к CD9, и/или иммунные клетки, специфические к CD9, например антитела и/или иммунные клетки, которые в состоянии специфически связываться с CD9-положительными опухолевыми клетками, например, клетками меланомы.

Также предлагается способ определения того, содержит ли проба антитела, специфические к CD9, и/или иммунные клетки, специфические к CD9, включающий инкубирование пептида CD9 в соответствии с изобретением или соединения, которое содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением (не обязательно в комплексе МНС), с антителами и/или иммунными клетками, которые были по существу очищены из упомянутой пробы, с последующим определением того, связан ли упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением с антителами, специфическими к CD9, и/или иммунными клетками, специфическими к CD9, или того, связано ли упомянутое соединение, которое содержит упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением, с антителами, специфическими к CD9, и/или иммунными клетками, специфическими к CD9.

В некоторых вариантах осуществления результаты испытаний обнаружения, как описано выше, используют для определения того, страдает ли субъект заболеванием, связанным с клетками, экспрессирующими CD9. Например, если оказывается, что в пробе, взятой у субъекта, исследуемого на наличие CD9-положительной опухоли, содержатся иммунные клетки, специфические к CD9, и/или антитела, специфические к CD9, можно сделать вывод о том, что упомянутый субъект страдает от CD9-положительной опухоли, такой как, например, меланома. Упомянутая проба предпочтительно содержит опухолевые клетки. Например, для исследования присутствия клеток меланомы предпочтительно используют биопсию области кожи с подозрением на меланому. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления для выявления CD9-положительных опухолевых клеток также используют пробу крови или пробу лимфатического узла, поскольку метастазы часто циркулируют в крови и в лимфатической системе.

Таким образом, также предлагается пептид CD9 в соответствии с изобретением для применения в качестве диагностического агента, а также соединение или композиция, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, для применения в качестве диагностического агента. Дополнительно предлагается использование пептида CD9 в соответствии с изобретением для диагностики нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, такого как, например, CD9-положительная опухоль, или остеопороз, или артрит, или воспаление легких, или ХОЗЛ, или колит, или нарушение, связанное с врожденными лимфоидными клетками, а также использовать соединение или композицию, которое (-ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, для диагностики нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, такого как, например, CD9-положительная опухоль, или остеопороз, или артрит, или воспаление легких, или ХОЗЛ, или колит, или нарушение, связанное с врожденными лимфоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления упомянутый CD9-положительный рак представляет собой меланому. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается пептид CD9 в соответствии с изобретением для применения в диагностике меланомы, а также использование пептида CD9 в соответствии с изобретением для приготовления диагностического набора для диагностики меланомы.

Дополнительно предлагается диагностический набор, включающий пептид CD9 в соответствии с изобретением или соединение, или композицию, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, и средства обнаружения связанного с антителом пептида CD9 или связанного с иммунной клеткой пептида CD9.

К таким средствам, например, относятся меченые антитела, которые специфичны к человеческим антителам или человеческим иммунным клеткам. В некоторых вариантах осуществления упомянутые меченые антитела конъюгированы с пероксидазой из хрена или щелочной фосфатазой.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ обнаружения CD9-положительной опухоли у субъекта, включающий приведение пептида CD9 в соответствии с изобретением или соединения, или композиции, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением (не обязательно в комплексе МНС), в контакт с антителами и/или иммунными клетками упомянутого субъекта и определение того, связан ли упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением или упомянутое соединение, или композиция, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, по меньшей мере с одним из упомянутых антител и/или иммунных клеток упомянутого субъекта. Если упомянутый пептид CD9 или упомянутое соединение в соответствии с изобретением связываются антителами и/или иммун-

ными клетками упомянутого субъекта, делают вывод о том, что упомянутый субъект имеет CD9-положительную опухоль. В некоторых вариантах осуществления упомянутая CD9-положительная опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 в соответствии с изобретением или соединение, содержащее пептид CD9 в соответствии с изобретением, приводят в контакт с пробой, содержащей антитела и/или иммунные клетки упомянутого субъекта, такой как, например, проба крови или проба костного мозга, или материал для биопсии, такой как, например, кожная ткань. В других вариантах осуществления пептид CD9 или соединение в соответствии с изобретением приводят в контакт с частью пробы от упомянутого субъекта, при этом упомянутая часть содержит иммунные клетки и/или антитела. В некоторых вариантах осуществления пептид CD9 или соединение в соответствии с изобретением приводят в контакт с антителами и/или иммунными клетками, которые были по существу очищены из упомянутой пробы, такими как, например, очищенная фракция В-клеток, которая была получена селекцией CD19-положительных клеток, и/или фракция антитела/В-клеток, которая была очищена с использованием антитела к Ig или способом очистки с использованием белка А или G.

Другим интересным применением новых пептидов CD9 в соответствии с настоящим изобретением и кодирующих их молекул нуклеиновой кислоты и функциональных эквивалентов является иммунотерапия. Например, пептид CD9 в соответствии с настоящим изобретением или кодирующие его молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент используют для лечения CD9-положительной опухоли. Используемый в настоящем документе термин "лечение" включает смягчение по меньшей мере одного симптома и/или, по меньшей мере, временное замедление или остановку прогрессирования заболевания. В одном предпочтительном варианте осуществления пептид CD9 в соответствии с изобретением или кодирующую его молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или соединение, или композицию, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, вводят пациенту, страдающему CD9-положительным раком, чтобы стимулировать его/ее иммунную систему, обеспечивая более эффективный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления интактные Т-клетки или В-клетки от пациента с CD9-положительным раком культивируют *ex vivo* и инкубируют с пептидом CD9 или соединением в соответствии с изобретением, необязательно в комплексе МНС в случае культуры Т-клеток, чтобы получать Т-клетки или В-клетки, специфические к CD9, которые впоследствии вводят пациенту, необязательно после экспансии *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления упомянутый CD9-положительный рак представляет собой меланому.

В некоторых вариантах осуществления используют адоптивную клеточную терапию. Т-клетки от пациента с CD9-положительным раком предпочтительно испытывают на связывание или активацию с использованием пептида CD9 в соответствии с изобретением в комплексе МНС или с использованием соединения или композиции, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением в комплексе МНС. Т-клетки, распознающие упомянутый пептид CD9, подвергают экспансии *ex vivo* с последующим введением пациенту, что будет вызывать Т-клеточный ответ на CD9.

В некоторых вариантах осуществления используют адоптивную клеточную терапию донорскими лимфоцитами. Донорские Т-клетки, выделенные у пациента с CD9-положительным раком, получавшего аллогенную трансплантацию гематопозитических стволовых клеток (HSCT), или выделенные у донора HSCT, предпочтительно испытывают на связывание или активацию CD9 с использованием пептида CD9 в комплексе МНС или соединения, содержащего пептид CD9 в соответствии с изобретением в комплексе МНС, и донорские Т-клетки, распознающие упомянутый пептид CD9, подвергают экспансии *ex vivo* с последующим введением пациенту, что будет вызывать аллогенный Т-клеточный ответ на CD9.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки модифицируют с обеспечением связывающей функциональной группы, специфической к CD9. Упомянутые Т-клетки предпочтительно получают от пациента с CD9-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления получают Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Такие Т-клетки с модифицированными Т-клеточными рецепторами, которые наделяют желательной специфичностью связывания, предпочтительно получают из антитела. Как правило, Т-клетки с CAR продуцируют слиянием одноцепочечных варибельных доменов (scFv), полученных из моноклонального антитела, с трансмембранным доменом CD3-дзета таким образом, что при распознавании мишени scFv будет возникать дзета-сигнал.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептид CD9 в соответствии с изобретением или кодирующую его молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или соединение, или композицию, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, используют для продукции и/или выделения антитела и/или В-клетки, специфических к CD9, которые, в свою очередь, применяют для продукции модифицированной Т-клетки. Например, упомянутый пептид CD9 или соединение, или молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент используют, чтобы вызывать образование, обнаруживать и/или выделять антитело или В-клетку, специфические к CD9. Впоследствии в некоторых вариантах осуществления на Т-клетках формируют варибельные домены тяжелой цепи и/или легкой цепи упомянутого антитела, специфического к CD9, образуя модифицированные Т-клетки со специфичностью к CD9. В некоторых вариантах осуществления такие модифицированные Т-клетки затем вводят пациенту с CD9-положительным раком, что будет приводить к опухолес-

специфическому Т-клеточному ответу. В некоторых вариантах осуществления упомянутые модифицированные Т-клетки представляют собой Т-клетки с CAR. В некоторых вариантах осуществления упомянутые антитела или В-клетки, специфические к CD9, испытывают на конкуренцию с антителом AT14-012 за связывание с CD9 до формирования переменных доменов тяжелой цепи и/или легкой цепи упомянутых антител на Т-клетках. Такие конкурирующие антитела предпочтительно выбирают для продукции модифицированных Т-клеток со специфичностью к CD9.

Таким образом, дополнительно предлагается пептид CD9 в соответствии с изобретением или соединение, или композиция, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, или молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая(ый) кодирует пептид CD9 в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства. Также предлагается использование пептида CD9 в соответствии с изобретением (необязательно в комплексе МНС) или использование соединения, или композиции, которое(ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением (необязательно в комплексе МНС), или использование молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, которая(ый) кодирует упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением, для продукции Т-клеток, специфических к CD9. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ продукции модифицированных Т-клеток, включающий приведение содержащей антитела пробы или содержащей В-клетки пробы от пациента с CD9-положительным раком в контакт с пептидом CD9 или соединением в соответствии с изобретением, приводящее к связыванию антител или В-клеток с CD9 с последующим получением одного или более доменов, специфических к CD9, из упомянутых антител или В-клеток, специфических к CD9, и формированием упомянутых одного или более доменов на Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ продукции модифицированной Т-клетки, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного пептидом CD9 или соединением, или молекулой нуклеиновой кислоты, или функциональным эквивалентом в соответствии с изобретением, вызывающую иммунный ответ на CD9, с последующим получением одного или более доменов, специфических к CD9, от антитела, специфического к CD9, или В-клетки, специфической к CD9, от упомянутого не относящегося к человеку животного, или получением одной или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих упомянутые один или более доменов, специфических к CD9, а также обеспечением упомянутого одного или более доменов или одной или более нуклеотидных последовательностей в Т-клетке.

Наряду с этим также предлагается пептид CD9 в соответствии с изобретением для применения в иммунотерапии, а также молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, которая(ый) кодирует пептид CD9 в соответствии с изобретением, для применения в иммунотерапии. При этом также предлагается соединение или композиция, содержащие пептид CD9 в соответствии с изобретением, для применения в иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления предлагается использование пептида CD9 в соответствии с изобретением или использование соединения или композиции, которое(-ая) содержит пептид CD9 в соответствии с изобретением, или использование молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, которая(ый) кодирует пептид CD9 в соответствии с изобретением, для приготовления лекарственного средства против нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, такого как, например, CD9-положительная опухоль или остеопороз, или артрит, или воспаление легких, или ХОЗЛ, или колит, или нарушение, связанное с врожденными лимфоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления упомянутая CD9-положительная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких.

В некоторых вариантах осуществления результаты испытаний обнаружения в соответствии с изобретением, как описано выше в настоящем документе, используют для определения того, наблюдается ли у субъекта регистрируемый иммунный ответ на CD9-положительную опухоль, такую как, например, меланома. Например, это является предпочтительным, чтобы определять, сформировался ли противоопухолевый иммунный ответ у страдающего от такой опухоли пациента, который получал иммунотерапию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается способ определения того, демонстрирует ли субъект иммунный ответ на CD9-положительную опухоль, включающий приведение пептида CD9 в соответствии с изобретением (необязательно в комплексе МНС) или соединения, или композиции, которое(ая) включает упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением, в контакт с антителами и/или иммунными клетками упомянутого субъекта, и определение того, связывается ли упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением или упомянутое соединение, или упомянутая композиция, которое(ая) включает упомянутый пептид CD9 в соответствии с изобретением, по меньшей мере с одним из упомянутых антител и/или иммунных клеток упомянутого субъекта. Если упомянутый пептид CD9 или упомянутое соединение оказывается связанным, это означает, что упомянутый субъект демонстрирует иммунный ответ на CD9-положительную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления для лечения меланомы используют выделенное, рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с CD9. Как описано в примерах, антитело АТ14-012 было получено от страдающего меланомой пациента в стадии полной ремиссии, что подтверждает эффективность АТ14-012 против меланомы. Поэтому также будут эффективны антитела, которые конкурируют с АТ14-012 за связывание с CD9. Следовательно, введение таких антител страдающему меланомой пациенту будет эффективно противодействовать клеткам меланомы и/или уничтожать их. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для применения в качестве лекарственного препарата предлагается выделенное, рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с CD9. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для приготовления лекарственного препарата предлагается выделенное, рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с CD9.

Также предлагается выделенное, рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональный участок или функциональный эквивалент, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание с CD9, для применения в способе для по меньшей мере частичного лечения или предотвращения меланомы, а также использование выделенного, рекомбинантного или очищенного антитела или его функционального участка или функционального эквивалента, которое(ый) конкурирует с антителом АТ14-012 за связывание CD9, для приготовления лекарственного препарата против меланомы.

Несмотря на то, что в настоящей заявке признаки могут быть описаны как часть одного и того же варианта осуществления или как части отдельных вариантов осуществления, в объем настоящего изобретения также входят варианты осуществления, включающие любую комбинацию всех или некоторых признаков, описанных в настоящем документе.

Изобретение дополнительно описано в следующих примерах. Такие примеры не ограничивают объем изобретения, но служат исключительно для разъяснения изобретения.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1. Схематическая структура человеческого CD9.

Фиг. (1a). Схематическое представление человеческого тетраспанина CD9 Структура тетраспанинов характеризуется четырьмя протяженными трансмембранными областями и двумя внеклеточными петлями: малой внеклеточной петлей 1 (EC1) и большой внеклеточной петлей 2 (EC2). EC2 CD9 структурно и конформационно определяется двумя цистеиновыми связями (красный) (C152-C181 и C153-C167) и консервативными соседними остатками (G154 и P168). Две области с высокой вариабельностью у представителей семейства тетраспанинов размещены между аминокислотными положениями 154-167 и 168-181 (выделены фиолетовым).

Фиг. (1b). Примерное графическое представление второй внеклеточной петли. Графическое представление второй внеклеточной петли, поделенной на 5 различных областей и показанной с соответствующими номерами аминокислот. Такие области выбраны на основании перекрытия с другими представителями семейства тетраспанинов, например CD81. Эти области дополнительно описаны в исследованиях картирования эпитопа (фиг. 5).

Фиг. 2. Аминокислотная последовательность человеческого CD9 (UniProt № P21926)

Фиг. 3. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности антитела АТ14-012.

Нумерация CDR приводится в соответствии с Kabat et al. (1991).

Фиг. 4. Идентификатор мишени

Фиг. (4a). АТ14-012 взаимодействует с антигеном, имеющим массу ~ 25 кДа. Проводили вестерн-блоттинг для определения связывания АТ14-012 с лизатами (50 мкг) клеточных линий Сасо2, MelBLM и контроля HL-60 в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях (см. раздел "Материалы и способы" в примере 2). АТ14-012 демонстрирует реакционную способность в отношении антигена, имеющего массу ~ 25 кДа, и утрачивает ее, если пробы будут восстановленными, а значит, АТ14-012 реагирует с конформационным эпитопом.

Фиг. (4b). Масс-спектрометрический анализ иммунопреципитации с АТ14-012 на линиях раковых клеток указывает на CD9 как на мишень. АТ14-012, меченное биотинилированной сортозой, или контроль АТ10-002 инкубировали с лизатами Сасо2, MelBLM или контроля HL-60. Проводили гель-электрофорез элюатов после иммунопреципитации и окрашивали кумасси голубым для визуализации линии, имеющей массу ~ 25 кДа, перекрывающейся с результатами вестерн-блоттинга. Посредством масс-спектрометрического анализа выявили, что CD9 является антигеном АТ14-012. Посредством МС-анализа обнаруживали осажденный CD9 для клеточной линии MelBLM, а также тот факт, что CD9 не обнаруживался в элюатах HL-60.

Фиг. (4c). Подтверждение CD9 с использованием коммерческого антитела ALB6. Элюаты иммунопреципитации проявляли реакционную способность в отношении АТ14-012 и антител ALB6 к CD9, что подтверждало тот факт, что CD9 является антигеном-мишенью для АТ14-012, тогда как для элюатов им-

мунопреципитации лизатов HL-60 не отмечалось никакой реакционной способности.

Фиг. 5. Картирование эпитопа

Фиг. (5a). Картирование эпитопов гибридными или замещенными мутантами показывает, что внеклеточная петля 2 (EC2) и более специфическая область 154-180 являются главным эпитопом для AT14-012. Картирование эпитопов показало, что внеклеточная петля 2 включает эпитопы всех антител к CD9. AT14-012 демонстрировало потерю связывания с вариабельными петлями m3 и m4 CD9.

Фиг. (5b). Картирование эпитопов аланиновым сканированием области m4 в EC2. Реакционная способность HI9a, ALB6 и AT14-012 (с меткой Alexa647) по отношению к аланиновым мутантам области m4. HI9a использовали в качестве положительного контроля. F176 являлся единственным остатком, который демонстрировал потерю связывания с обоими антителами. Дополнительные 5 остатков демонстрировали потерю связывания с AT14-012 (K169, D171, V172, L173 и T175).

Фиг. 6. Связывание с опухолевыми клетками.

Фиг. (6a). AT14-012 обладает широкой связывающей реакционной способностью по отношению к солидным опухолям. Сравнительный анализ связывания антител AT14-012 и AT10-002 с панелью клеточных линий солидной опухоли методом проточной цитометрии.

Фиг. (6b). AT14-012 связывается с выборочным числом клеточных линий острого миелоидного лейкоза. Сравнительный анализ связывания антител AT14-012 и CD30 с панелью клеточных линий ОМЛ методом проточной цитометрии.

Фиг. (6c). AT14-012 связывается с выборочным числом клеточных линий множественной миеломы. Сравнительный анализ связывания CD9 и неокрашенного и антител AT14-012 и AT10-002 с панелью клеточных линий ММ методом проточной цитометрии.

Фиг. 7. Связывание со здоровыми клетками

Фиг. 7a. AT14-012 более прочно связывается с клетками меланомы по сравнению с первичными меланоцитами. Анализ связывания AT14-012 с клетками меланомы и первичными меланоцитами. AT10-002 (к вирусу гриппа) включали в качестве отрицательного контроля, панитумумаб (антитело к EGFR1) представлял собой положительный контроль связывания со здоровыми клетками. После окрашивания первичным антителом клетки метили антителом к IgG-PE для визуализации посредством проточной цитометрии.

Фиг. 7b. AT14-012 более прочно связывается с клетками карциномы толстой кишки по сравнению с первичными эпителиальными клетками толстой кишки. Анализ связывания CD9 PE и AT14-012 A647 с клеточными линиями карциномы толстой кишки и первичными эпителиальными клетками толстой кишки методом проточной цитометрии. AT10-002 A647 (к вирусу гриппа) включали в качестве отрицательного контроля, антитело к CD81 PE использовали для подтверждения отсутствия экспрессии CD9 на клетках Colo-320.

Фиг. 7c. AT14-012 более прочно связывается с клетками меланомы по сравнению с первичными лимфоцитами миндалин. Лимфоциты миндалин окрашивали антителами к CD4, CD8 и CD9, чтобы различать CD4 T-, CD8 T- и CD19 B-клетки соответственно.

Фиг. 8. Тромбоциты

Фиг. 8a. AT14-012 связывается с тромбоцитами человека. Фиксированные или нефиксированные тромбоциты здорового человека окрашивали CD41, CD9 или AT14-012 биотин/SA-РeCy7. Отбирали гистограммы для CD41-положительных.

Фиг. 8b. AT14-012 активирует здоровые тромбоциты. Поверхностную экспрессию CD62P определяли проточной цитометрией на PRP с инкубированием с TRAP (пептид положительного контроля), ALB6 (мышинное антитело IgG1 положительного контроля), FLAG (мышинное антитело IgG1 отрицательного контроля), антителами AT10-002 или AT14-012.

Фиг. 8c. AT14-012 не вызывает агрегацию тромбоцитов. Цельную кровь инкубировали с различными стимулирующими добавками и испытывали на предмет агрегации тромбоцитов, которую оценивали с помощью мультипланшетного ридера.

Фиг. 9. Эксперименты *in vivo*

Фиг. 9a. AT14-012 ингибирует метастатическое поражение лимфатического узла *in vivo*. Мышам линии NSG с подкожно трансплантированными с обоих боков 500 000 клеток меланомы MelBLM GFP/люцифераза вводили AT14-012 или контрольное антитело AT10-002. Метастазы в лимфатическом узле, обозначенные стрелками, визуализировали с использованием биолюминесцентного визуализатора после введения люциферина с последующей экспозицией внутренних органов.

Фиг. 9b. AT14-012 угнетает рост первичной опухоли меланомы *in vivo*. Мышам линии NSG с подкожно трансплантированными с обоих боков 200 000 клеток меланомы MelBLM GFP/люцифераза с момента начала эксперимента вводили AT14-012 или контрольное антитело AT10-002. Рост опухоли определяли по измерениям штангенциркулем.

Фиг. 9c. AT14-012 распознает опухолевые клетки меланомы *in vivo*. Подкожные опухоли MelBLM, полученные от мышей NSG, обработанные AT10-002 (к вирусу гриппа) или AT14-012, или оставленные без обработки, заливали в парафиновые блоки. Для иммуногистохимического исследования срезы окрашивали помеченными HRP антителами к лямбда или каппа.

Фиг. 9D. Снижение уровней поверхностного CD9 после обработки AT14-012. Подкожные опухоли Me1BLM, полученные от мышей NSG, обработанные AT14-012 или контрольным антителом AT10-002, расщепляли и окрашивали для проточной цитометрии AT10-002-биотином, AT14-012-биотином, затем стрептавидином, конъюгированным с флуоресцентной меткой, или мечеными напрямую H19a CD9 или антителами к IgG. Измерения образцов проводили с помощью FortessaX20 (Becton Dickinson).

Фиг. 9E-G. AT14-012 угнетает рост клеток меланомы SK-MEL-5. Мышам NSG с подкожной опухолью меланомы SK-MEL-5 вводили AT14-012 или контрольное антитело AT10-002. E. Рост опухоли во времени определяли по измерениям штангенциркулем. Затененная область указывает на период времени введения антитела. F. Выделенные опухоли взвешивали *ex vivo*. Вес усредняли на каждую отдельную мышшь. G. Опухоли расщепляли посредством обработки либеразой и окрашивали CD9 H19a-PE для проточной цитометрии.

Фиг. 10. Связывание AT14-012 коррелирует с экспрессией CD9 в линиях опухолевых клеток с коротким периодом развития. Анализ связывания AT14-012 и CD9 H19a с молодой культурой клеток меланомы посредством проточной цитометрии. A. Гистограммы окрашивания клеток меланомы антителами CD9 H19a, AT14-012 и AT10-002 к вирусу гриппа (контроль). B. Средние интенсивности флуоресценции сигналов AT14-012 по сравнению с CD9 H19a с коррекцией на окрашивание фона. Стрелками обозначены пробы меланомы Me106.07 и Me105.18, полученные от исходного пациента с AT14-012. C. Анализ связывания AT14-012 и CD9 H19a со стабильными клеточными линиями (PANC01 и CAPAN2) и свежесобранными у пациента опухолевыми клетками карциномы поджелудочной железы (53M и 193) посредством проточной цитометрии.

Фиг. 11. Связывание AT14-012 ограничивается (не) относящимися к человеку приматами. Обогащенную тромбоцитами плазму, выделенную из A. мышей NOD SCID  $\gamma$ c<sup>-/-</sup>(NSG); B. новозеландских белых кроликов; C. макак-крабоедов (яванских макак) и человека электронным образом исследовали на наличие экспрессирующих CD41 тромбоцитов. Связывание AT10-002, AT14-012 и антитела к CD9 с тромбоцитами соответствующих видов определяли посредством проточной цитометрии.

Фиг. 12. Антителозависимая цитотоксичность (ADCC). Меченные хромом A. Me1BLM или эндотелиальные клетки артерии человека, или B. первичные молодые культуры клеток меланомы, инкубированные с указанными антителами, титровали на суммарные РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) человека. Гибель клеток устанавливали по высвобождению хрома в супернатанте.

Фиг. 13. AT14-012 приводит в действие механизм опосредованной комплементом гибели опухолевых клеток. A, B. Линии клеток меланомы инкубировали с указанными антителами и человеческой плазмой с последующим исследованием на отложение C1q посредством проточной цитометрии с использованием антитела к C1q. Опосредованную комплементом цитотоксичность определяли посредством инкубирования C. суспензии или D. прикрепленных в течение ночи клеток меланомы к указанным антителам и комплементу кролика. E. Инкубирование CD55-положительных (Me1BLM) и CD55-отрицательных (Colo-205) клеток с указанными антителами и человеческой плазмой. Процент гибели клеток в суспензии прикрепленных клеток определяют при окрашивании DAPI посредством проточной цитометрии или при окрашивании TO-PRO3 посредством микроскопии соответственно. Фиг. 14. AT14-012 более эффективно связывается с гомокластерами CD9. Две клеточных линии меланомы и одну клеточную линию карциномы толстой кишки инкубировали с ингибитором пальмитилирования 2-BP или DMSO в течение всего 36 часов. A. Клетки отделяли и окрашивали для проточной цитометрии с контрольным антителом AT10-002 к вирусу гриппа или различными антителами CD9, AT14-012 или коммерческими клонами H19a и ALB6. B. Среднюю интенсивность флуоресценции на гистограммах сигналов AT 10-002 вычитали из СИФ сигналов CD9. Соотношение представляет собой разность значений ЛСИФ для условий в DMSO, поделенную на соответствующую разность ЛСИФ значений 2-BP и нанесено на график для различных клеточных линий. Равное 1 соотношение означает, что депальмитилирование не влияет на связывание антитела.

Фиг. 15. Аланиновое сканирование области m3, экспрессированной на клетках HL60, не указывало на какое-либо ухудшение связывания AT14-012 (n=2). Неожиданно было обнаружено, что замена единичных аминокислот в области m3 не нарушает связывания AT14-012. В качестве контроля использовали CD9 дикого типа, гибридный мутант CD9/CD81 EC2, гибридный мутант EC2 m3 CD9/CD81, и данные связывания свидетельствуют о совпадении с ранее представленными данными (фиг. 5).

Фиг. 16. AT14-012 обладает более низкой аффинностью к CD9 по сравнению с коммерческими мышьями антителами к CD9. A. Сравнивали связывание CD9 с AT14-012 (+ контроль AT10-002) и коммерческими антителами H19a и ALB6 (+ контроль анти-FLAG для обнаружения наличия белка CD9 на планшете и контроль ОКТ3). B. Кривые ППР, демонстрирующие связывание антител к CD9 AT14-012, ALB6 и H19a для различных введений антитела для белка CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотин в одной лунке. C. Измерение аффинности различных антител к человеческому CD9 в соответствии с определением по ППР.  $k_a$  в  $10^4 \text{ c}^{-1} * \text{M}^{-1}$ ,  $k_d$  в  $10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ,  $K_D$  в пМ. Приводятся результаты для CD9 в одной лунке с покрытием 7324 RU рекомбинантным белком CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотин (0,5 мкг/мл). Для расчета кинетики связывания данные по трем повторным введениям обрабатывали по модели связывания 1:1. Приводятся средние значения и стандартные отклонения для измерений по трем лункам с покрытием 0,5 или 1,0 мкг/мл CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотина. \* Если наблюдаемая скорость дис-

социации антитела (KD) была слишком низкой для точной обработки, использовали величину  $0,1 * 10^{-5}$ . Приводятся средние значения двух титрований по двум лункам, обе с покрытием 0,5 мкг/мл CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотина. Для расчета кинетики связывания использовали данные по трем повторным введениям.

Фиг. 17. K169, D171, VI72, L173 и F176 являются частью эпитопа AT14-012. А. Данные ИФА для связывания AT14-012 (треугольники, нижняя линия на всех графиках), ALB6 (кружки) и H19a (квадраты) с рекомбинантно экспрессированными аланиновыми мутантами m4. В. Проекция эпитопа AT14-012 на гомологичную модель CD9 (EC обозначает внеклеточную, а IC обозначает внутриклеточную ориентацию). Гомологичную модель строили с помощью сервера I-Tasser (Yang et al., 2015) с использованием гомологичной модели CD81 (2AVZ; Seigneuret et al., 2006). По состоянию на ноябрь 2016 г. была опубликована кристаллическая структура (Zimmerman et al., 2016), и построенная на основании такой кристаллической структуры новая гомологичная модель CD9 не указывала на какие-либо изменения относительно ориентации остатков, связанных с эпитопом AT14-012. С. Данные цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) о связывании AT14-012 с клетками различных видов (см. фиг. 11) и выравнивание последовательности CD9 (остатки 23-228) от нескольких видов (приводится здесь) усиливают аргументы в пользу эпитопа AT14-012. Последовательности были взяты с веб-сайта [ensembl.org](http://ensembl.org) примерно в июне 2016 г.. Первые 22 остатка для всех найденных видов не были должным образом выделены, а потому исключались из приведенного в настоящем документе описания. Известно, что AT14-012 реагирует с клетками яванского макака, при этом происходит потеря связывания при анализе связывания с клетками кролика или мыши. Выделено (светло-серый) выравнивание области m4, ограниченной C167 и C182 (зеленый), в частности, 5 остатков (темно-серый), задействованных при связывании AT14-012. Очевидно, что мутация F176L не вызывает потери связывания AT14-012 (см. связывание AT14-012 с клетками яванского макака на фиг. 11С).

Фиг. 18. Повышение аффинности AT14-012 за счет использования сортировки одиночных клеток для В-клеток 2H15 и ППР (IBIS). А. Кривые ПНР 8 последовательных введений рекомбинантного AT14-012 с возрастающими концентрациями (0-1,33-4,0-13,30-40,0 -133,0-и 0 нМ белка). Зеленая линия указывает на (отсутствующую) реакционную способность связывания по отношению к CD81, оранжевая - связывания с антителом к человеческому IgG-Fc, серая - связывания с нанотелом к CH1 и синяя - связывания с CD9. Соотношение анти-IgG-Fc и аCH1 можно использовать для отслеживания концентрации и целостности IgG в супернатанте В-клеток (см. В). В. После скрининга 800 клонов в ППР, как описано в разделе "Материалы и способы", вновь проводили анализ связывания для супернатантов вновь выросших В-клеток. Увеличилась популяция восьми клонов (1D5, 1F5, 2D12, 4H10, 6E10, 9E5, 10B9 и 10D1), тогда как это, в конечном счете, не наблюдалось для 4 сомнительных клонов (1C9, 2H10, 9A9, 9D12). В начале и в конце для сравнения проводили введение рекомбинантного AT14-012. С. Анализ последовательностей найденных клонов, включая аффинности, показывает перекрывание мутаций, связанных с их профилями ассоциации/диссоциации. В группе 1 отмечается более быстрая ассоциация и более медленная диссоциация, в группе 2 - более быстрая ассоциация и диссоциация, а в группе 3 не выявлено четких различий по сравнению с последовательностями дикого типа (1G2, 1G3, 1G4, 1G5).

Фиг. 19. Конструирование, экспрессия и анализ связывания мутантов AT14-012 с более высокой аффинностью с клетками и в ППР. А. Поскольку наиболее важные мутации размещались только на тяжелой цепи, приводятся выравнивания только для тяжелой цепи. Кроме того, проводились комбинации для группы 1 (красный; H40Y и Y112F) и группы 2 (небесно-голубой; D116H и T29N) и для обеих групп одновременно (H40Y, Y112F, D116H и T29N). В качестве контроля для проверки результатов добавляли одну мутацию, приводящую к нарушению связывания CD9 (темно-синий; G110D). Гипермутации исходного AT14-012/2H15 выделены желтым. Нумерация CDR в соответствии с системой нумерации IMGT (Lefranc 1997, Lefranc 1999 и Lefranc et al. 2003). В-С. MelWBO или молодые культивированные здоровые меланоциты из клеток двух различных доноров инкубировали с супернатантом для продукции CHO различных вариантов AT14-012. Связывание обнаруживали посредством проточной цитометрии с использованием вторичного антитела козы к человеческому IgG-PE. D-E. Супернатант для продукции CHO различных вариантов AT14-012 анализировали ППР на чипах с покрытием CD9 (приводятся повторные эксперименты). #=супернатант для продукции CHO. Аффинности приводятся как  $k_a$  в  $10^4 \text{ c}^{-1} * \text{M}^{-1}$ ,  $k_d$  в  $10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ,  $K_D$  в нМ. Приводятся средние значения двух титрований по двум лункам, обе с покрытием 0,5 мкг/мл CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотина. Образцы мутантов представляли собой неочищенный супернатант для продукции с разбавлением 1x в фосфатно-солевом буфере с твином (PBST). Знак "-": связывание не обнаружено; "\*": связывание обнаружено, но приемлемая обработка невозможна.

Фиг. 20. Анализ агрегации тромбоцитов с использованием мутантов AT14-012 с высокой аффинностью. В качестве контроля использовали TRAP, ALB6 и ранее исследованные рекомбинантные очищенные AT14-012 IgG1 и IgG3 полной длины, в том числе контрольное антитело AT10-002 IgG1.

Фиг. 21. Продуктивное В-клетками антитело AT14-012/2H15 относится к аллотипу IGHG3\*16. мРНК выделяли из В-клеток AT14-012/2H15. За основу взята фигура из работы Vidarsson et al., 2014.

Фиг. 22. AT14-012 в комбинации с антителом к PD1 ингибирует рост опухоли in vivo. Мышам NSG с иммунной системой человека подкожно трансплантировали экспрессирующие люциферазу опухолевые

клетки меланомы SK-MEL-5. Мыши получали указанные антитела дважды в неделю. А. Рост опухоли определяли посредством визуализации люциферазы. Затененная область указывает на период введения антител. В. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали на основании размеров опухоли на момент завершения эксперимента и размеров опухоли на момент первого введения антитела.

### Примеры

Пример 1. Выделение клона В-клетки AT14-012

#### Материалы и способы

Клеточные культуры меланомы.

Клеточные линии меланомы MelBLM, Mel136.2 и MelWBO были предоставлены Rosalie Luiten (Academic Medical Centre, Dept. of Dermatology) и выдерживались в IMDM (Life Technologies), 8%-ной фетальной телячьей сыворотке с использованием стандартных методик культивирования тканей. Для минимального воздействия на белки клеточной поверхности опухолевые клетки отделяли с использованием акутазы (Life Technologies) или EDTA.

PBMC донора меланомы.

Протоколы исследования были утверждены Medical Ethical Committee of the Leiden University Medical Center. Пациент с меланомой IV стадии получал лечение адоптивным переносом аутологичных полученных из крови Т-клеток, специфических к опухоли, в комбинации с IFN $\alpha$  (Verdegaal Cancer Immunol Immunother 2011). После лечения отмечалось обратное развитие опухоли, и пациент является единственным выжившим в течение продолжительного времени из своей когорты.

Брали пробу крови через пять лет после лечения, PBMC выделяли из градиента фиколла и замораживали в жидком азоте до момента выделения В-клеток.

Иммортализация В-клеток.

В-клетки с суммарным IgG отсортировывали из размороженных PBMC пациента с использованием FACSAria (Becton Dickinson) и проводили иммортализацию, как описано в Kwakkenbos Nat Med 2010. Коротко говоря, В-клетки с суммарным IgG культивировали и активировали в течение 36 ч на L-клетках, экспрессирующих CD40L, в присутствии рекомбинантного мышинового IL-21. Посредством ретровирусной трансдукции в В-клетки вводили разработанный нами конструкт, экспрессирующий Bcl6 и Bcl-xL, и маркерный ген GFP, что обеспечивало иммортализацию В-клетки.

Культура В-клеток.

Иммортализованные В-клетки хранили в IMDM (Gibco) с добавлением 8% FCS (HyClone), пенициллина/стрептомицина (Roche) и рекомбинантного мышинового IL-21 (50 нг/мл, собственного приготовления). В качестве питающих клеток добавляли гамма-облученные (50 Гр) мышинные фибробласты, экспрессирующие CD40L. Культуры периодически испытывали на отрицательную реакцию присутствия микоплазмы.

Выделение клонов В-клеток, связывающих меланому.

Иммортализованные В-клетки с полным IgG высевали по 25 клеток на лунку в 384-луночные планшеты и размножали с использованием L-клеток и mL21. Примерно через 2 недели культуру антител, содержащую супернатанты В-клеток, испытывали на связывание со смесью клеточных линий меланомы. Положительное связывание визуализировали посредством проточной цитометрии (FACS Canto и LSR Fortessa X20, Becton Dickinson) с использованием антитела к человеческому IgG-PE (Southern Biotech). Положительные мини-культуры размножали и процедуру повторяли на отсортированных одиночных В-клетках, чтобы получать реагирующий на меланому клон В-клетки из 25-клеточной миникультуры. В качестве антитела положительного контроля использовали панитумумаб (антитело к EGFR1).

Продукция рекомбинантных антител.

Для получения рекомбинантных антител выделяли суммарную РНК с помощью мини-набора RNeasy® (Qiagen), генерировали кДНК, выполняли ПЦР и клонировали вариabельные области тяжелой и легкой цепей в вектор для клонирования pCR2.1 TA (Invitrogen). Чтобы исключить мутации, индуцированные обратной транскриптазой или ДНК-полимеразой, секвенировали множество клонов. Вариabельные области тяжелой и легкой цепей AT14-012 клонировали в пределах рамки считывания с человеческими IgG1 или IgG3 и константными областями каппа-цепи в вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen). Полученным вектором проводили промежуточную трансфекцию клеток 293T, и из супернатанта культуры очищали рекомбинантное антитело с использованием системы очистки АКТА (General Electric Lifesciences). Для целей контроля в эксперименты включали нерелевантное контрольное антитело (AT10-002), распознающее антиген HA на вирусе гриппа.

### Результаты

Идентификация и выделение клонов В-клеток, связывающих меланому.

Пациент с меланомой кожи и прогрессирующим метастатическим заболеванием IV стадии получал лечение адоптивным переносом аутологичных реагирующих на опухоль Т-клеток (Verdegaal Cancer Immunol Immunotherapy 2011). Для этого опухолевую ткань отбирали посредством хирургической операции и использовали для формирования аутологичной клеточной линии меланомы. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из крови и помещали для совместного культивирования с получившими

летальную дозу облучения аутологичными клетками меланомы в среду Т-клеток. Через 4 недели культивирования реакционную способность культивированных Т-клеток подтверждали функциональными анализами (Verdegaal Cancer Immunol.Immunotherapy 2011). Пациенту проводили два цикла лечения размноженными аутологичными Т-клетками, и у него отмечался полный ответ, и более чем через 9 лет после лечения у него по-прежнему не регистрируется опухоль. Из РВМС, выделенных через пять лет после адоптивной терапии Т-клетками, для пула В-клеток с суммарным IgG проводили ретровирусную трансдукцию с разработанными нами конструктом Bcl6/Bcl-xL. Иммуортиализованные GFP-положительные клетки исследовали на наличие связывающих меланому антител посредством проточной цитометрии. Клон В-клетки IgG3 с названием AT14-012 демонстрировал высокую реакционную способность против обеих изначально тестирувавшихся линий меланомы (MelBLM и MelWBO). Определяли последовательности варибельной тяжелой и легкой цепей (см. фиг. 3) и клонировали ДНК с основной цепью IgG1 и IgG3 для рекомбинантной продукции антител в клетках 293 или CHO.

Пример 2. Антигеном-мишенью AT14-012 является CD9

### Материалы и способы

#### Идентификация и подтверждение мишени AT14-012

Проводили лизис клеток клеточной линии рака толстой кишки Caco2 (ATCC HTB-37), клеток клеточной линии меланомы MelBLM и клеток клеточной линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 (отрицательный контроль) (0,5% Triton X114 (Sigma), 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH7,4, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> с добавлением ингибиторов протеазы и фосфатазы (Roche)) и предварительно осветляли нерелевантным антителом (антитело к RSV D25 собственного приготовления), белком G и стрептавидиновыми гранулами (Pierce) для удаления неспецифических связывающих белков. Для прямого вестерн-блоттинга с AT14-012 инкубировали очищенное рекомбинантное AT14-012 в течение по меньшей мере 1 ч при комнатной температуре в TBS+5% BSA (Thermo Fisher) и 0,1% Tween20 (Sigma) на SDS-Page и проводили блоттинг лизатов. Блоты промывали 3 раза в течение 5 мин в TBST и анализировали с козьем антителом к человеческому IgG (разбавление 1:10 000 с меткой HRP; Jackson Laboratories) в TBST+5% BSA. Затем блоты вновь промывали 3 раза в течение 5 мин перед проявлением посредством хемилюминесцентной обработки. Предварительно осветленные лизаты затем инкубировали с фиксированным на гранулах специфическим к меланоме антителом AT14-012 или специфическим к вирусу гриппа антителом AT10-002 в качестве отрицательного контроля (3 ч при 4°C). Инкубированные с антителом гранулы трижды промывали в буфере лизирования и связанные белки элюировали с гранул (0,1 M глицин, pH 10,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1 mM EDTA) и нейтрализовали 1 : 10 объемом 2 M Tris pH 7,4. Вновь проводили гель-электрофорез образцов на SDS-PAGE. Для 85% образцов ИП проводили гель-электрофорез на SDS-PAGE и окрашивали красителем для белка Imperial (Pierce) для окрашивания суммарного белка и выделения конкретных полос для масс-спектрометрии. Для остальных образцов иммунопреципитации (ИП) проводили гель-электрофорез на SDS-PAGE и переносили их на мембрану PVDF (Bio-Rad) для иммуноблоттинга. Блот инкубировали с AT14-012 или с мышинным антителом к CD9 (клон ALB6, Beckmann Coulter) для проведения анализа посредством вестерн-блоттинга, чтобы подтвердить идентичность CD9 (данные не приводятся).

#### Картирование эпитопа

Картирование эпитопов вначале проводили генерацией гибридных мутантов CD9 (по сравнению с CD81). На CD9 присутствуют две внеклеточных петли: малая EC1 (остатки 34-58; или SEL) и большая EC2 (остатки 112-195; или LEL), которые, возможно, выступают в качестве партнеров связывания для AT14-012 (фиг. 1a). В дополнение к конструкту CD9 дикого типа были получены один замещенный мутант с заменой первой меньшей петли и один замещенный мутант с заменой большей петли для соответствующих остатков CD81. Для еще большей деконструкции вторичной петли были предложены меньшие замещенные мутанты с заменой предсказанных участков альфа-спирали для соответствующей области CD81, приводящей к образованию 5 замещенных мутантов: m1 (остатки 112-134 CD9 замещались соответствующими остатками CD81), m2 (остатки 135-151 CD9 замещались соответствующими остатками CD81), m3 (остатки 154-166 CD9 замещались соответствующими остатками CD81), m4 (остатки 168-180 CD9 замещались соответствующими остатками CD81) и m5 (остатки 182-195 CD9 замещались соответствующими остатками CD81), см. фиг. 1b. Цистеины относятся к консервативным областям тетраспанинов (C152, C153, C167 и C181), а потому после замен в указанных областях структурные свойства/фолдинг, скорее всего, останутся без изменений. Прогнозы вторичной структуры показывают, что фолдинг CD9 происходит таким же образом, как и для других тетраспанинов, а значит, такой подход будет эффективным, поскольку цистеины не затрагиваются. Все варианты CD9 и замещенные варианты конструировали с использованием GeneArt (Thermo Fisher Scientific) для гена CD9 и включали C-концевую метку FLAG (3x FLAG: DYKDDHGDYKDDHIDYKDDDDK) для возможного обнаружения при вестерн-блоттинге. кДНК CD9 клонировали в лентивирусный вектор третьего поколения рHEF-TIG, содержащий IRES-GFP 3' от кДНК CD9; частицы лентивируса VSV-G продуцировались клетками HEK293T. Клеточную линию множественной миеломы HL-60, отрицательную на CD9 (ATCC; CCL-240) подвергали трансдукции указанными вирусами в присутствии ретронектина (Takara, Clontech, Япония) и сортировали по наличию GFP, чтобы получить чистую популяцию клеток, сверхэкспрессирующих CD9.

На основании результатов связывания по FACS для 14-012 наряду с другими коммерческими антителами к CD9 (ALB6; Beckmann Coulter и HI9a; Biolegend) были получены аланиновые мутанты области m4 (остатки K169A, K170A, D171A, V172A, L173A, E174A, T175A, F176A, T177A, V178A, K179A и S180A), чтобы установить, какие конкретные аминокислоты в такой области m4 относятся к эпитопу.

#### **Картирование эпитопов посредством аланинового сканирования в области m3 CD9**

Аланиновое сканирование проводили, как описано выше (см. раздел "Материалы и способы", относящийся к фиг. 5B). кДНК CD9 клонировали в лентивирусный вектор третьего поколения рHEF-TIG, содержащий IRES-GFP 3' от кДНК CD9; частицы лентивируса VSV-G продуцировались клетками HEK293T. Клеточную линию множественной миеломы HL-60, отрицательную на CD9 (ATCC; CCL-240) подвергали трансдукции указанными вирусами в присутствии ретронектина (Takara, Clontech, Япония) и сортировали по наличию GFP, чтобы получить чистую популяцию клеток, сверхэкспрессирующих CD9. На основании результатов связывания по FACS для AT14-012 наряду с другими коммерческими антителами к CD9 (ALB6 и HI9a) были построены аланиновые мутанты области m3 (остатки G154A, L155A, G157A, G158A, V159A, E160A, Q161A, F162A, I163A, S164A, D165A, I166A), чтобы установить, какие конкретные аминокислоты в такой области m3 относятся к эпитопу.

#### **Результаты**

Мишенью AT14-012 является CD9.

Мишень AT14-012 идентифицировали с помощью раковых клеток толстой кишки Caco2 (ATCC HTB-37), поскольку связывание AT14-012 было более заметным при FACS, но подтверждали аналогичным образом на лизатах клеточной линии меланомы MelBLM. Вестерн-блоттинг прошедших SDS-PAGE лизатов клеток Caco2, MelBLM или HL-60 анализировали на предмет реакционной способности с AT14-012 и обнаруживали с помощью поликлонального антитела козы к человеческому IgG (с меткой HRP; Jackson Laboratories). Блот демонстрировал реакционную способность в отношении крупных белков, имеющих массу ~ 25 кДа (фиг. 4a). Реакционная способность или сигнал утрачивались, если лизаты анализировали в восстанавливающих условиях, а значит, антитело реагирует с конформационным эпитопом, ограниченным цистеинами. Иммунопреципитация (IP) Caco2 или лизатов MelBLM, инкубированных с меченым биотином с меткой сортазы AT14-012, также приводила к получению полосы ~ 25 кДа (фиг. 4b). Такая полоса является специфической, поскольку не наблюдалась в AT10-002 IP для лизата Caco2/MelBLM и для IP лизата HL-60. Масс-спектрометрический (МС) анализ полосы иммунопреципитации указывал на то, что CD9 является белком-мишенью. Несмотря на то, что для ИП на клетках MelBLM никаких окрашенных кумасси полос визуально не определялось, было показано, что МС анализ позволял выявить тот же осажденный антиген CD9. Было идентифицировано четыре внеклеточных пептида, относящихся к внеклеточной петле 2, что обеспечивало 10% покрытия белка. Трансмембранные пептиды не были идентифицированы, поскольку их сложно обнаруживать из-за их гидрофобной природы. Связывание CD9 с AT14-012 было подтверждено анализом посредством вестерн-блоттинга (фиг. 4c). Коротко говоря, проводили иммунопреципитацию лизатов Caco2 или HL-60 в присутствии AT14-012 или специфического к вирусу гриппа антитела AT10-002. Вестерн-блоттинг вновь с AT14-012 и мышинным антителом к CD9 (клон ALB6) подтвердил, что CD9 является мишенью связывания AT14-012 (фиг. 4c).

CD9 активно экспрессируется на здоровых и злокачественных клетках.

Антитела, специфические к CD9, получены и имеются в продаже, например, ALB6 и HI9a. С использованием таких антител была подтверждена экспрессия CD9 клетками Caco2 и BLM. Эксперименты по конкурентному связыванию с AT14-012 показали, что все коммерческие антитела были в состоянии конкурировать за связывание с AT14-012, а также самого AT14-012 (данные не приводятся).

Для более точной идентификации связывающего эпитопа AT14-012 получали гибридные мутанты посредством замены областей белка-гомолога CD9 CD81, как описано в разделе "Материалы и способы". Испытывали связывание антител AT14-012, ALB6 и HI9a с такими мутантами. Было установлено, что все антитела к CD9, связанные с внеклеточной петлей 2 (EC2), демонстрировали потерю связывания при замене EC2 CD81, при этом связывание сохранялось при замене первой внеклеточной петли (EC1). Для всех антител не наблюдалось связывания при трансдукции пустого вектора в клетки HL60, или для клеток без трансдукции. Эпитоп петли EC2 затем дополнительно анализировали с помощью гибридных мутантов m1, m2, m3, m4 и m5, в которых специфические области CD9 заменяли соответствующими областями CD81 (фиг. 1b). Следует отметить, что цистеины оставались неизменными, чтобы сохранять вторичную структуру. Замена областей m2 и m5 не оказывала никакого воздействия на связывание любого антитела к CD9, демонстрируя, что в этих областях отсутствует эпитоп. Можно показать, что связывание всех антител нарушалось при замене области m3, а значит эпитоп всех тестированных антител находится в данной области. AT14-012 сохраняло связывание с мутантом m1, тогда как для всех коммерческих антител отмечалась потеря связывания. ALB6 и AT14-012 демонстрировали потерю связывания с мутантом m4, тогда как HI9a сохраняло связывание. Приведенные результаты показывают, что главный эпитоп AT14-012 находится в m3 и/или m4. Вначале, это навело нас на мысль приготовить аланиновые мутанты в m4 (как описано в разделе "Материалы и способы"). В данном случае HI9a использовали в качестве положительного контроля, для контроля экспрессии аланиновых мутантов CD9 на поверхности трансду-

цированных клеток HL60. ALB6 использовали как сравнение, чтобы проанализировать, существует ли аналогичный эпитоп в этом коммерческом широко применяемом антителе к CD9. По результатам анализа FACS было показано, что F176A являлся единственным аланиновым мутантом, который демонстрировал потерю связывания с ALB6. Как и в случае AT14-012, потерю связывания наблюдали тогда, когда остатки K169, D171, V172, L173, T175 и F176 были замещены на аланин. Таким образом, было показано, что эпитоп AT14-012 перекрывается с эпитопом ALB6, но отличается по меньшей мере на 5 дополнительных аминокислот.

Эпитоп AT14-012 является линейным и располагается только в области m4. После эксперимента по связыванию с аланиновым сканированием для области m4 проводили более подробный анализ области m3, поскольку происходила потеря связывания с гибридным мутантом CD9/CD81 (см. фиг. 15). Были сконструированы аланиновые мутанты в области m3, включающие аминокислоты с 154 до 166, за исключением A156. Проводили трансдукцию CD9-отрицательной клеточной линии HL60 с полной сортировкой по GFP клеток, экспрессирующих CD9. Связывание AT14-012, ALB6 и H19a с клетками анализировали с помощью FACS. Неожиданно было обнаружено, что ни при одной единичной замене аланина в данной области не отмечалось потери связывания AT14-012 или H19a. Гибридный мутант EC2 и m3 CD9/CD81 демонстрировал отсутствие связывания для всех антител, а потому пришлось постулировать, что в данном конкретном гибриде был, по-видимому, нарушен фолдинг. В соответствии с кристаллической структурой CD81 и гомологичной модели CD9 (см. фиг. 15) область m3 "фиксирована" в положении между m1, m2 и m4. Таким образом, представляется вероятным, что потеря связывания для всех антител к CD9 происходит в случае масштабной замены аминокислот в данной области. Следует отметить, что ALB6 утрачивало связывание с мутантом Q161A, а потому был установлен эпитоп и для ALB6 (Q161 в m3 и F176 в m4). После анализа результатов аланинового сканирования в области m3 и m4 можно предположить, что мишенью AT14-012 является линейный свернутый эпитоп, который конформационно удерживается или индуцируется другими окружающими областями CD9 (m2, m3 и m5, см. гомологичную модель на фиг. 15).

AT14-012 более эффективно связывается с кластерами CD9.

В лаборатории Martin Hemler продемонстрировали, что образование гомокластеров CD9 стимулируется пальмитилированием CD9, и что уровни гомокластеров CD9 оказываются повышенными в первичных и в особенности метастатических опухолевых клетках (Yang JBC 2006). Чтобы определять зависимость AT14-012 от степени пальмитилирования CD9, опухолевые клетки культивировали в присутствии 2-бромопальмитата (2-BrP), известного ингибитора пальмитилирования. Клетки меланомы BLM демонстрировали очевидное ослабление связывания AT14-012 с обработанными 2-BrP клетками, тогда как на связывание коммерческого антитела CD9 H19a депальмитилирование не влияло [фиг. 14A, B]. Интересно, что наблюдаемый эффект был наиболее выраженным для высокоагрессивных MelBLM (Bartolomé AJR 2009) и не отмечался на неметастатических клетках карциномы толстой кишки CaCo2. Это позволяет предположить, что на более поздних стадиях заболевания уровни гомокластеров CD9 повышаются, указывая на возможность использования AT14-012 для мониторинга прогрессирования опухоли.

Пример 3. Функциональное описание AT14-012

### Материалы и способы

Линии опухолевых клеток.

Клеточные линии меланомы (MelBLM, MelWBO, Mel136.2), карциномы толстой кишки (CaCo2, Colo320, HT29, LSTR), карциномы поджелудочной железы (PANC-1, CAPAN-2, MiaPACA, VxPC3), карциномы пищевода (OE19, OE33) и острого миелоидного лейкоза (THP-1) сохраняли в стандартных условиях культивирования тканей. Для минимального воздействия на белки клеточной поверхности опухолевые клетки отделяли с использованием акутазы (Life Technologies).

Проточная цитометрия и антитела.

Отделенные клетки солидной опухоли и первичные фибробласты, неадгезивные клетки опухоли и другие первичные клетки готовили для анализа посредством проточной цитометрии, помещая 50000 клеток в 96-луночный планшет. Затем клетки инкубировали с коммерческими антителами к CD4, CD8, CD9, CD19, CD41, CD62P, CD81 (Biolegend). AT10-002, антитело к CD30 или AT14-012 собственного приготовления были либо непомеченными, либо имели метку биотина или Alexa 647. Непомеченные антитела и меченные биотином антитела вторично окрашивали анти-IgG-PE (Southern Biotech) или анти-стрептавидин-РeCy7 (Becton Dickinson), соответственно. В некоторых экспериментах в качестве положительного контроля использовали панитумумаб (анти-EGFR1). Для анализа проб использовали FACS Canto и LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson).

Активация тромбоцитов.

Кровь, полученную от здоровых добровольцев, в содержащих цитрат пробирках для взятия крови (Becton Dickinson) центрифугировали в течение 10 мин при 800 g. Собирали верхнюю фракцию обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP) и использовали для испытания активации тромбоцитов. Коротко говоря, 10 мкл PRP инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре с 10 мкг/мл антитела, Pab2-фрагментами или положительным контролем, пептидом, активирующим рецепторы тромбина (TRAMP). Пробы анализировали посредством проточной цитометрии (LSR Fortessa X20, BD) для выяв-

ления поверхностной экспрессии CD41 и CD62P/ P-селектин с использованием напрямую конъюгированных антител (Biolegend). Экспрессию CD9 HI9a определяли на тромбоцитах без стимуляции.

Агрегация тромбоцитов.

Кровь получали от здоровых добровольцев в содержащие цитрат пробирки для взятия крови (Weston Dickinson). 300 мкл цельной крови, смешанных с 300 мкл буфера для анализа, нагревали до 37°C в течение 2 мин. Добавляли пептид или антитело положительного контроля (конечная концентрация 10 мкг/мл) и измеряли агрегацию тромбоцитов в зависимости от времени с использованием мультипланшетного анализатора (Cobas/Roche).

Мыши с ксенотрансплантатом.

Иммунодефицитным мышам подкожно трансплантировали 200000-500000 экспрессирующих люциферазу/GFP клеток MelBLM в High Concentration Matrigel (Corning). AT14-012 или контрольное антитело AT10-002 вводили внутривенно каждой мышке в концентрации 10 мг/кг. Лечение антителом начинали в день введения опухолевых клеток, или же опухолям давали вырасти в течение 3 недель, чтобы отслеживать рост первичной подкожной опухоли или развитие метастазов, соответственно. Рост подкожной опухоли определяли штангенциркулем или визуализацией люциферазы после введения люциферина (Promega) с помощью фотовизуализатора (Biospace Lab). Наличие метастазов определяли визуально и посредством визуализации люциферазы на момент завершения эксперимента.

#### **Линии опухолевых клеток с коротким периодом развития**

Фрагменты опухолевой ткани, которые хирургическим путем удаляли из организма страдающего меланомой пациента, расщепляли и помещали в культуральную среду. Растущие клетки хранили в стандартных условиях культивирования тканей.

Опухолевые ткани, полученные от пациентов, страдающих карциномой поджелудочной железы, слишком малы, чтобы можно было образовывать клеточные линии непосредственно из них, поэтому их вначале имплантировали под кожу мышам NSG. Растущие опухоли собирали, расщепляли и хранили в стандартных условиях культивирования тканей. Опухолевые клетки человека и инфильтрированные в опухоль фибробласты мышинного происхождения разделяли сортировкой клеток с использованием точной цитометрии на основе экспрессии EpCam.

#### **Результаты**

AT14-012 обладает реакционной способностью по отношению к широкому кругу опухолей. AT14-012 обнаруживали по связыванию с клеточными линиями меланомы MelBLM и MelWBO. Впоследствии было установлено, что AT14-012 демонстрирует реакционную способность связывания со всеми проанализированными клеточными линиями меланомы (фиг. 6а и фиг. 7а). Данные из сравнительно большого объема литературы показывают, что CD9 экспрессируется в широком спектре тканей и его экспрессия усиливается для самых различных клеток солидных опухолей. В соответствии с этим, мы обнаружили, что AT14-012 реагирует с панелью клеточных линий карциномы толстой кишки, пищевода и поджелудочной железы (фиг. 6а и 7b). Единственной обнаруженной нами клеточной линией солидной опухоли, которая не реагирует с AT14-012, является CD9-отрицательная линия клеток Colo-320 карциномы толстой кишки (фиг. 7b). Было также установлено, что CD9 экспрессируется на гематопоэтических клетках, хотя и в меньшей степени. На фиг. 6b и 6c показано, что AT14-012 в состоянии реагировать с выборочным числом клеток острого миелоидного лейкоза и миелоидного лейкоза (AT14-012 очевидно связывает BL-007, BL-009, BL-037, BL-054 и BL-058, но не связывает BL-014, BL-030 и BL-055). Все эти данные показывают, что AT14-012 имеет гораздо более широкие терапевтические применения, нежели только лечение меланомы.

AT14-012 образует более прочную связь с клетками опухоли, чем с первичными клетками. Ни одно из терапевтических антител для лечения солидных раковых опухолей, которые в настоящее время используются в клинической практике, не распознает антигены, которые экспрессируются исключительно на опухолях. Вместе с тем, терапевтические возможности применения таких антител появляются в том случае, если антиген в больших количествах экспрессируется на клетках опухоли, чем на здоровых клетках. Например, трастузумаб (герцептин) применяют для лечения рака молочной железы, при котором отмечается сверхэкспрессия HER2. Аналогичным образом, известно, что для широкого спектра солидных раковых опухолей часто отмечается повышенная экспрессия CD9. Если AT14-012 более активно реагирует с раковыми клетками, чем со здоровыми клетками, то так же как герцептин, AT14-012 можно использовать для целей терапии.

В самом деле было установлено, что AT14-012 более активно реагирует с клетками меланомы, чем с первичными меланоцитами (фиг. 7а; все клеточные линии меланомы связываются с AT14-012, тогда как для первичных фибробластов такие связи не наблюдаются. Первичные меланоциты связываются AT14-012, но в меньшей степени, чем большинство клеточных линий меланомы). Кроме того, AT14-012 более активно реагирует с клетками карциномы толстой кишки, чем с первичными эпителиальными клетками толстой кишки (фиг. 7b; AT14-012 более прочно связывает CaCo2 (верхняя панель), чем первичные эпителиальные клетки толстой кишки (нижняя панель)). Наконец, оказалось, что AT14-012 более прочно связывается с клетками меланомы MelBLM, чем с первичными Т- и В-лимфоцитами миндалин (фиг. 7c; нижние изображения в среднем и правом столбце указывают на более прочное связывание

AT14-012 с MelBLM по сравнению со связыванием AT14-012 с Т-клетками с суммарным CD4, Т-клетками с суммарным CD8 и В-клетками с суммарным CD19 (верхние изображения в среднем и правом столбце)). Приведенные данные показывают, что AT14-012 можно использовать для клинических применений, которые в настоящее время используют для лечения солидных опухолей антителами.

AT14-012 связывает и активирует тромбоциты, но не индуцирует агрегацию. Ранее были опубликованы данные о высоких уровнях экспрессии CD9 на тромбоцитах и о том, что антитела к CD9 могут индуцировать активацию и агрегацию тромбоцитов, что потенциально приводит к тромбозу у пациентов, получающих лечение таким антителом к CD9. Несмотря на то, что у страдающего меланомой пациента, от которого было выделено AT14-012, не отмечалось никаких признаков тромбоза, необходимо было убедиться, что AT14-012 не вызывает столь серьезного побочного эффекта.

Во-первых, определяли связывание AT14-012 с тромбоцитами. Обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) от здорового добровольца инкубировали с коммерческим антителом к CD9 или окрашивали AT14-012. Тромбоциты фиксировали, чтобы исключить любые различия в экспрессии CD9 на клеточной поверхности из-за аутоактивации тромбоцитов. Как следовало ожидать из литературных данных, коммерческое антитело CD9 H19a прочно связывает тромбоциты (нижние изображения на фиг. 8a). В соответствии с этим наблюдением AT14-012 также демонстрировало эффективное взаимодействие с тромбоцитами (верхние изображения на фиг. 8a).

Затем оценивали возможность активации тромбоцитов при взаимодействии с AT14-012. Известно, что пептид, активирующий рецепторы тромбина (TRAP), и коммерческое антитело к CD9 ALB6 стимулируют активацию тромбоцитов, что демонстрирует повышенная экспрессия Р-селектина/CD62P на клеточной поверхности. Действительно, анализ PRP от здорового добровольца, инкубированной с TRAP или ALB6, показал, что такая поверхностная индукция CD62P по сравнению с условиями без стимулирования и нерелевантным изотипом ALB6 совпадала с антителом FLAG (фиг. 8b). Кроме того, AT14-012 в обоих форматах рекомбинантных IgG1 и IgG3, а также антитело, очищенное из супернатанта исходного клона В-клеток, были в состоянии активировать тромбоциты (фиг. 8b).

Наконец, определяли, индуцирует ли AT14-012 агрегацию тромбоцитов. Для этого цельную кровь инкубировали с теми же стимуляторами, что и ранее, с добавлением Fab2-фрагментов антител AT10-002 и AT14-012. Как и ожидалось, пептид TRAP и антитело ALB6 индуцировали интенсивную агрегацию тромбоцитов (фиг. 8c). В отличие от коммерческого антитела к CD9 ALB6, антитело AT14-012 не вызывало агрегацию тромбоцитов в любом из различных форматов (IgG1, IgG3, очищенное из супернатанта В-клеток (2H15) или Fab2-фрагмент) (фиг. 8c). Все эти данные показывают, что несмотря на то, что AT14-012 связывает и активирует тромбоциты, взаимодействие AT14-012 с тромбоцитами не вызывает агрегацию тромбоцитов. Полученные результаты согласуются с наблюдением об отсутствии каких-либо признаков тромбоза у донора AT14-012. Таким образом, можно сделать вывод о том, что AT14-012 можно использовать в клинических условиях, не вызывая тромбоза, который является серьезным побочным эффектом.

AT14-012 препятствует разрастанию первичных и вторичных опухолей. Для определения противоопухолевого эффекта AT14-012 в условиях *in vivo* была разработана модель ксенотрансплантата опухоли у мышей. Иммунодефицитные мыши являются подходящей моделью для приживления трансплантата опухоли.

Мышам с обоих боков вводили подкожный трансплантат 500000 экспрессирующих люциферазу/GFP клеток MelBLM в Matrigel. Наблюдали рост опухоли в течение 3 недель, после чего в течение одной или двух недель (в зависимости от размера подкожной опухоли) мышам дважды в неделю внутривенно вводили 10 мг/мл AT14-012 или нашего контрольного антитела к вирусу гриппа (AT10-002). Через 4 или 5 недель после введения трансплантата опухолевых клеток мышей умерщвляли и экспонировали внутренние органы. У 3 из 4 мышей в группе, получавшей AT10-002, были обнаружены крупные люцифераза-положительные лимфатические узлы, свидетельствующие о том, что опухолевые клетки MelBLM могли метастазировать и формировать вторичные опухоли в лимфатических узлах. Напротив, ни у одной из пяти мышей, получавших антитело AT14-012, не отмечалось никаких признаков метастазов в лимфатических узлах (фиг. 9a). Это подтверждает способность AT14-012 ингибировать метастазирование опухоли.

В последующем эксперименте мыши получали 200000 опухолевых клеток MelBLM GFP/люцифераза с обоих боков. На этот раз введения антитела (дважды в неделю в течение 2 недель, 10 мг антитела на кг веса мыши) начинали одновременно с трансплантацией опухоли. Размер подкожных опухолей измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Как показано на фиг. 9b, у мышей, получавших AT14-012, рост опухоли снижался по сравнению с мышами, получавшими контроль. Это показывает, что AT14-012 оказывает отрицательное воздействие на рост опухоли.

Подкожные опухоли MelBLM от мышей, получавших AT14-012 или контрольное антитело AT10-002, испытывали методами иммуногистохимии на наличие связанного антитела AT14-012. Опухолевую ткань заливали в парафин, после чего срезы инкубировали с мечеными HRP антителами к лямбда или антителами к каппа, распознающими легкую цепь антител AT10-002 или AT14-012 соответственно. Как ожидалось, контрольное антитело AT10-002 (к вирусу гриппа) не связывает опухолевую ткань, тогда как

AT14-012 очевидно связывает внешние слои опухолевой ткани и демонстрирует проникновение в более глубокие слои (фиг. 9C). Продукты расщепления MelBLM подкожных опухолевых клеток до одиночных клеток, взятых от мышей, получавших AT14-012 или контрольное антитело AT10-002, испытывали на связывание антител к CD9 AT14-012 и H19a. Опухолевые клетки, взятые у мышей, получавших AT14-012, демонстрируют снижение связывания AT14-012 и CD9 H19a по сравнению с мышами, получавшими AT10-002 (фиг. 9D). Наблюдаемый эффект не является следствием уже существовавшей связи между эпитопом AT14-012 в результате введения антитела AT14-012, поскольку опухолевые клетки от обеих групп лечения демонстрируют отрицательное окрашивание с антителом к IgG (фиг. 9D).

Интересно, что в повторном эксперименте с AT14-012 антитело было также в состоянии угнетать рост опухоли для растущих подкожно опухолей меланомы SK-MEL-5 (фиг. 9E). Эффект ингибирования роста опухоли более очевиден при определении веса опухоли. Обработанные AT14-012 опухоли имели явно меньший вес по сравнению с соответствующими образцами, взятыми от мышей, получавших AT10-002 (фиг. 9F). Следует отметить, что снижение уровней CD9 на опухолевых клетках, которое отмечалось на обработанных AT14-012 опухолях MelBLM, подтверждается результатом анализа уровней экспрессии CD9 в выделенных и расщепленных *ex vivo* опухолях SK-MEL-5 (фиг. 9G).

AT14-012 связывает свежееотобранные у пациента клетки меланомы и опухолевые клетки поджелудочной железы. AT14-012 в состоянии распознавать широкий спектр стабильных клеточных линий солидной опухоли (фиг. 6A). Затем исследовали, распространяется ли реакционная способность связывания AT14-012 также на пробы опухоли, которые были недавно выделены у страдающих раком пациентов. Молодые культивированные клетки меланомы, взятые у пациента, испытывали на связывание с AT14-012. На всех протестированных пробах первичной меланомы регистрировали положительный сигнал с AT14-012 (фиг. 10A-B). Наблюдали строгую корреляцию связывания AT14-012 и экспрессии CD9 (фиг. 10B). Следует отметить, что опухолевые клетки, полученные от страдающего меланомой пациента, от которого было получено AT14-012, демонстрировали самое прочное связывание с AT14-012 из всей панели. Таким же образом исследовали связывание полученных от пациента опухолевых клеток карциномы поджелудочной железы с антителами к CD9. В соответствии с выводами об эффективном связывании AT14-012 со стабильными клеточными линиями карциномы поджелудочной железы (фиг. 6A), AT14-012 проявляет высокую реакционную способность в отношении обеих протестированных клеточных линий карциномы поджелудочной железы, полученных от пациента (фиг. 10C).

Реакционная способность AT14-012 ограничивается приматами. Тетраспанины в целом и CD9 в частности широко экспрессируются в большом числе клеток и тканей, и высказывалось предположение об их эволюционной консервативности в далеких по родству видах (Garcia-Espana, Genomics, 2008). Испытывали связывание AT14-012 с тромбоцитами мышей, кролика, яванских макаков и человека. Как ожидалось, CD9 экспрессируется на тромбоцитах всех тестируемых видов. Вместе с тем AT14-012 реагирует только с тромбоцитами яванских макаков и человека, и связывание у мышей и кролика не наблюдалось (фиг. 11 A-C). Все это вместе взятое свидетельствует о том, что реакционная способность AT14-012 ограничивается приматами.

Пример 4. Комплемент- и антителозависимая цитотоксичность

#### **Материалы и способы**

##### **Анализ комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC)**

Суспензию или прикрепленные клетки меланомы метили антителом в течение получаса при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с комплементом кролика (S7764, Sigma) в течение 45 мин при 37°C. Процент гибели клеток определяли посредством DAPI и проточной цитометрии (Fortessa X20, Becton Dickinson) или ToPRO3 и микроскопии (Operetta, Perkin Elmer) для суспензии и прикрепленных клеток, соответственно.

##### **Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)**

Клетки-мишени, меченные хромом-51, инкубировали с 10 мкг антитела в течение 30 мин при 37°C. Обедненные CD3 РВМС добавляли с последовательным разбавлением с последующим дополнительным инкубированием в течение 4 ч. Высвобождение хрома-51 в супернатанте обнаруживали на LumaPlates (Perkin Elmer) с использованием Wallac-Counter. Графики значений для индуцированного антителом лизиса клеток корректировали с учетом спонтанного высвобождения хрома-51.

#### **Результаты**

AT14-012 приводит в действие механизм антителозависимой цитотоксичности (ADCC). Чтобы установить, обладает ли AT14-012 способностью уничтожать опухолевые клетки посредством механизма антителозависимой цитотоксичности (ADCC), опухолевые клетки метили радиоактивным хромом, а затем инкубировали с антителами AT14-012, отрицательным контролем AT10-002 (к вирусу гриппа) или положительным контролем (цетуксимаб, антитело к EGFR1). Меняли соотношения между эффекторными РВМС и клетками-мишенями меланомы. Процент гибели клеток определяли по высвобождению хрома из мертвых клеток в среду. Менее эффективное по сравнению с цетуксимабом AT14-012 было в состоянии уничтожать MelBLM посредством ADCC, при этом минимальная гибель клеток отмечалась тогда, когда в качестве клеток-мишеней использовали первичные эндотелиальные клетки артерии человека

(НАЕС) (фиг. 12А). Параллельно тестировали гибель клеток посредством ADCC, индуцированную AT14-012, для первичных молодых культивированных клеток меланомы, полученных от пациента. Несмотря на некоторые наблюдаемые различия между различными клетками меланомы, было обнаружено, что AT14-012 было в состоянии демонстрировать активность ADCC в отношении контрольного антитела AT10-002 (фиг. 12В). Все это вместе взятое показывает, что противоопухолевая реакционная способность AT14-012 по меньшей мере частично опосредована ADCC.

AT14-012 приводит в действие механизм комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Проводили испытание нескольких вариантов антитела AT14-012 относительно их способности приводить в действие механизм комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). 2H15 представляет собой антитело, полученное из исходного AT14-012 клона иммортализованных В-клеток с IgG3. Рекомбинантное антитело AT14-012 на основе 2H15 продуцируется с обеими основными цепями IgG1 или IgG3. Кроме того, был получен вариант антитела AT14-012 IgG1, содержащий мутацию E345R на хвосте Fc. Было показано, что такая мутация вызывает гексамеризацию конкретного антитела на его мишени, тем самым эффективно приводя в действие механизм комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) (de Jong, PLOS Biology, 2016).

Линии меланомы в суспензии инкубировали с различными вариантами AT14-012 в присутствии человеческой плазмы, а затем тестировали на наличие C1q на клеточной поверхности. Как ожидалось, для гексамеризованного варианта AT14-012 наблюдали отложение C1q на поверхности. Кроме того, отложение C1q обнаруживали в случае использования антитела 2H15, очищенного из исходного клона В-клетки и продуцированного рекомбинантом AT14-012 IgG3. Следует отметить, что антитело AT14-012, сконструированное как IgG1, не вызывало адгезию C1q на поверхности клеток [фиг. 13А, В]. Суспензию Me1BLM или SK-MEL5 инкубировали с контрольным антителом AT10-002 (к вирусу гриппа) или с любым из вариантов AT14-012 в присутствии комплемента кролика. Антитело AT14-012 IgG1 не индуцирует никакой цитотоксичности подобно антителу к вирусу гриппа отрицательного контроля [фиг. 13С]. Напротив, и в соответствии с опубликованными наблюдениями [de Jong, PLOS Biology, 2016], введение мутации E345R в антитело вызывает зависимость от концентрации гибель клеток посредством CDC [фиг. 13С]. Результаты таких наблюдений сопоставимы для суспензии и прикрепленных клеток меланомы [фиг. 13 С, D]. Интересно, что рекомбинант AT14-012, продуцированный как IgG3 (и таким образом не содержащий мутации E345R), также был в состоянии приводить в действие механизм CDC [фиг. 13D]. Неожиданно было обнаружено, что продуцированное исходными В-клетками антитело 2H15, действительно, вызывает адгезию C1q, но не индуцирует опосредованной комплементом гибели клеток [фиг. 13А, С]. AT14-012 E345R эффективно уничтожает клетки опухоли посредством CDC в присутствии комплемента кролика. Несмотря на то, что AT14-012 E345R в состоянии вызывать адгезию человеческого C1q на клеточной поверхности [фиг. 13А, В], антитело не способно приводить в действие механизм CDC-опосредованной гибели клеток в присутствии факторов комплемента человека [фиг. 13Е]. Исследовали, связана ли разница в гибели клеток между комплементом кролика и человека с экспрессией регуляторных белков комплемента (CRP). Для Colo-205, в которых полностью отсутствует экспрессия CD55, ингибитора образования C3-конвертазы, действительно, наблюдалась опосредованная антителом CDC в присутствии человеческой плазмы [фиг. 13Е]. Это позволяет предположить, что AT14-012 может быть в состоянии индуцировать комплемент-зависимую гибель клеток для опухолевых клеток в комбинации с блокирующим CD55 антителом.

Пример 5. Измерения аффинности

#### МАтериалы и способы

##### Связывание AT14-012 по ИФА по сравнению с коммерческими антителами к CD9

Связывание AT14-012 (IgG1) и контрольного человеческого антитела AT10-002 анализировали в формате ИФА, чтобы проводить сравнение с коммерческими антителами ALB6, H19a и мышинными контрольными антителами к FLAG (для обнаружения CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотина на планшете) и к CD3 ОКТ3 (муромонаб). Процедура ИФА подобна описанной выше для анализа степени биотинилирования молекул CD9. Коммерческие антитела добавляли с последовательным разбавлением подобно процедуре для AT14-012. Коммерческие антитела обнаруживали с помощью козьего антитела к мыши с меткой HRP (1 : 4000, предоставлено Jackson), тогда как человеческие антитела обнаруживали с помощью козьего антитела к человеку с меткой HRP (1 : 4000, представлено Jackson). Для более точного сопоставления различий аффинности антитела использовали для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на чипе ППР с покрытием из CD9-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотина. Значения EC50 рассчитывали с помощью программы GraphPad 7.0.

##### Измерение аффинности посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Чип для связывания антител к CD9 изготавливали подобно тому, как описано для обнаружения AIMMrove (см. ниже). В данном случае аффинность AT14-012 (+ контроля) измеряли по "классической" процедуре с регенерацией чипа после каждого введения антитела. Связывание анализировали с помощью устройства IBIS MX96, проводя введения сериан разбавлений рекомбинантного антитела, растворенного в связывающем буфере (PBS+0,05% Tween20+0,05% азида натрия+0,01% BSA), на чипе. При каждом введении комплексы вводили и инкубировали в течение 8 мин с последующим тщательным промыванием системным буфером (PBS+0,05% Tween20+0,05% азида натрия) в течение 12 мин для измерения диссо-

циации. Введения повторяли по меньшей мере трижды для каждого исследуемого антитела, а в качестве контроля использовали введения холостого буфера связывания. После каждого последовательного введения чип восстанавливали, обрабатывая 10 мМ глицин-HCl, pH 2,0+150 мМ NaCl. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения SPrintX (IBIS Technologies), и константы скоростей определяли с помощью программного обеспечения Scrubber2 (BioLogic).

#### **Клонирование, экспрессия, очистка и сайт-специфическое биотинилирование сортазы А для CD9-EC2-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-H18 (+ контроля CD81-EC2-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-HIS)**

Клетки Free Style (Thermo) адаптировали и выдерживали в культуральной среде в течение одной недели в свободной от плазмы среде FreeStyle (Gibco) в флаконе Corning объемом 125 мл с крышками с выпускным клапаном на платформе шейкера (140 об/мин) при 37° с 8% CO<sub>2</sub>. Промежуточную трансфекцию осуществляли с использованием вектора pcDNA3.4, содержащего последовательность CD9 большой внеклеточной петли 2 (аминокислоты 112-195; UniProt P21926), слитую вместе с меткой 3xFLAG (-DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK-) и затем с областью Fc (CH2-CH3) белка IgG1 кролика (аминокислоты 108-322; UniProt P01870). CD9 отделяли от метки 3xFLAG линкером -GGGT-, а 3xFLAG от кроличьего Fc-линкером -GSS-. Метку HIS сортазы (-LPETGGHHHHHstop) отделяли от участка Fc линкером -GGGS-. Вставку клонировали в вектор pcDNA3.4 с использованием ферментов рестрикции NcoI и PmeI (NEB), и препарат длиной ДНК выделяли с помощью плазмидного макси-набора Qiagen. ДНК (3 мкг плазмиды) и 6 мкл раствора ExtremeGene9 (Sigma) в Optimem (Gibco) инкубировали отдельно в течение 10 минут в 100 мкл Optimem. 100 мкл смеси растворов Optimem -ExtremeGene9 добавляли к 100 мкл смеси Optimem-ДНК и инкубировали еще 30 мин, прежде чем по каплям добавляли 3 мл культуры, содержащей 0,5×10<sup>6</sup> клеток/мл. Через два дня среду подкармливали еще 2 мл свежей среды FreeStyle. Среду собирали через 5-7 дней после культивирования и помещали в морозильную камеру при -80°C для дальнейшего использования. Условия культивирования масштабировали, если было необходимо увеличивать объемы продукции. Продукцию белка измеряли с использованием количественного ИФА с кроличьим IgG (Jackson). Среду размораживали и фильтровали до нанесения на колонку с белком G объемом 5 мл (GE Healthcare) при скорости потока 1 см<sup>3</sup>/мин (1 мл/мин) на системе АКТА Explorer (GE). Колонку предварительно уравнивали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) до получения стабильной базовой линии при УФ 280/215 нм. После нанесения пробы колонку снова промывали по меньшей мере 5 объемами колонки PBS и до стабилизации базовой линии при УФ 280/215 нм. Связанный белок элюировали 0,2 М глицина +150 мМ NaCl pH 2,5. Верхние фракции белка нейтрализовали 1 : 10 об./об. 1 М Tris pH 9,0. Фракции объединяли и наносили на колонку Superdex 200 16/60 (GE), которая была уравновешена PBS. Собирали фракцию мономерного пика и количественно определяли с помощью системы Nanodrop 1000 при соответствующих установках параметров экстинкции/молекулярного веса для данного белка. Белок разделяли на аликвоты для дальнейшего использования и краткосрочно хранили при -20°C. Фермент сортаза А (см. приготовление в работе Wagner et al., 2014) использовали в молярном соотношении 1 : 1 вместе с 10-кратным молярным соотношением нуклеофила GGG-биотина для ферментативного присоединения биотиновой функциональной группы к молекуле, в которой метка HIS была удалена ферментативной реакцией с сортазой А. Реакция происходила в 25 мМ Tris, 150 мМ NaCl pH 7,5 и 2 мМ CaCl<sub>2</sub> в течение 4 ч при 37 °С при периодическом осторожном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 1 мМ EDTA. Биотинилированный белок CD9 отделяли от сортазы А и меньших по размерам компонентов (свободный нуклеофил GGG-биотина и свободная метка HIS) на уравновешенной PBS колонке Superdex200 16/60. Собирали верхние фракции. Степень биотинилирования проверяли по ИФА. Коротко говоря, 5 мкг/мл стрептавидина в течение ночи наносили в PBS на 96-луночный планшет ИФА с высоким уровнем связывания (Costar). Биотинилированный CD9 добавляли в лунки с последовательным двухстадийным разбавлением со стартовой концентрацией 10 мкг/мл в PBS+2,5% BSA в течение 1 ч. AT14-012 также добавляли с последовательным разбавлением, чтобы получить сетку для анализа оптимального сигнала, в течение одного часа в PBST+2,5% BSA. AT14-012 обнаруживали посредством инкубации козьего антитела к человеческому с меткой HRP (разбавление 1 : 4000, предоставлено Jackson) в PBST+2,5% BSA и проявляли с помощью кислого раствора ТМВ/Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Реакцию останавливали с помощью 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и измерения проводили с использованием 450 нМ на планшетном ридере Perkin Elmer Envision. Белок был в достаточной степени биотинилирован, и оптимальные концентрации составляли от 2,5 до 5 мкг/мл. Все перечисленные выше стадии повторяли для контрольного белка CD81-EC2-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-HIS, поскольку кодирующую область CD9 заменяли на кодирующую область EC2 CD81 (аминокислоты 113-201; UniProt P60033). Целостность и биотинилирование данного белка проверяли посредством ИФА с использованием клона антитела к CD81 JS81 (BD) и обнаруживали с помощью козьего антитела к мышинному с меткой HRP (Jackson).

#### **Картирование эпитопа AT14-012 с использованием растворимого белка CD9-EC2-FLAG-кролик-Fc в ИФА**

Аланиновые мутанты в области m4 (аминокислоты 169-180) клонировали в упомянутый выше вектор pcDNA3.4. Белки экспрессировали в небольших масштабах (3 мл) и количественно определяли посредством ИФА с кроличьим IgG. Для анализа связывания AT14-012, ALB6 и H19a покрывали антитело к

FLAG (Sigma) при 5 мкг/мл в течение ночи в PBS. Проводили связывание неочищенных свободных от сыворотки супернатантов с антителом FLAG при 1 мкг/мл в течение 1 ч в PBST+2,5% BSA. После промывания проводили связывание случайным образом биотинилированных H19a, ALB6 и AT14-012 с захваченными молекулами CD9-FLAG-кролик-Fc-сортаза-HIS. Связанное антитело обнаруживали с использованием стрептавидин-HRP (разбавление 1:10 000, предоставлен Thermo). ИФА проводили в соответствии с приведенным выше описанием. Случайное биотинилирование антител проводили с использованием набора EZ-Link NHS-Biotin (Thermo). Очищенные антитела в PBS обрабатывали при инкубировании биотиновой меткой в 10-кратном молярном соотношении в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали с помощью эксклюзионной хроматографии. Биотинилированное антитело отделяли от свободной метки, нанося пробу (1 мл с концентрацией 1 мг/мл) на предварительно уравновешенную PBS колонку Superdex200 16/60.

Конструирование кольцевого пептида m4.

Область m4 CD9 (167-PKKDVLETFTVKS-180) синтетически получали в лаборатории синтеза пептидов, анализировали посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХМС) и очищали ОФ-ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрила. Пептид лиофилизировали до завершения эксперимента. Пептид фланкировали двумя дополнительными серинами, чтобы имитировать пространство, создаваемое цистеиновым узлом (см. кристаллическую структуру CD81), за которыми следовали два цистеина, которые закольцовывали структуру пептида. В целях обнаружения или захвата биотиновую функциональную группу размещали на N-конце, который отделялся единичной группой PEG2 биотин-PEG(2)-CSPKDVLETFTVKSSC (цистеины связаны).

### Результаты

AT14-012 является антителом со средней аффинностью. Во-первых, количество гипермутаций в тяжелой (замещение 4 аминокислот) и легкой цепи (замещение 3 аминокислот) AT14-012 может быть признаком того, что иммунная система пациента не была в достаточной мере сенсибилизирована, чтобы приводить к дополнительным гипермутациям в последовательностях переменных доменов. Во-вторых, можно было показать, что AT14-012 не вызывает агрегацию тромбоцитов, тогда как коммерческие антитела, ранее разработанные в других лабораториях, действительно, вызывали агрегацию тромбоцитов. Кроме того, у пациента не развивались никакие симптомы тромбоцитических или тромбоцитопенических нарушений (низкое число тромбоцитов из-за опосредованных антителом разрушения или агрегации тромбоцитов), а потому он не получал никаких препаратов, которые могли бы устранить такую недиагностированную проблему. Главный вопрос-улучшает ли более низкая аффинность AT14-012 свойства такого "типа" антитела к CD9, что обеспечивает оптимальный фенотип тромбоцитов, или же использование уникального эпитопа на CD9 (m4), который является мишенью для AT14-012, приводит к оптимальному неагрегирующему состоянию тромбоцитов. Связывание AT14-012 исследовали посредством ИФА с использованием рекомбинантной экспрессированной второй внеклеточной петли CD9 (EC2), чтобы проанализировать различия аффинностей связывания с широко используемыми коммерческими мышинными антителами к CD9. Ранее было установлено (фиг. 5), что эпитоп для всех исследованных антител к CD9 размещен в петле EC2. Несмотря на различия параметров ИФА для двух испытаний (обнаружение с различными вторичными антителами) человеческих и мышинных (коммерческих) антител, можно было оценить, что величина EC50 для AT14-012 была значительно ниже (EC50 ~ 250 нг/мл) по сравнению с коммерческими H19a (EC50 ~ 20 нг/мл) и ALB6 (EC50 ~ 13 нг/мл). Для более точной оценки аффинности AT14-012 по сравнению с коммерческими антителами применяли не содержащую метки методику обнаружения с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР). На чип ППР со слоем CD9 наносили три отдельных введения. Усредненная аффинность AT14-012 в этих условиях находилась в диапазоне нМ (~ 44 нМ), а у коммерческих антител составляла ~145 пМ для ALB6 и ~2,33 пМ для H19a (фиг. 16). Измеренная скорость диссоциации для AT14-012 была в 700 раз больше по сравнению с H19a, а значит, AT14-012 было в состоянии с достаточной легкостью отсоединяться от CD9. H19a обладает примерно в 19 000 раз более высокой аффинностью вследствие своей низкой скорости диссоциации (KD). Более продолжительные времена диссоциации для H19a или ALB6 не исследовались, поскольку результат для AT14-012 был очевиден. Тем не менее, ALB6 в состоянии медленно диссоциировать после связывания (в ~ 22 раза более высокая степень диссоциации по сравнению с H19a) и обладает несколько более низкой, но все же очень высокой аффинностью по сравнению с H19a.

Подтверждение эпитопа AT14-012 с использованием рекомбинантно экспрессированных аланиновых мутантов CD9-EC2 m4.

Эпитоп более подробно исследовали с помощью методики ИФА посредством инкубирования случайным образом биотинилированных антител к CD9 на захваченном на FLAG-метке белке CD9-EC2-3xFLAG-кролик-Fc. Аланиновые мутанты (аминокислоты с K169A по S180A, описанные на фиг. 5) клонировали и экспрессировали, как описано в разделе "Материалы и способы". Связывание с AT14-012 полностью утрачивалось, если аланиновые мутации вводили в положениях K169A, D171A, L173A, F176A, и значительное снижение связывания можно было наблюдать для V172A (фиг. 17A), что находится в согласии с ранее представленными данными FACS (фиг. 5). Как наблюдалось ранее, ALB6 де-

монстрировало снижение связывания с мутантом F176A. H19a несколько не утрачивает реакционной способности с любым из мутантов и является внутренним контролем на наличие белка CD9 на планшете ИФА. Поэтому можно сделать вывод о том, что эпитоп H19a не находится в областях m3 или m4, или что единичная аланиновая мутация, которую вводят в эти области, не нарушает связывания, поскольку аффинность H19a в таких условиях проведения ППР имеет гораздо более высокое значение. Эпитоп был картирован (выделен красным) на сконструированном гомологе CD9 (фиг. 17B) и располагался на краю внеклеточного участка белка. Аланиновое сканирование m3 на FACS не выявило никакой потери связывания с AT14-012, и не удалось продемонстрировать наличие какого-либо связывания с кольцевым сконструированным пептидом m4 посредством ИФА или ППР (данные не приводятся). Поэтому была высказана гипотеза о том, что на правильный фолдинг области m4 существенно влияют другие области CD9 (m3 и m5), что приводит к образованию конформационного линейного эпитопа AT14-012. Необходимо провести сокристаллизацию для более точного подтверждения данных картирования эпитопа и анализа вклада каждой отдельно взятой аминокислоты на эпитопе CD9, а также на паратопе AT14-012. Данные картирования эпитопа получили дополнительное подтверждение по результатам связывания AT14-012 с клетками различных видов, например яванского макака, мыши и кролика (фиг. 11). AT14-012 было в состоянии реагировать с клетками яванского макака, но связывание утрачивалось при анализе связывания с клетками кролика или мыши. Выравнивание для 5 остатков, обеспечивающих вклад в эпитоп AT14-012, представлено на фиг. 17C (выделены темным/красным). Очевидно, что потеря связывания AT14-012 наблюдается в случае изменения слишком большого числа остатков, как это отмечалось для последовательностей CD9 m4 кролика и мыши. По-видимому, мутации для кролика (V172I, T175S, F176I и T177Q) и мутации для мыши (D172Q, V172L, T175S и T177Q) в области m4 приводят к масштабному конформационному изменению или сдвигу в эпитопе AT14-012, что может служить объяснением отсутствия связывания AT14-012. Следует отметить, что единичная мутация F176L не вызывала потерю связывания AT14-012 с клетками яванского макака (фиг. 17C).

Пример 6. Повышение аффинности AT14-012

#### Материалы и способы

#### Повышение аффинности AT14-012 за счет использования сортировки одиночных клеток для В-клеток 2H15 и ППР

Проводили сортировку одиночных клеток для исходного идентифицированного клона AT14-012 В-клеток (2H15; IgG3) посредством BD FACS ARIA III в ~ 20x 384-луночных планшетах при соответствующих условиях культивирования. Разрастание В-клеток (~ 70%) отслеживали посредством конфокального устройства Operetta (Perkin Elmer), наблюдая GFP-положительные клетки, трансдуцированные Vcl6/Vcl-xL. Содержимое лунок с положительным сигналом переносили в чистый 96-луночный планшет (всего 8 планшетов) и культивировали до 1-2 недель перед отбором супернатанта (100 мкл) в 96-луночный планшет ПЦР с разбавлением 1:1c PBS+0,05% Tween20 + 0,05% азида натрия, после чего герметично запечатывали с замораживанием в морозильной камере при -80°C до дальнейшего использования. Две лунки отводили для контрольных супернатантов исходного клона 2H15 и контрольного супернатанта IgG3 В-клеток клона анти-HRV, который не связывается с CD9 или CD81. ППР выполняли на устройстве IBIS Mx96 (IBIS Technologies). Белки иммобилизовали на чипе ППР с предварительным покрытием стрептавидином (G-STREP H825-065 (Sens Technologies)) с использованием микрожидкостного устройства точечного нанесения CFM (Wasatch Microfluidics). Биотинилированное нанотело к человеческому CH1 (Thermo) и биотинилированное полноразмерное антитело к человеческому Fc (Jackson) точно наносили в различных концентрациях для количественного определения (определение концентрации IgG), а также для качественных оценок (целостность IgG). CD9- и CD81-3xFLAG-кролик-Fc-сортаза-биотин также точно наносили в различных концентрациях для анализа связывания CD9 по сравнению с последовательным разбавлением рекомбинантного антитела AT14-012 (IgG1). Связывание анализировали для всех точек таким образом, чтобы можно было сопоставлять сходные количества точно нанесенных CD9 и CD81. Связывание IgG отслеживали с использованием описанного выше визуализатора поверхностного плазмонного резонанса IBIS, и после каждого последовательного введения чип регенерировали обработкой 10 mM глицин-HCl pH2,0+150 mM NaCl. Ниже представлено подробное описание общего числа введений на каждый планшет: (1) два введения PBST для получения исходного уровня, (2) одно введение антитела к кролику, чтобы убедиться в том, что CD9 и CD81 по-прежнему на чипе и не деградировали со временем/в процессе использования по причине активного стриппинга, (3) одно введение PBST, (4) последовательное разбавление рекомбинантным AT14-012 IgG1 для измерения RU концентрации IgG, а также связывания CD9 (CD81 в качестве контроля связывания)-1,33-4,0-13,30-40,0-133,0 нМ белка, (5) два ряда супернатантов В-клеток (с A1 по A12 и с B1 по B12), (6) одно введение рекомбинантного AT14-012 IgG1, (7) два ряда супернатантов В-клеток (с C1 по C12 и с D1 по D12), (8) одно введение рекомбинантного AT14-012 IgG1 (9) одно введение PBST, (10) два ряда супернатантов В-клеток (с E1 по E12 и с F1 по F12), (11) одно введение рекомбинантного AT14-012 IgG1, (12) в зависимости от планшета одну лунку оставляют для контроля супернатанта В-клеток (планшет 1 клон IgG3 HRV=G1, планшет 2=G2 и т. д.), (13) один ряд супернатантов В-клеток (с G X? по G X?, нумерация зави-

сит от планшета), (14) в зависимости от планшета одну лунку оставляют для контроля супернатанта В-клеток (2H15; исходный клон IgG3, планшет 1=G1, планшет 2=G2 и т. д.), (15) один ряд супернатантов В-клеток (с Н X? по Н X?, нумерация зависит от планшета), (16) одно введение рекомбинантного AT14-012 IgG1, (17) последовательное разбавление рекомбинантного AT14-012 IgG1 для измерения RU концентрации IgG, а также связывания CD9 (CD81 в качестве контроля связывания)-1,33-4,0-13,30-40,0-133,0 нМ белка для проверки различий RU в начале и после прогона, (18) одно введение антитела к кроличьему, чтобы убедиться в том, что CD9 и CD81 по-прежнему на чипе и не деградировали со временем/в процессе использования по причине активного стриппинга, (19) одно заключительное введение PBST. Всего было проведено 117 введений и контролей (PBST и рекомбинантное AT14-012 IgG1) со временем ассоциации 8 мин и временем диссоциации 8 мин, так что в результате полное время прогона составляло ~ 50 ч на планшет. Данные обрабатывают с использованием программного обеспечения SPRintX (IBIS Technologies). Выделение РНК субклона В-клеток, амплификацию и секвенирование кДНК проводили как описано ранее (Kwakkenbos et al., 2010).

#### **Экспрессия и анализ мутантов AT14-012 с высокой аффинностью**

Клеточную линию CHO1-KSV культивировали в течение одной недели в среде CD CHO и обновляли каждые 2-3 дня. Проводили промежуточную экспрессию клеток (на основе Rajendra et al., 2015) с выделенными единичными мутантами (H40Y, Y112F, D116H и T29N), комбинацией двойных мутантов (H40Y/Y112F и D116H/T29N) и комбинацией мутантов по четырем позициям (H40Y/Y112F/D116H/T29N), включая AT14-012 дикого типа и контрольный мутант (G1 10D), который не проявлял связывания CD9. Коротко говоря,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл (10 мл) вносили в среду CD CHO с добавлением 0,25% DMA (Sigma). К культурам добавляли 3,2 мкг/мл ДНК (вектор рXC39, экспрессирующий тяжелую и легкую цепи), а затем PEImax (Sigma). Через два дня добавляли питание в виде 10 мл свежей среды. Через 7 дней среду собирали и количественно оценивали экспрессию IgG посредством ИФА с количественным определением IgG (Jackson). Супернатанты клеточных культур испытывали на связывание с культивированными клетками MelWBO (см. другие разделы) с помощью FACS, и аналогичным образом с использованием той же конфигурации чипа ППР, которая использовалась в способе AIMMprove. Выравнивания проводили с использованием программного обеспечения Seaview (Gozy et al., 2010).

#### **Результаты**

Конструирование высокоаффинных вариантов AT14-012 с помощью ППР. Как отмечалось выше, главный вопрос при конструировании антитела AT14-012 заключается в том, будет ли вариант с более высокой аффинностью (при сравнении с аффинностью ALB6) приводить к агрегации тромбоцитов. Альтернативно, является ли мишенью AT14-012 такой уникальный эпитоп, для которого аффинность не имеет особого значения? Индуцируемая активацией цитидиндеаминаза, также известная как AID, по-прежнему экспрессируется и сохраняет активность в наборе иммортализованных В-клеток. Экспрессия AID не вызывает генетической нестабильности, приводящей к остановке роста и гибели клеток, поскольку 63% засеянных лунок демонстрировали устойчивую экспансию (Kwakkenbos et al., 2010). Таким образом, AID по-прежнему в состоянии вызывать случайные мутации или предпочтительно мутации в гипервариабельной области. Один из подходов к обнаружению мутаций, которые приводят к более высокой аффинности связывания антитела/антигена, предусматривает сортировку одиночных В-клеток, которые будут связываться с флуоресцентно меченным растворимым белком CD9, и сопоставление результата с экспрессией IgG. Коротко говоря, не удалось подобрать параметры, при которых растворимый CD9 как в одиночной, тетрамерной (с использованием стрептавидин-PE), так и в мультимеризованной форме (с использованием меченных PE декстримеров) связывался бы с В-клетками 2H15 (данные не приводятся). Это, скорее всего, связано с цис-характером связывания рецептора В-клетки 2H15 с CD9, экспрессированным на поверхности самой В-клетки. Поэтому использовали аналогичный набор параметров для сортировки одиночных исходных В-клеток 2H15, но при этом анализировали связывание продуцированного IgG с рекомбинантным белком CD9-EC2 посредством ППР (аналогично белку CD9, который использовали для определения аффинности AT14-012). Одиночные В-клетки 2H15 были в состоянии продуцировать достаточные для исследования количества IgG, в особенности если мутация вызывает более эффективное связывание. Вначале анализировали оптимальные условия ППР с использованием IgG, культивированного 2H15, в объеме супернатанта и сопоставляли их с растущими концентрациями рекомбинантного AT14-012 (фиг. 18А) в качестве контроля. После подтверждения соответствующей стадии ассоциации и диссоциации 2H15 IgG использовали условия, при которых наблюдаемая концентрация и целостность IgG в супернатанте В-клеток могут быть соотносены со связыванием рекомбинантного очищенного AT14-012 при надлежащим образом определенных концентрациях IgG (см. фиг. 18А). Соотношение, отражающее связывание антитела к человеческому Fc и антитела к CH1, демонстрировало хорошую корреляцию между концентрацией и стабильно продуцируемым антителом. Кривые ППР для антитела к человеческому Fc растут линейно, тогда как кривые ППР для антитела к CH1 демонстрируют экспоненциальный рост. Удалось идентифицировать 13 клонов с улучшенными или измененными характеристиками связывания после анализа восьми 96-луночных планшетов (~ 800 клонов) и ~ 400 ч прогонов на

ППР (необработанные данные не приводятся). Указанные клоны вносили в культуру и повторно анализировали на вновь сформированном чипе ППР (фиг. 18В). Из 13 исходных клонов только 8 по-прежнему демонстрировали заметное улучшение связывания. Было выделено 3 различных группы, из которых группа 1 демонстрировала более быструю ассоциацию и более медленную диссоциацию (клоны 1D5, 1F5, 4H10, 10B9 и 10D1). Клоны группы 2 демонстрировали более быструю ассоциацию, но также и более быструю диссоциацию (клоны 2D12, 4D4, 6E10 и 9E5), а в группе 3 не отмечалось никаких различий (клоны 1C9, 2H10, 9A9 и 9D12). Анализировали и обнаруживали более прочное связывание клонов с высокой аффинностью на двух различных клеточных линиях меланомы (данные не приводятся). Клоны группы 1 демонстрировали наилучший сдвиг в популяции клеток при FACS. Одна единичная мутация в тяжелой цепи клон объясняет улучшенные характеристики связывания при ППР и на клетках (см. фиг. 18С). Неожиданно было обнаружено, что клон 4D4 являлся единственным клоном с мутациями легкой цепи, но без мутаций тяжелой цепи. Мы также проанализировали несколько клонов, которые демонстрировали экспрессию IgG, но не демонстрировали связывания CD9 (называемые "disPROVE", клоны 1E3, 1E4, 1E5, 1F12, 2A2 и 5B1). Также включали несколько клонов (1G2, 1G3, 1G4 и 1G5), которые демонстрировали согласованные характеристики связывания среди всех 800 проанализированных клонов. Было установлено, что такие клоны по большей части относились к зародышевой линии (фиг. 18С). Наиболее важными мутациями являлись H40Y (4x) и Y112F (1x) (группа 1), а также D116H (2x) и T29N (1x) (группа 2). Мутация L120V (клон 4H10), а также S28N (клон 9E5), обе из которых были локализованы в легкой цепи, исключались по причине наличия других клонов с такой же мутацией в тяжелой цепи, а также с одинаковыми величинами аффинности к CD9.

Исследование высокоаффинных мутантов и их комбинации в среде рекомбинантного AT14-012. Проводили промежуточные экспрессии мутаций с высокой аффинностью в виде единичных, двойных или четверных вариантов в клетках CHO (см. фиг. 19А, где приводятся положения и выравнивания). AT14-012 дикого типа и мутант G110D, который приводил к отсутствию связывания CD9, использовали в качестве контроля. Антитела анализировали на целостность и продукты распада посредством SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Не обнаруживали никаких явных аномалий при обнаружении антител с помощью антитела кролика к тяжелой/легкой цепи человеческого IgG (данные не приводятся). Супернатант продукции использовали при последовательном разбавлении клеток меланомы для анализа связывания CD9 с клеточной поверхностью (фиг. 19В). Мутант G110D, который приводил к потере связывания CD9, действительно препятствовал связыванию с CD9. T29N не оказывал заметного воздействия на улучшение связывания, что отмечалось по результатам скрининга супернатанта В-клеток. D116H демонстрирует ожидаемое улучшение связывания. Комбинация таких двух мутаций группы 2 не объясняет еще более высокий сигнал по сравнению с единичным связыванием D116H. Опять же, такой результат объясняет отсутствие воздействия мутации T29N в рекомбинантной форме. К счастью, связывание мутаций группы 1 повышалось значительно заметнее в случае H40Y, демонстрируя наибольшее воздействие из всех единичных мутаций. Что касается двойного мутанта из группы 1 (H40Y/Y112F), в этом случае эффект воздействия еще более усиливался. Четверной вариант не демонстрировал никаких преимуществ по сравнению с двойным мутантом из группы 1. В полном соответствии с характером связывания, наблюдаемым для AT14-012 дикого типа (фиг. 7А), варианты с высокой аффинностью также демонстрировали более эффективное связывание с клетками меланомы по сравнению с молодыми культурами здоровых меланоцитов (фиг. 19С). Точный профиль связывания получали с использованием параметров ППР для CD9 (фиг. 19D). Вклад в более высокий уровень связывания хорошо объясняется при анализе констант ассоциации и диссоциации (фиг. 19Е). Все одиночные мутанты, кроме T29N, способствовали повышению аффинности связывания. Мутант H40Y демонстрировал повышение в 100 раз, Y112F-в 50 раз и D116H-в 10 раз. Комбинация мутантов группы 1 обеспечивала в 250 раз более высокую аффинность по сравнению с AT14-012 дикого типа (~ 220 пМ). Неожиданно было обнаружено, что значение для четверного мутанта оказалось в два раза меньше (~ 455 пМ) по сравнению с двойным мутантом группы 1. Это позволяет конструировать антитело с диапазоном значений аффинности, сопоставимым с ALB6. Известно, что такое мышинное антитело к CD9 вызывает агрегацию тромбоцитов и используется в качестве положительного контроля при анализе агрегации тромбоцитов. В результате, получены сопоставимые аффинности связывания для ответа на вопрос о том, определяется ли агрегация тромбоцитов аффинностью или эпитопом.

Мутанты AT14-012 с повышенной аффинностью не вызывают агрегацию тромбоцитов.

В соответствии с литературными данными отмечалось, что коммерческое антитело к CD9, антитело ALB6, вызывает агрегацию тромбоцитов. Напротив, инкубирование цельной крови с антителом к CD9 AT14-012 не вызывает агрегацию тромбоцитов. Важно, что при исследовании мутантов с высокой аффинностью в рамках проводившегося анализа агрегации тромбоцитов ни один из вариантов AT14-012 с повышенной аффинностью не был в состоянии вызывать агрегацию тромбоцитов (фиг. 20). Антитело ALB6 включали в анализ в качестве положительного контроля агрегации тромбоцитов. Аффинность двойного мутанта из группы 1 примерно такая же, как и аффинность антитела ALB6 (фиг. 16С). Это означает, что аффинность AT14-012 не связана с отсутствием агрегации тромбоцитов, а напротив, важнейшей характеристикой является распознавание уникального эпитопа на CD9.

Пример 7. Изо- и аллотипы IgG

### Материалы и способы

#### Секвенирование открытой рамки считывания CD9 из полученного от пациента материала опухоли и линий раковых клеток

Коротко говоря, мРНК выделяли с помощью реагента TRIzol, а амплификацию кДНК проводили с использованием случайных праймеров. CD9 амплифицировали посредством ПЦР с использованием праймеров, специфических к CD9, описанных в работе Huang et al., 1998. Последовательности CD9 анализировали из замороженных клеточных осадков молодых культивированных проб двух источников материала первичной опухоли (с выделением AT14-012), обозначенных Me105.18-из кожного поражения, и Me106.07-из поражения мозга. В качестве контроля использовали две другие молодые культивированные пробы материала первичной опухоли, обе с положительным связыванием AT14-012, от других страдающих меланомой пациентов. Кроме того, для анализа последовательности CD9 использовали клеточные линии меланомы MelBLM, MelWBO, A375 и линию Т-клеток Jurkat (отрицательное связывание CD9), а также линию клеток ОМЛ HL-60. Также анализировали клон В-клеток 2H15 и клон В-клеток IgG3 анти-HRV. Секвенирование выполняли непосредственно на продуктах ПЦР (CD9-fw 5'-TGCATCTGTATCCAGCGCCA-3' и CD9-rev 5'-CTCAGGGATGTAAGCTGACT-3').

#### Секвенирование аллотипа IgG3 2H15

Константную область IgG3 клона В-клетки 2H15 определяли выделением РНК по способу TRIzol (Kwakkenbos et al., 2010). кДНК получали с использованием случайных праймеров. Реакцию ПЦР проводили с использованием прямого праймера CH1 (5'-CACCAAGGGCCCATCGGTCTTC-3') и обратного праймера CH3 (5'-TCATTACCCGGAGACAGG-3'). Конструирование праймеров проводили на основе последовательностей человеческого IgG3, которые можно найти на веб-сайте IMGT (<http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/index.php?species=Homo%20sapiens&group=IGHC&gene=IGHG3>). Секвенирование проводили непосредственно на продуктах ПЦР (прямой и обратной), чтобы определять аллотип в соответствии с Vidarsson et al., 2014.

#### Секвенирование AT14-012 IgG-специфических тяжелой и легкой цепей из набора В-клеток пациента

Вариабельные тяжелые и легкие цепи AT14-012 амплифицировали отдельно от кДНК, которую конструировали из выделенного пула РНК совокупного набора В-клеток пациента на момент скрининга В-клеток. РНК выделяли способом TRIzol, и приготовление кДНК проводили в соответствии с ранее описанной процедурой (Kwakkenbos et al., 2010). Во-первых, для амплификации тяжелой цепи проводили стадию предварительной амплификации с использованием смеси двух специфичных к семейству VH3 прямых праймеров VH3-9L (5'-CCATGGAGTTGGGACTGAGC-3') и VH3LB (5'-CACCATGGARYTKKGRCTVBHGC-3') и специфических к IgG обратных праймеров OCG1 (5'-GTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTT-3'), OCG2 (5'-CTGCTGAGGGAGTAGAGTCC-3') и OCG3 (5'-GGTGTGCACCCGCTGGTCAG-3'). Продукты ПЦР собирали из геля ДНК с помощью набора гель-экстракции Qiagen. Проводили стадию вторичной амплификации, чтобы амплифицировать специфические последовательности AT14-012. Проводили четыре различные реакции ПЦР с использованием одного специфического к AT14-012 прямого праймера тяжелой цепи (5'-GTGTCCAGTGTGAAGTGCAGG-3') и 4 различных обратных праймеров AT14-012Hrev A (5'-GGGATAATAACCACTCACGGC-3'), AT14-012Hrev B (5'-GTAGGGATAATAACCACTCAC-3'), AT14-012Hrev C (5'-GTCAAAGTAGGGATAATAAC-3') и AT14-012Hrev D (5'-CCAGTAGTCAAAGTAGGG-3'), которые распознают перестроенную область HCDR3 постадийным образом, чтобы как можно шире покрывать перестроенную последовательность VDJ. При этом каркасную область 4 не секвенировали. Готовые продукты ПЦР из ПЦР А, В, С и D объединяли, и полученную общую смесь ДНК лигировали в вектор для клонирования pCR2.1 TA (Thermo). Вследствие постадийного отжига на области HCDR3 не было необходимости проводить анализ для всех обратных реакций в отдельности. Тем самым, посредством секвенирования можно было установить, какой продукт был амплифицирован тем или иным обратным праймером. Вставки секвенировали с использованием родственных прямого M13 и обратного M13 праймеров. Для амплификации легкой цепи AT14-012 следовали аналогичному протоколу. Прямыми праймерами для амплификации на стадии семейства VK4 являлись VK4L-Fw-leader-ATG: 5'-ACCATGGTGTGTCAGACCCAG-3' и VK4L 5'-TYUCTS YTSCTYTGGATCTCTG-3', и обратный праймер OCK 5'-ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT-3'. Для второй стадии AT14-012-специфической амплификации прямым праймером являлся Fw1-1412L 5'-CAGTCTCCAGACTCCCTGT-3', тогда как в качестве трех LCDR3-специфических обратных праймеров использовали AT14-012Lrev A (5'-GGCCGAAGGTGGAAGGAGTAG-3'), AT14-012Lrev B (5'-GTCCCTTGGCCGAAGGTGGAAG-3') и AT14-012rev C (5'-TGTCCCTTGGCCGAAGGTGG-3'). И вновь, с использованием данного метода ПЦР не удалось разрешить каркасную область 4 легкой цепи.

#### Результаты

AT14-012 распознает немутированный CD9.

Для подтверждения того, что эпитоп на CD9, распознаваемый AT14-012, не содержит мутаций, анализ последовательности проводили для панели различных типов клеток. Проводили ОТ-ПЦР для опухолевых клеток, в том числе клеток меланомы, полученных от исходного пациента, а также для ис-

ходных В-клеток AT14-012/2H15. Ни для одной из исследованных клеток не наблюдались мутации в эпитопе AT14-012, что подтверждает распознавание AT14-012 последовательности дикого типа на CD9. Кроме того, приведенные данные показывают, что соответствующий домен CD9 на экспрессированных иммортализованных В-клетках Vcl6/xL представляет собой последовательность дикого типа.

Антитело 2H15/AT14-012, полученное от В-клеток, имеет аллотип IGHG3\*16.

Исходная В-клетка AT14-012/2H15, полученная от пациента, имеет изотип IgG3. Чтобы определять аллотип полученного антитела, мРНК В-клетки выделяли и подвергали ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфических к области Fc. Полученная последовательность в совокупности с опубликованными данными (Vidarsson et al., 2014) показывает, что клон В-клеток AT14-012, полученных от пациента, имеет аллотип IGHG3\*16 (фиг. 21). Воздействие такого аллотипа IgG3 на антитело, которое является и должно являться AT14-012, в настоящее время не установлено. Ни в одной из опубликованных работ не проводится параллельное сравнение всех аллотипов при анализе эффекторной функции, например, CDC.

#### **Последовательности тяжелой и легкой цепей AT14-012 можно извлекать из полного набора В-клеток**

Целью исследования являлось установление наличия последовательности AT14-012 в полном наборе В-клеток пациента. Путем применения подхода ПЦР с использованием стадии преамплификации для варибельной тяжелой (VH3) и легкой (VK4) цепей семейства IgG, удалось получить соответствующие последовательности AT14-012 с введением гипермутаций в ходе вторичной AT14-012-специфической ПЦР (см. раздел "Материалы и способы"). Из-за ограничений такого подхода не удалось установить каркасную область 4 для обеих цепей. Не отмечалось очевидного увеличения или снижения числа гипермутаций (данные не приводятся) в тяжелой цепи, но было установлено, что в положении T109 легкой цепи (нумерация по IMGT) не во все последовательности вводились гипермутации. Исходная последовательность зародышевой линии содержит серин, и такая гипермутация довольно консервативна по своим свойствам и не должна оказывать существенного воздействия на общую структуру или связывание CD9 (не проверялось).

Пример 8. Комбинирование с антителами к PD1

#### **Материалы и способы**

Формирование иммунной системы человека у мышей (van Lent, Methods Mol Biol, 2010) Сублетально облученным (350 сГр) новорожденным (возраст < 1 нед.) мышам NSG внутрипеченочно вводили человеческие CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> гематопозитические клетки-предшественники. Мыши, которые хорошо восстанавливались и продуцировали иммунные клетки человека, были признаны подходящими для экспериментов с ксенотрансплантатами.

#### **Результаты**

Высокий уровень ингибирования роста меланомы *in vivo* при использовании AT14-012 в комбинации с анти-PD1.

Антитела, блокирующие ось PD1-PDL1, в частности связывающиеся с PD1, в настоящее время широко используют для лечения широкого круга пациентов на поздних стадиях рака. Частота ответа меняется в зависимости от формы рака, как правило, лишь у небольшой доли пациентов отмечался положительный ответ на лечение. Проводили множество клинических испытаний для тестирования антител к PD1 в комбинации с новыми или зарегистрированными соединениями. Проводили испытания эффективности AT14-012 по уничтожению опухолевых клеток в присутствии ниволумаба (Opdivo, Bristol-Myers Squibb) в мышинной модели иммунной системы человека (HIS). HIS у мышей формировали трансплантацией человеческих гематопозитических стволовых клеток мышам NSG (van Lent, Methods Mol Biol, 2010). После формирования иммунной системы, для которой было характерно наличие человеческих иммунных клеток в системе кровообращения, мышам вводили подкожный трансплантат экспрессирующих люциферазу клеток меланомы. До начала лечения опухолям позволяли расти в течение 4 недель до размеров примерно 100 мм<sup>3</sup>. Мышей рандомизировали в 4 различные группы лечения, получавшие внутривенные введения антител дважды в неделю.

AT10-002 (15 мг/кг) + PBS    AT10-002 (15 мг/кг) + ниволумаб (2,5 мг/кг)

AT14-012 (15 мг/кг) + PBS    AT14-012 (15 мг/кг) + ниволумаб (2,5 мг/кг)

Как показали результаты визуализации с люциферазой, у мышей, получавших только антитело AT14-012, отмечали замедленный рост опухоли по сравнению с мышами из группы AT10-002 (антитело к вирусу гриппа) (фиг. 22А, В). Интересно, что при введении AT14-012 в комбинации с антителом к PD1 ингибирование роста опухоли резко усиливалось по сравнению с другими схемами введения антител (фиг. 22А). Расчеты размеров опухоли на день умерщвления по отношению к размеру опухоли на момент начала лечения показали, что комбинация AT14-012+ниволумаб уменьшала размер опухоли почти на 70% (фиг. 22В). Приведенные данные четко показывают, что комбинация антитела к CD9 AT14-012 со стимулирующим Т-клетки антителом обладает большим потенциалом уничтожения опухолевых клеток.

Таблица. Антитело AT14-012

CDR1 тяжелой цепи	DYAMH
CDR2 тяжелой цепи	GISWNSGSIVYADSVKG
CDR3 тяжелой цепи	AVSGYYPYFDY
CDR1 легкой цепи	KSSQSVLYSSNNKNYLG
CDR2 легкой цепи	WASTRES
CDR3 легкой цепи	QQYYTTP
Тяжелая цепь	EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKG LEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQLNSLRAED TAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS
Легкая цепь	DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVY YCQQYYTTPSTFGQGTRLEIK
CDR1 тяжелой цепи	gat tat gcc atg cac
CDR2 тяжелой цепи	ggg att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc
CDR3 тяжелой цепи	gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac
CDR1 легкой цепи	aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt
CDR2 легкой цепи	tgg gca tct acc cgg gaa tcc
CDR3 легкой цепи	cag caa tat tat act act cct
Тяжелая цепь	gaa gtg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg caa ctg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttc tat tac tgt gca aaa gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac tgg ggc cag gga att ttg gtc acc gtc tcc tca
Легкая цепь	gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg tct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act
	ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat act act cct tcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa

## ССЫЛКИ

- de Jong, et al. A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS Biol.* 2016 Jan 6;14(1)
- Gouy et al. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 2010 Feb;27(2):221-4.
- Hanly et al. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR Journal* (1995); Vol.37, Number 3: 93-118
- Hattori et al. Downregulation of rheumatoid arthritis-related antigen RA-A47 (HSP47/colligin-2) in chondrocytic cell lines induces apoptosis and cell-surface expression of RA-A47 in association with CD9. *J.Cell Physiol.* (2005); 202(1): 191-204
- Huang et al. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol.* 1998 Sep;153(3):973-83.
- Iwai et al. Abundant expression of tetraspanin CD9 in activated osteoclasts in ovariectomy-induced osteoporosis and in bone erosions of collagen-induced arthritis. *Rheumatol.Int.* (2008); 28(3): 225-231
- Jin et al. Statins decrease lung inflammation in mice by upregulating tetraspanin CD9 in macrophages. *PLoS One* (2013); Sep 9; 8(9): e73706.
- Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991).
- Kawakatsu et al. Antithrombotic effect of an anti-glycoprotein IIB/IIIa antibody in primate lethal thrombosis. *Thromb Res.* 1993 May 1;70(3):245-54.
- Kwakkenbos MJ et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat Med.* 2010. 16(1):123-8.
- Lee, E.C. et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nature Biotechnology* (2014); 32(4): 356-363.
- Lefranc MP, "Unique database numbering system for immunogenetic analysis" *Immunology Today*, 18, 509 (1997). PMID: 9386342.
- Lefranc MP, "The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains", *The Immunologist*. 1999; 7, 132-136.
- Lefranc MP, et al. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains" *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003).
- Musunuri et al. Increased Levels of Extracellular Microvesicle Markers and Decreased Levels of Endocytic/Exocytic Proteins in the Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis.* 2016 Oct 18;54(4):1671-1686.
- Rajendra et al. A high cell density transient transfection system for therapeutic protein expression based on a CHO GS-knockout cell line: process development and product quality assessment. *Biotechnol Bioeng.* 2015 May;112(5):977-86.
- Seigneuret et al. Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys J.* 2006 Jan 1;90(1):212-27.
- Takeda et al. Preventive role of tetraspanin CD9 in systemic inflammation of COPD. *Am.J.Respir. Cell Mol Biol.* (2015); 53(6):751-760
- Van Lent et al. In vivo modulation of gene expression by lentiviral transduction in "human immune system" *Rag2<sup>-/-</sup> gamma c<sup>-/-</sup>* mice. *Methods Mol Biol.* 2010;595:87-115.
- Verdegaal et al. Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in combination with low-dose interferon-alpha. *Cancer Immunol Immunother* (2011); 60(7): 953-963.
- Vidarsson et al. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520.
- Wagner et al. Budesonide treatment of patients with collagenous colitis restores normal eosinophil and T-cell activity in the colon. *Inflamm.Bowel Dis.* (2010); 16(7): 1118-1126.
- Wagner et al. Bispecific antibody generated with sortase and click chemistry has broad antiinfluenza virus activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Nov 25;111(47):16820-5.
- Yang et al., Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2015 Dec 17;52:5.8.1-15.
- Zimmerman et al. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell.* 2016 Nov 3;167(4):1041-1051.e11.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его функциональный участок, которое(ый) является специфичным к эпитопу CD9, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, и которое(ый) содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP.

2. Антитело или функциональный участок по п.1, которое(ый) содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи QQYYTTP.

3. Антитело или функциональный участок по п.1 или 2, которое(ый) содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи DYAMH или DYAMY; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи AVSGYYPYFDY или AVSGYFPYFDY, или AVSGYYPY-FHY, или AVSGYFPYFHY; и

последовательность CDR1 легкой цепи KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи WASTRES или WASIRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи QQYYTTP.

4. Антитело или функциональный участок по любому из пп.1-3, содержащее(ий) последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGRLEIK.

5. Антитело или функциональный участок по любому из пп.1-4, содержащее(ий)

последовательность варибельной области тяжелой цепи

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFNFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS, или

EVQVVEGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFHYWGQGILVTVSS, или

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFNFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIV  
 YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS, или  
 EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFNFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIV  
 YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFHYWGQGILVTVSS и  
 последовательность вариабельной области легкой цепи  
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNKYLWYQKPGQPPKLLIYWASTRE  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYTTPSTFGQGTRLEIK или  
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNKYLWYQKPGQPPKLLIYWASIRES  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYTTPSTFGQGTRLEIK.

6. Антитело или функциональный участок по любому из пп.1-5, которое(ый) представляет собой человеческое антитело или его функциональный участок.

7. Антитело или функциональный участок по любому из пп.1-6, причем упомянутое антитело представляет собой антитело AT14 012 или его функциональный участок, имеющее(ий) вариабельную последовательность тяжелой цепи EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS, и вариабельную последовательность легкой цепи DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNKYLWYQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYTTPSTFGQGTRLEIK.

8. Антитело или функциональный участок по любому из пп.1-7, причем упомянутое антитело представляет собой изотип IgG, предпочтительно IgG1 или IgG3.

9. Антитело или функциональный участок по п.8, содержащее(ий) аргинин в аминокислотном положении 345 области Fc IgG.

10. Антитело или функциональный участок по любому из пп.1-9, которое(ый) связано(связан) с другим соединением, выбранным из обнаруживаемой метки, химиотерапевтического лекарственного средства, токсичной функциональной группы, иммуномодулирующей молекулы, другого связывающего соединения, специфичного к CD9, или радиоактивного соединения.

11. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует, по меньшей мере, последовательности CDR 1-3 тяжелой цепи и CDR 1-3 легкой цепи антитела или функционального участка по любому из пп.1-9.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п.11, которая кодирует, по меньшей мере, последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела или функционального участка по любому из пп.1-9.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.11 или 12, содержащая последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью gaa gtg cag gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa get cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg caa ctg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttc tat tac tgt gca aaa gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac tgg ggc cag gga att ttg gtc acc gtc tcc tea, и/или содержащая последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg tct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc age agc ctg cag get gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat act act cct tcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-13, которая кодирует антитело или функциональный участок по любому из пп.1-8.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-14, которая содержит кДНК, пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК) или спираль ДНК/РНК.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-15, которая кодон-оптимизирована для экспрессии в не относящейся к человеку клетке-хозяину.

17. Вектор для экспрессии антитела или функционального фрагмента по любому из пп.1-9, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-16.

18. Выделенная клетка для экспрессии антитела или функционального фрагмента по любому из пп.1-9, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-16 или вектор по п.17.

19. Не относящееся к человеку животное для экспрессии антитела или функционального участка по любому из пп.1-9, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-16 или вектор по п.17.

20. Композиция для предотвращения и/или лечения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, содержащая антитело или функциональный участок по любому из пп.1-10, или молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-16, или вектор по п.17, или клетку по п.18.

21. Композиция по п.20, которая представляет собой фармацевтическую композицию, которая также содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

22. Набор компонентов для предотвращения и/или лечения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, включающий антитело или функциональный участок по любому из пп.1-10, молекулу

кулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-16, вектор по п.17 или клетку по п.18 и терапевтический агент, который представляет собой регуляторный белок комплемента или агент, который в состоянии стимулировать образование С3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования С3-конвертазы, или малую молекулу против мутаций BRAF, или другой химиотерапевтический препарат, или блокирующее антитело, специфическое к регуляторному белку комплемента, или блокирующее антитело, специфичное к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки.

23. Набор компонентов по п.22, в котором упомянутый агент представляет собой блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, или антитело к другому регуляторному белку комплемента, предпочтительно блокирующее CD55 антитело.

24. Набор компонентов по п.22, в котором упомянутое антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRP $\alpha$ , антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA и антитела к IDO, и предпочтительно представляет собой блокирующее PD1 антитело или блокирующее PDL1 антитело.

25. Применение композиции по п.20 или 21 в качестве лекарственного средства или профилактического агента.

26. Применение по п.25 для, по меньшей мере, частичного лечения или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9.

27. Применение антитела или функционального участка по любому из пп.1-10 для диагностики нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9.

28. Применение по п.26 или 27, причем упомянутое нарушение выбрано из группы, состоящей из CD9-положительного рака, остеопороза, артрита, воспаления легких, ХОЗЛ, колита и нарушения, связанного с врожденными лимфоидными клетками, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, ЦМВ-ретинита, кандидоза ротовой полости, тромбастении Гланцмана и дифтерии.

29. Применение по п.28, причем упомянутый CD9-положительный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких.

30. Применение по п.25 или 26, причем указанную композицию комбинируют с терапевтическим агентом, применяемым для лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно CD9-положительного рака.

31. Применение по п.30, причем упомянутый агент представляет собой регуляторный белок комплемента или агент, который в состоянии стимулировать образование С3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования С3-конвертазы, или малую молекулу против мутаций BRAF, или другой химиотерапевтический препарат.

32. Применение по п.31, причем упомянутый агент представляет собой блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, или антитело к другому регуляторному белку комплемента, предпочтительно блокирующее CD55 антитело.

33. Применение по п.30, причем упомянутый агент представляет собой блокирующее антитело, специфичное к совместно ингибирующей молекуле Т-клетки.

34. Применение по п.33, причем упомянутое антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRP $\alpha$ , антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA и антитела к IDO, и предпочтительно представляет собой блокирующее PD1 антитело или блокирующее PDL1 антитело.

35. Применение антитела или функционального участка по любому из пп.1-10 для определения того, содержатся ли в пробе клетки, экспрессирующие CD9.

36. Применение по п.35 для определения того, содержатся ли в пробе опухолевые клетки, экспрессирующие CD9.

37. Способ определения присутствия в пробе клеток, экспрессирующих CD9, включающий приведение упомянутой пробы в контакт с антителом или функциональным участком по любому из пп.1-10 и

обеспечение условий для связывания упомянутого антитела или функционального участка с клетками, экспрессирующими CD9, если таковые присутствуют, и

определение наличия или отсутствия связывания клеток, экспрессирующих CD9, с упомянутым антителом или функциональным участком и таким образом определение наличия или отсутствия клеток, экспрессирующих CD9, в упомянутой пробе.

38. Способ по п.37, в котором упомянутые клетки, экспрессирующие CD9, являются CD9-

положительными опухолевыми клетками.

39. Способ продукции антитела или функционального участка по любому из пп.1-9, включающий введение нуклеиновой кислоты или вектора по любому из пп.11-16 в клетку и обеспечение упомянутой клетке условий для трансляции упомянутой молекулы нуклеиновой кислоты и таким образом продукцию упомянутого антитела или функционального участка по любому из пп.1-9.

40. Способ по п.39, дополнительно включающий стадию сбора, очистки и/или выделения упомянутого антитела или функционального участка по любому из пп.1-9.

41. Способ для по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества композиции по п.20 или 21.

42. Способ по п.41, в котором упомянутое нарушение выбрано из группы, состоящей из CD9-положительного рака, остеопороза, артрита, воспаления легких, ХОЗЛ, колита и нарушения, связанного с врожденными лимфоидными клетками, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, ЦМВ-ретинита, кандидоза ротовой полости, тромбастении Гланцмана и дифтерии.

43. Способ по п.42, в котором упомянутый CD9-положительный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, плоскоклеточной карциномы, ОМЛ, множественной миеломы, рака ЖКТ, рака печени, рака головного мозга, саркомы Капоши, мукоэпидермоидной карциномы, хориокарциномы, фибросаркомы, карциномы шейки матки, глиомы, аденокарциномы, аденокарциномы легких, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких.

44. Способ по любому из пп.41-43, в котором упомянутую композицию комбинируют с терапевтическим агентом, применяемым для лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD9, предпочтительно CD9-положительного рака.

45. Способ по п.44, в котором упомянутым агентом является регуляторный белок комплемента или агент, который в состоянии стимулировать образование С3-конвертазы или в состоянии противодействовать ингибированию образования С3-конвертазы, или малая молекула против мутаций BRAF, или другой химиотерапевтический препарат.

46. Способ по п.45, в котором упомянутым агентом является блокирующее CD55 антитело, блокирующее CD46 антитело или блокирующее CD59 антитело, или антитело к другому регуляторному белку комплемента, предпочтительно блокирующее CD55 антитело.

47. Способ по п.44, в котором упомянутым агентом является блокирующее антитело, специфичное к коингибирующей молекуле Т-клетки.

48. Способ п.47, в котором упомянутое антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRP $\alpha$ , антитела TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA и антитела к IDO, и предпочтительно представляет собой блокирующее PD1 антитело или блокирующее PDL1 антитело.

49. Способ *ex vivo* определения того, страдает ли субъект CD9-положительным раком, включающий

приведение опухолевых клеток, взятых от упомянутого субъекта, в контакт с антителом или функциональным участком по любому из пп.1-10,

обеспечение условий для связывания упомянутого антитела или функционального участка с клетками, экспрессирующими CD9, если таковые присутствуют, и

определение наличия или отсутствия связывания клеток, экспрессирующих CD9, с упомянутым антителом или функциональным участком и таким образом определение того, страдает ли упомянутый субъект CD9-положительным раком.

50. Применение пептида CD9 длиной не более 60 аминокислот, содержащего аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, для связывания антитела или его функционального участка по любому из пп.1-10.

51. Применение по п.50, в котором связывание используют для обнаружения или получения антитела.

52. Применение пептида CD9 длиной не более 60 аминокислот, содержащего аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2 для продукции антитела или его функционального участка по любому из пп.1-10.

53. Применение молекулы неклеиновой кислоты, кодирующей пептид CD9 длиной не более 60 аминокислот, содержащего аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, или вектора, содержащего указанную нуклеиновую кислоту для продукции антитела или его функционального участка по любому из пп.1-10.

54. Способ продукции специфического к CD9 антитела по любому из пп.1-9, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного пептидом CD9 длиной не более 60 аминокислот, содержащим аминокислоты, соответствующие K169, D171, V172, L173 и F176 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный пептид, или вектором,

содержащим указанную нуклеиновую кислоту.

55. Способ по п.54, дополнительно включающий получение антитела от упомянутого не относящегося к человеку животного.

56. Т-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR), специфическим к эпитопу CD9, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, содержащим

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP.

57. Связывающее соединение, специфическое к эпитопу CD9, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, содержащее

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP; и

и иммуномодулирующую молекулу.

58. Антитело или его функциональный участок, специфическое(ий) к эпитопу CD9, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, содержащее

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNNKNYLG; и

последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP; и

Fab фрагмент блокирующего CD55 антитела, блокирующего CD46 антитела, блокирующего CD59 антитела, антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, антитела к SIRP $\alpha$ , антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к CD276, антитела к CD272, антитела к KIR, антитела к A2AR, антитела к VISTA или антитела к IDO.

59. Конъюгат антитело-лекарственный препарат, содержащий антитело или его функциональный участок, специфическое к эпитопу CD9, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K169, D171, V172 и L173 последовательности CD9, как показано на фиг. 2, содержащее

последовательность CDR1 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью DYAMH; и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью GISWNSGSIVYADSVKG; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности по-

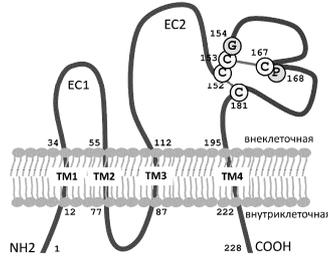
следовательности с последовательностью AVSGYYPYFDY; и

последовательность CDR1 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью KSSQSVLYSSNKNKYLK; и

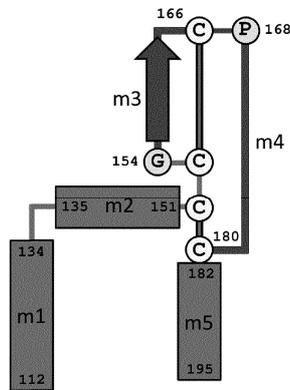
последовательность CDR2 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью WASTRES; и

последовательность CDR3 легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью QQYYTTP,

где указанное антитело или его функциональный участок соединены с терапевтической группой.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

Последовательность CD9 (UNIPROT)

10	20	30	40	50
MPVKGGTKCI	KYLLFGFNFI	FWLAGIAVLA	IGLWLRFDSSQ	TKSIFEQETN
60	70	80	90	100
NNSSFYTGIV	YILIGAGALM	MLVGFLGCCG	AVQESQCMLG	LFFGFLLVIF
110	120	130	140	150
ATETAAAIWG	YSHKDEVIKE	VQEFYKDTYN	KLKTKDEPQR	ETLKAIHYAL
160	170	180	190	200
NCCGLAGGVE	QFISDICPKK	DVLETFVTKS	CPDAIKEVFD	NKFHIIGAVG
210	220			
IGIAVVMIFG	MIFSMILCCA	IRRNREMV		

Фиг. 2

NB: нумерация CDR в соответствии с Kabat et al. (1991)

**AT14-012 (2H15-1A10)**

**Изотип IgG, подтип IgG3, легкая цепь каппа**

**Варибельная область тяжелой цепи**

Рекомбинирован из сегментов гена:

IGHV3-9\*01  
IGHJ3-3\*01  
IGHJ4\*02

**АМИНОКИСЛОТА:**

FW1 EQVWESGGGLVQFGRSLRLSCAASGFTFD  
CDR1 DYAMH  
FW2 WVRQAPKGLWVVS  
CDR2 GISWNSGSIVYADSVKQ  
FW3 RFTISRDNARNSLYLQLNLSRAEDTAFYYCAK  
CDR3 AVSGIYYPFDY  
FW4 WGGILVTVSS

**НУКЛЕОТИД:**

FW1 gaa gtg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt  
gca gcc tct gga ttc acc ttt gat

CDR1 gat tat gcc atg cac

FW2 tgg gtc egg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca

CDR2 ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc

FW3 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg caa ctg aac agt ctg aga gct  
gag gac acg gcc ttc tat tac tgt gca aaa

CDR3 gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac

FW4 tgg ggc cag gga att ttg gtc acc gtc tcc tca

**Варибельная область легкой цепи**

Рекомбинирован из сегментов гена:

IGKV4-1\*01  
IGKJ5\*01

**АМИНОКИСЛОТА:**

FW1 DIVMQSPDSLSVSLGERATINC  
CDR1 KSSQSVLYSSNNRNYLG  
FW2 WYQKPKQPFKLLIY  
CDR2 WASTRES  
FW3 GVPDRFSGSGSDFTLTISLQAEDEVAVYYC  
CDR3 QQYITTP  
FW4 STFGQTRLEIK

**НУКЛЕОТИД:**

FW1 gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg tct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac  
tgc

CDR1 aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt

FW2 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac

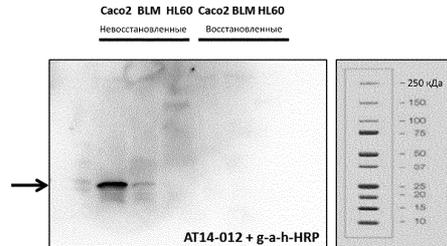
CDR2 tgg gca tct acc cgg gaa tcc

FW3 ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg  
cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt

CDR3 cag caa tat tat act act cct

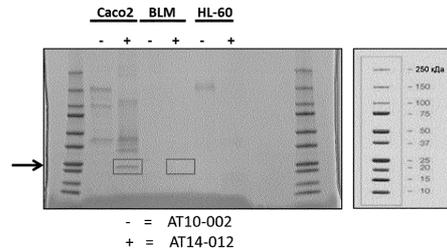
FW4 tcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa

Фиг. 3



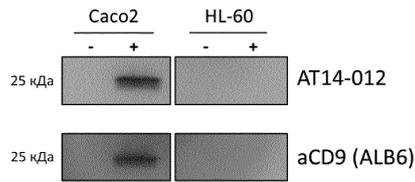
Лизис в TritonX114 (50 мкг лизата на геле)  
AT14-012 при 0,5 мкг/мл (1 ч)  
Козье антитело к человеческому IgG-HRP 1 : 10 000 (0,5 ч)

Фиг. 4А



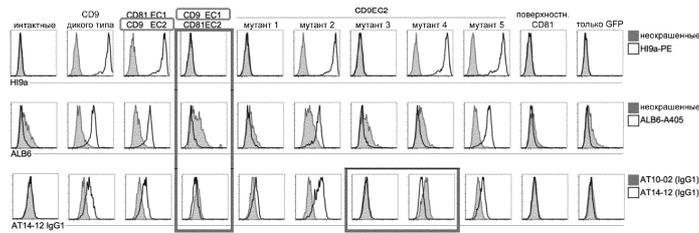
Фиг. 4В

045548



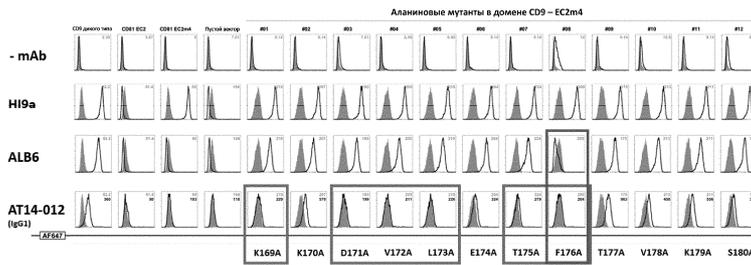
Фиг. 4С

Картирование эпитопа (FACS):  
гибридные мутанты CD9/CD81 EC1 – EC2 – EC2m1 – EC2m2 – EC2m3 – EC2m4 – EC2m5

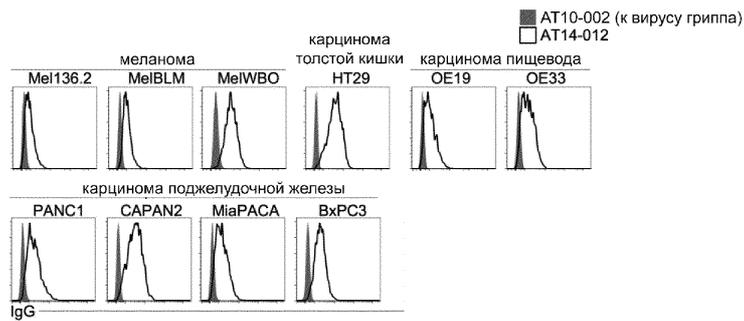


Фиг. 5А

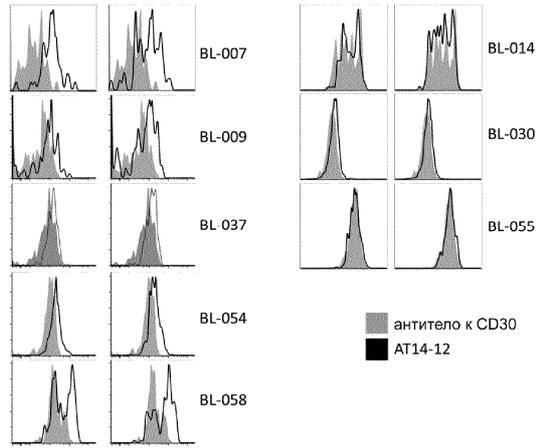
Картирование эпитопа (FACS):  
аланиновые мутанты CD9 EC2m4



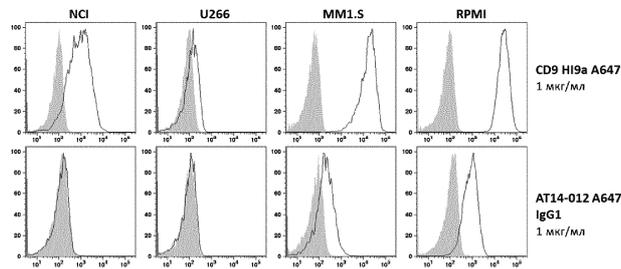
Фиг. 5В



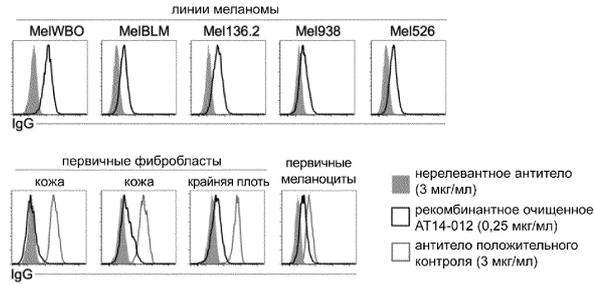
Фиг. 6А



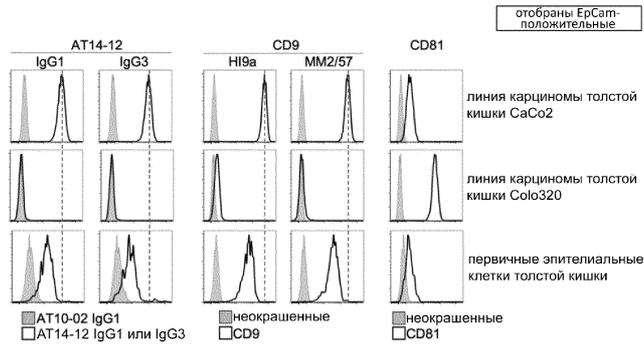
Фиг. 6В



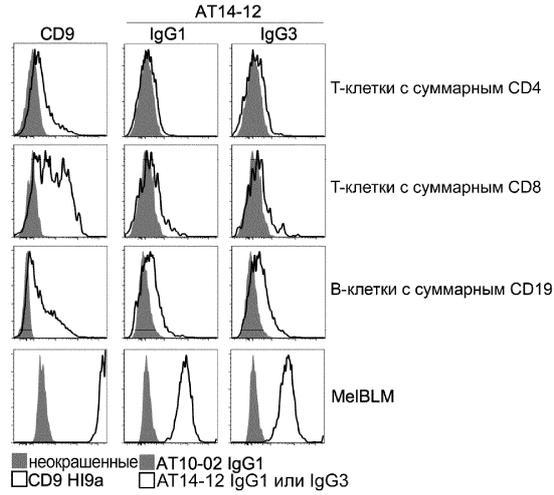
Фиг. 6С



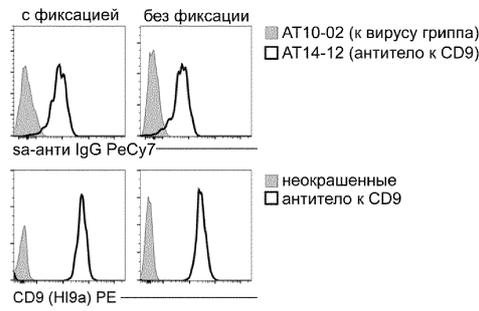
Фиг. 7А



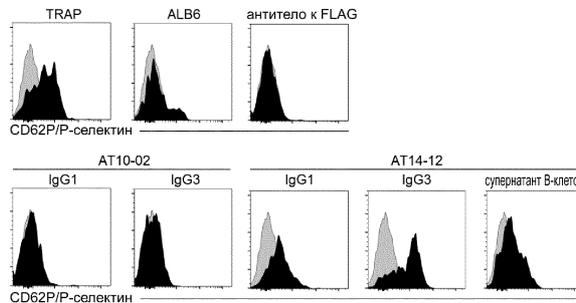
Фиг. 7В



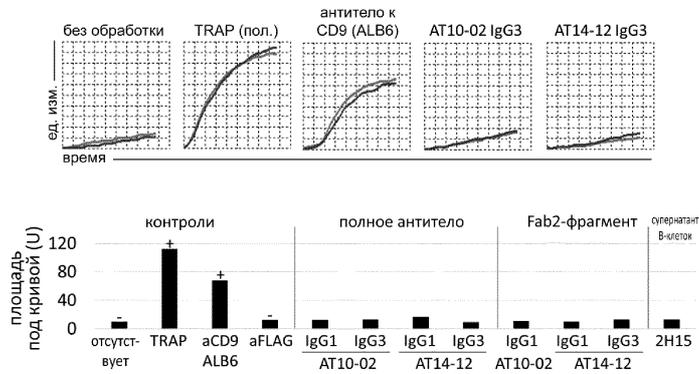
Фиг. 7С



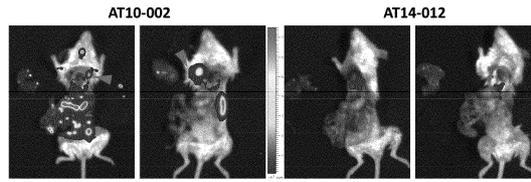
Фиг. 8А



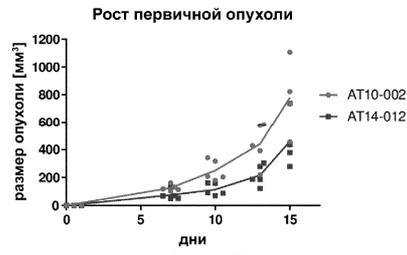
Фиг. 8В



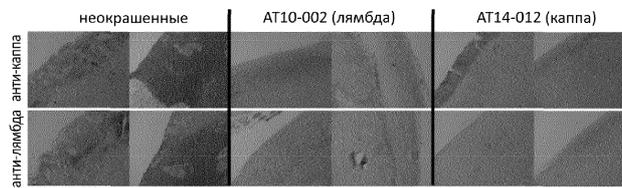
Фиг. 8С



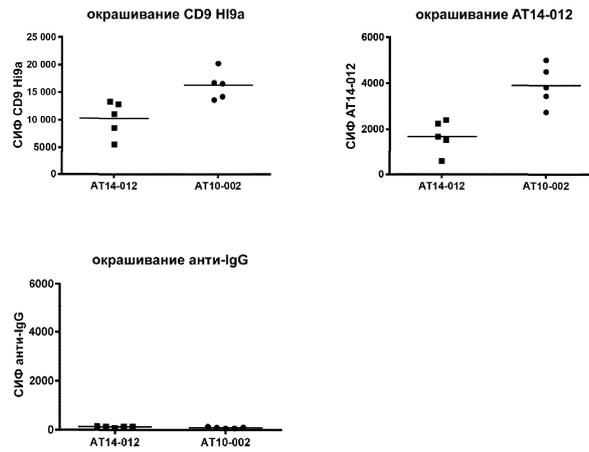
Фиг. 9А



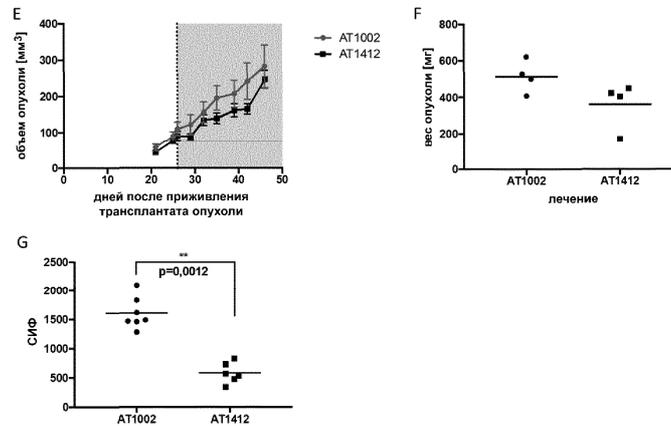
Фиг. 9В



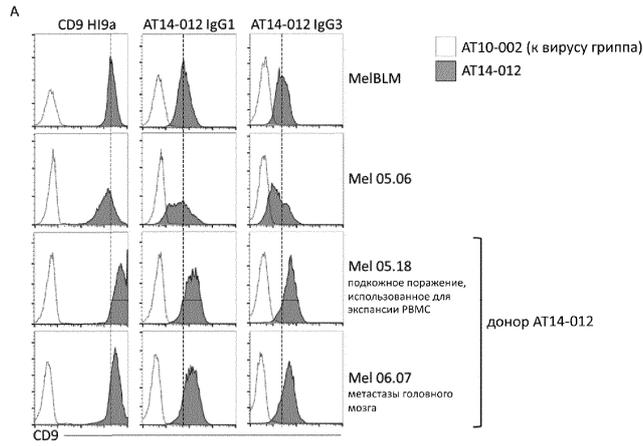
Фиг. 9С



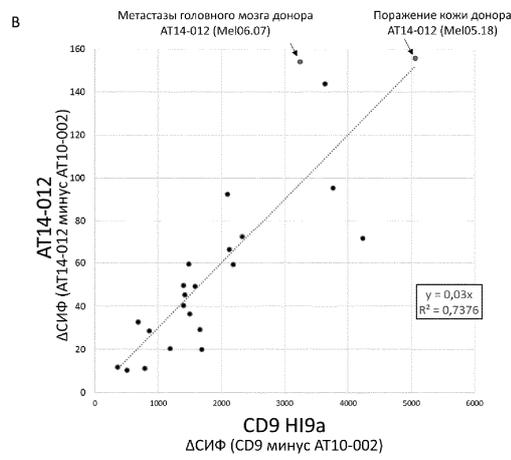
Фиг. 9D



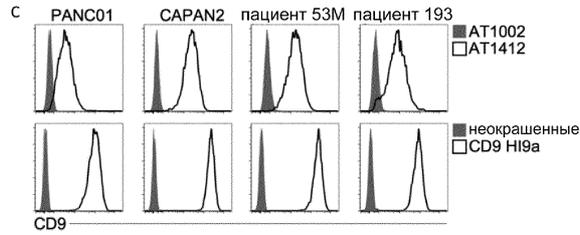
Фиг. 9E-G



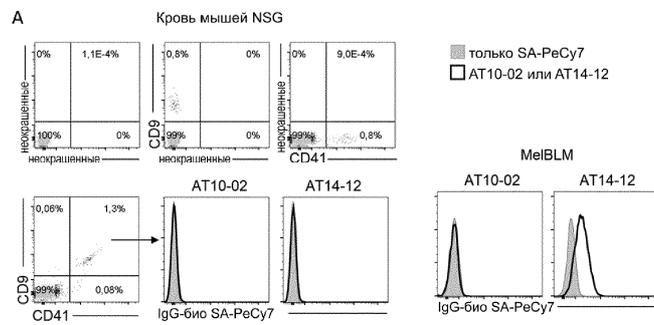
Фиг. 10А



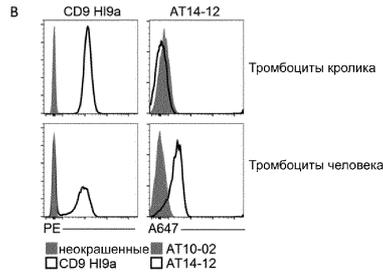
Фиг. 10В



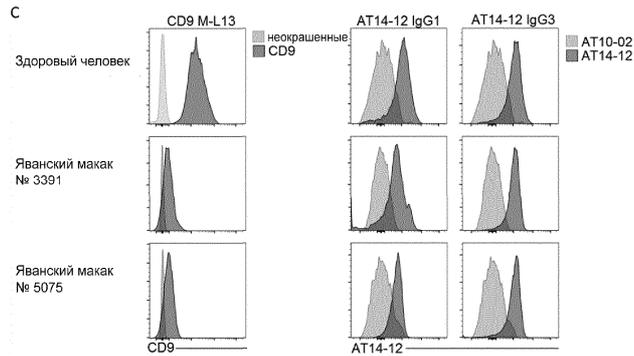
Фиг. 10С



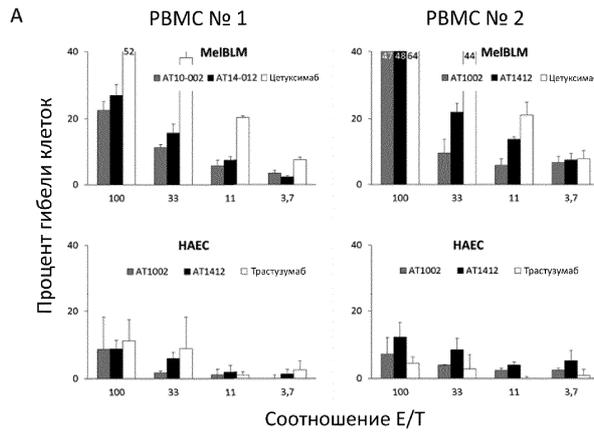
Фиг. 11А



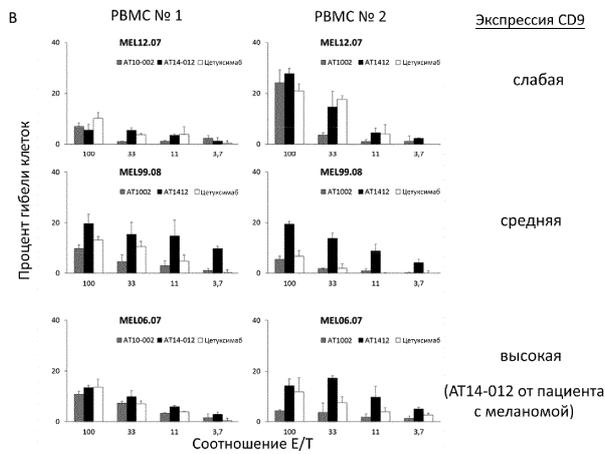
Фиг. 11В



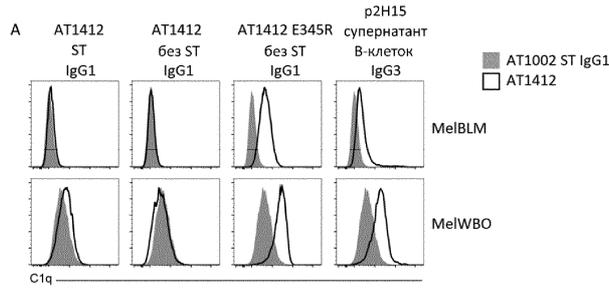
Фиг. 11С



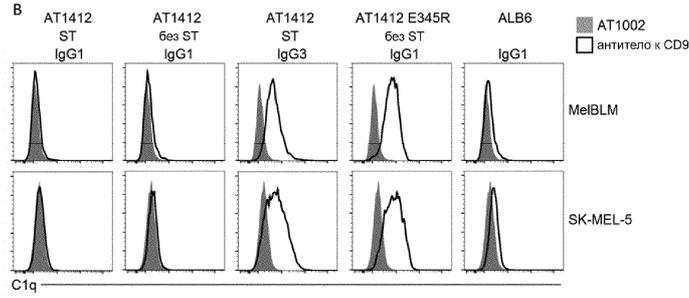
Фиг. 12А



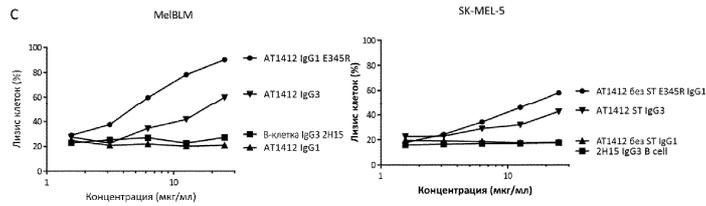
Фиг. 12В



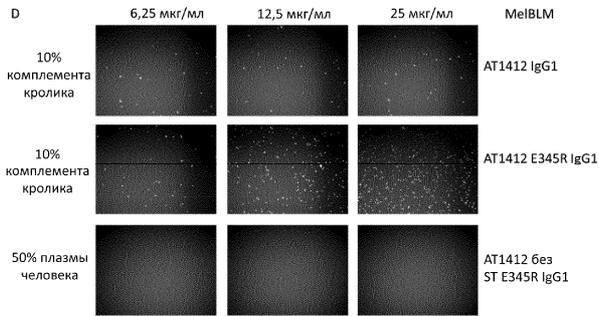
Фиг. 13



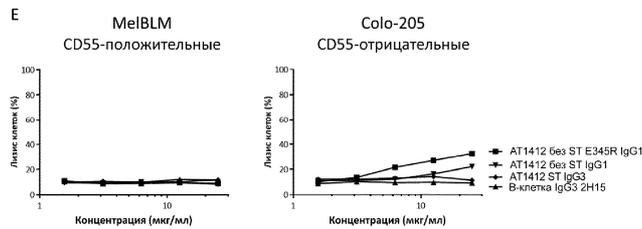
Фиг. 13В



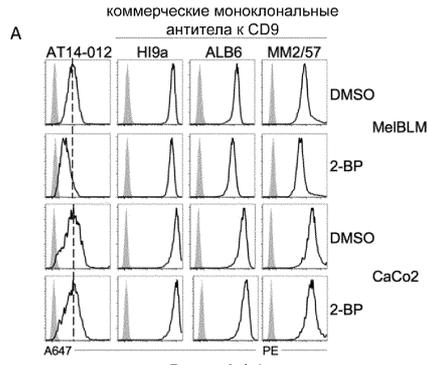
Фиг. 13С



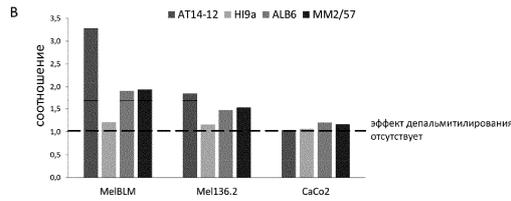
Фиг. 13D



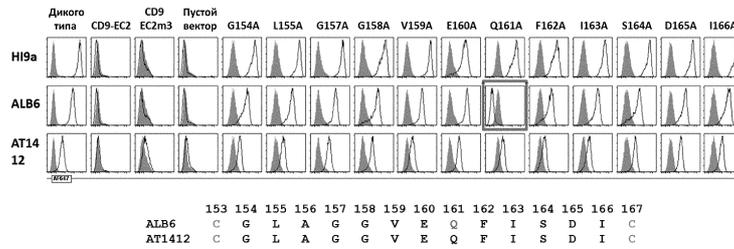
Фиг. 13Е



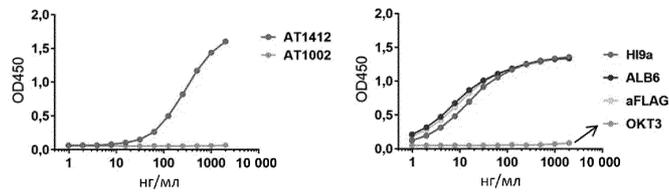
Фиг. 14А



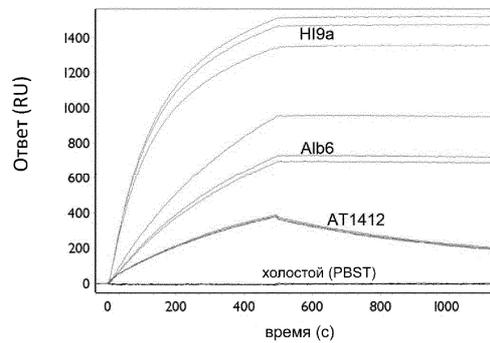
Фиг. 14В



Фиг. 15



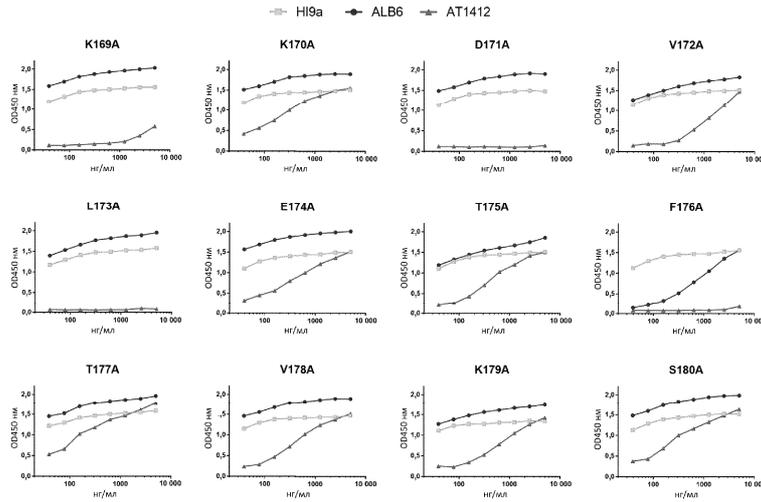
Фиг. 16А



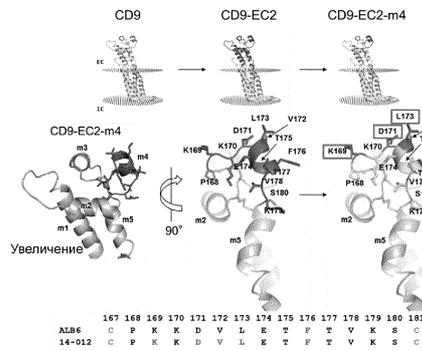
Фиг. 16В

Антитело:	$k_3$	$k_d$	$K_D$
AT1412	1,62 ( $\pm$ 0,52)	71,0 ( $\pm$ 20,6)	44 300 ( $\pm$ 1500)
HI9a	43,0 ( $\pm$ 2,1)	0,1 *	2,33 ( $\pm$ 0,11)
ALB6	15,1 ( $\pm$ 1,3)	2,16 ( $\pm$ 0,30)	145 ( $\pm$ 8)

Фиг. 16С



Фиг. 17А

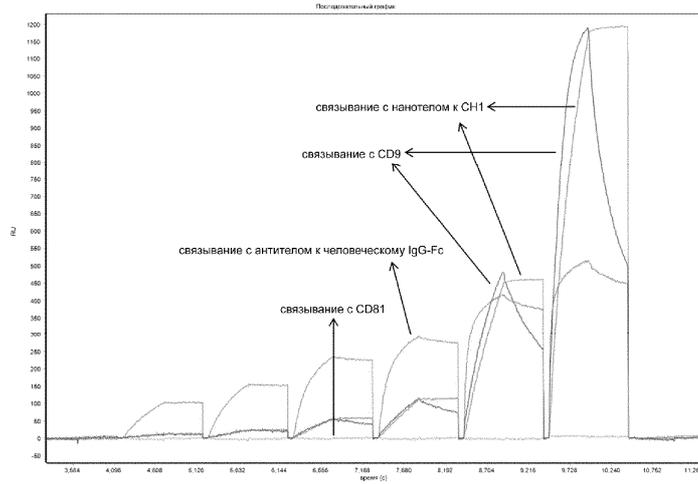


Фиг. 17В

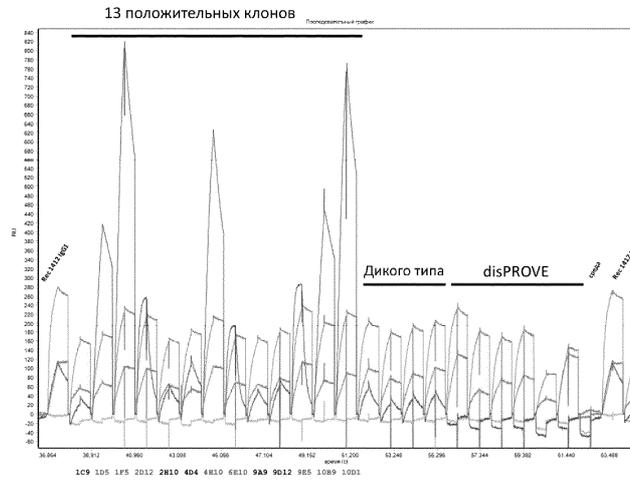
	23	33	43	53	63	73	83
Человек	LAGI	VLAI	GLWLR	FDSP	QTK	SIFE	QETNN
Гиббон	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Горилла	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Орангутанг	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Шимпанзе	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Макак	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Вабуин	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Кролик	.....	.....	.....	DK	.....	.....	.....
Мышь	.....	.....	.....	H	.....	.....	.....
	93	103	113	123	133	143	153
Человек	FG	LLV	IFAI	EIA	AAI	WCYS	NK
Гиббон	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Горилла	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Орангутанг	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Шимпанзе	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Макак	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Вабуин	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Кролик	S	.....	.....	T	.....	.....	.....
Мышь	.....	.....	.....	V	.....	.....	.....
	163	173	183	193	203	213	223
Человек	IS	DC	PK	QV	PE	TF	VK
Гиббон	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Горилла	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Орангутанг	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Шимпанзе	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Макак	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Вабуин	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Кролик	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Мышь	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Фиг. 17С

045548



Фиг. 18А



Фиг. 18В

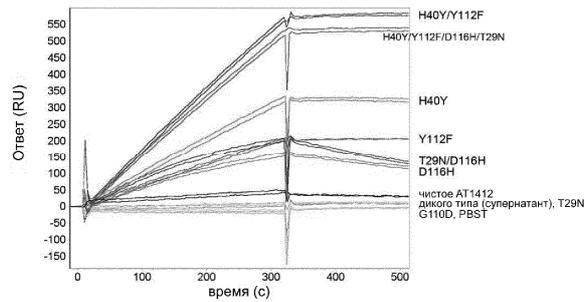
Группа 1: более быстрая ассоциация (ka), более медленная диссоциация (kd)				Мутации:	
	ka	kd	KD	Тяжелая цепь	Легкая цепь
1D5	281,8E+3	6,41E-04	2,3E-9	H40Y	-
1F5	232,8E+3	8,36E-04	3,8E-9	Y112F	-
4H10	190,3E+3	1,06E-03	6,1E-9	H40Y	L120V
10B9	267,6E+3	6,67E-04	2,5E-9	H40Y – A45V (+ молчащий)	-
10D1	230,9E+3	9,04E-04	3,9E-9	H40Y	-
Группа 2: более быстрая ассоциация (ka), более быстрая диссоциация (kd)				Мутации:	
	ka	kd	KD	Тяжелая цепь	Легкая цепь
2D12	896,5E+3	4,6E-3	5,2E-9	D116H	-
4D4	99,5E+3	1,6E-3	15,9E-9	-	T661 - L94P
6E10	498,0E+3	3,1E-3	10,5E-9	T29N	-
9E5	925,4E+3	6,1E-3	6,7E-9	D116H	S28N
Группа 3: нет четкой разницы				Мутации:	
	ka	kd	KD	Тяжелая цепь	Легкая цепь
1C9	52,7E+3	2,2E-3	41,9E-9	Q3P	- (+ молчащий)
2H10	60,7E+3	2,1E-3	33,9E-9	A24T	-
9A9	48,4E+3	2,1E-3	43,4E-9	G27R	-
9D12	42,7E+3	1,1E-3	26,0E-9	S64N - V66I	-
Подобно 2H15				Мутации:	
	ka	kd	KD	Тяжелая цепь	Легкая цепь
1G2	33,4E+3	2,4E-3	73,0E-9	-	-
1G3	33,4E+3	2,4E-3	73,0E-9	-	-
1G4	33,4E+3	2,4E-3	73,0E-9	-	-
1G5	33,4E+3	2,4E-3	73,0E-9	A96G (+ молчащий)	-
disPROVE				Мутации:	
	ka	kd	KD	Тяжелая цепь	Легкая цепь
1E3	-	-	-	V108L	-
1E4	-	-	-	Y37C – (+ молчащий) – A45V – K85R – G110A – G121A	-
1E5	-	-	-	Y117C	-
1F12	-	-	-	S62T	-
2A3	-	-	-	(+ молчащий) – G110D	- (+ молчащий)
5B1	-	-	-	G55S – (+ молчащий) – A96V – T125I	-

Фиг. 18С





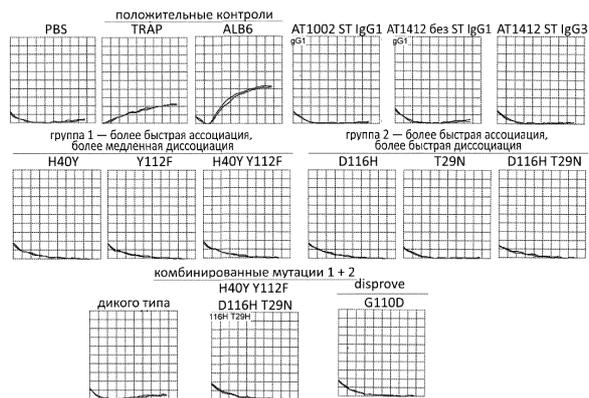
Фиг. 19С



Фиг. 19D

	$K_d$ :	$k_{on}$ :	$K_D$ :
Очищенное AT1412	1,66 ( $\pm$ 0,22)	80,8 ( $\pm$ 1,1)	49.500 ( $\pm$ 7.500)
AT1412 <sup>a</sup>	*	*	*
H40Y <sup>a</sup>	37,2 ( $\pm$ 1,3)	20,2 ( $\pm$ 1,1)	543 ( $\pm$ 11)
Y112F <sup>a</sup>	18,5 ( $\pm$ 1,2)	20,3 ( $\pm$ 2,1)	1.090 ( $\pm$ 40)
H40Y/Y112F <sup>a</sup>	16,4 ( $\pm$ 1,6)	3,69 ( $\pm$ 1,31)	219 ( $\pm$ 58)
D116H <sup>a</sup>	47,0 ( $\pm$ 0,8)	217 ( $\pm$ 3)	4.620 ( $\pm$ 140)
T29N <sup>a</sup>	2,59 ( $\pm$ 0,41)	126 ( $\pm$ 10)	50.100 ( $\pm$ 12.100)
D116/T29N <sup>a</sup>	70,8 ( $\pm$ 1,1)	297 ( $\pm$ 1)	4.190 ( $\pm$ 80)
H40Y/Y112F/D116H/T29N <sup>a</sup>	15,3 ( $\pm$ 1,6)	6,92 ( $\pm$ 0,31)	455 ( $\pm$ 27)
G110D <sup>a</sup>	-	-	-

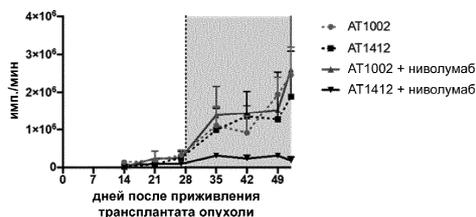
Фиг. 19Е



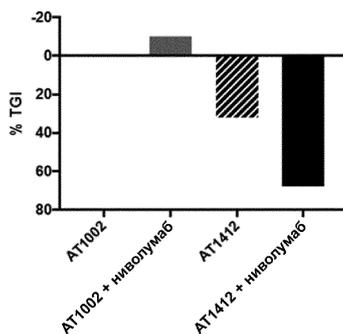
Фиг. 20

	CH1	Экзоны шарнира 1-4	CH2	CH3	
G3m(b*)	SL	+	+	+	FRYL T VSNMKQIRF IGHG3*01,*05,*10, AJ390238
G3m(b*)	SL	+	-	-	FRYL T VSNMKQIRF IGHG3*04, X99549
G3m(b*)	SL	+	+	+	FRYL T VSNMKQIRF IGHG3*09, AJ390242
G3m(b*)	SL	+	+	+	FRFL T VSNMKQIRF IGHG3*11, AJ390247
G3m(b*)	SL	+	-	+	FRFL T VSNMKQIRF IGHG3*12, AJ390252
G3m(b*)	SL	+	+	+	FRYL T VSNMKQIRF IGHG3*06,*07, AJ390237
G3m(b**)	SL	+	+	+	FRYL T VSNMKQIRF IGHG3*08, AJ390241
G3m(c3*)	SL	+	+	+	FRYL T VSNMKQIRF IGHG3*13, AJ390244
G3m(c3c5*)	SL	+	-	+	FRYL T VSNVREVRF IGHG3*03, X16110
G3m(g*)	SL	+	+	+	LRYL T VSNMKQIRY IGHG3*14, AJ390254
G3m(g*)	SL	+	+	+	LRYL T VSNMKQIRY IGHG3*15, AJ390260
G3m(g*)	SL	+	+	+	LRYL A VSNMKQIRY IGHG3*16, AJ390263
G3m(s*)	NF	+	-	+	FRYL T MSKVKQIHY IGHG3*17, AJ390272
G3m(st*)	Y SL	+	-	+	FWYL T MSKVKQIHY IGHG3*18, AJ390276
G3m(st*)	SL	+	-	+	FWYL T MSKVKQIHY IGHG3*19, AJ390279(71, 74)

Фиг. 21



Фиг. 22А



Фиг. 22В

