

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047594**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.09

(21) Номер заявки
202392653

(22) Дата подачи заявки
2022.03.24

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, КОТОРОЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЕТСЯ С GD2**

(31) **2021107773**

(32) **2021.03.24**

(33) **RU**

(43) **2024.02.14**

(86) **PCT/RU2022/050096**

(87) **WO 2022/203552 2022.09.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)**

(56) **WO-A2-2011160119
WO-A2-2005070967
RU-C2-2680267**

(72) Изобретатель:
**Агеев Сергей Андреевич, Черных
Юлия Сергеевна, Кондинская
Диана Александровна, Шигина
Валерия Евгеньевна, Сахарова
Дина Хайдаровна, Грешенштейн
Мария Анатольевна, Столярова
Алина Константиновна, Соловьев
Валерий Владимирович, Яковлев
Павел Андреевич, Морозов Дмитрий
Валентинович (RU)**

(74) Представитель:
Мельчаева О.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и медицины, а именно к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GD2 (ганглиозид GD2). Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанное антитело, векторам экспрессии, клеткам-хозяевам и способам их получения, способам получения антител по изобретению, фармацевтическим композициям, содержащим антитело по изобретению и другие терапевтически активные соединения, способам лечения заболеваний или нарушений, опосредованных GD2, применениям антител или их фармацевтических композиций для лечения заболеваний или нарушений, опосредованных GD2, и применениям антител по изобретению и других терапевтически активных соединений для лечения заболеваний или нарушений, опосредованных GD2.

B1

047594

047594

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и медицины, а именно к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GD2 (ганглиозид GD2). Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанное антитело, векторам экспрессии, клеткам-хозяевам и способам их получения, способам получения антител по изобретению, фармацевтическим композициям, содержащим антитело по изобретению и другие терапевтически активные соединения, способам лечения заболеваний или нарушений, опосредованных GD2, применениям антител или их фармацевтических композиций для лечения заболеваний или нарушений, опосредованных GD2, и применениям антител по изобретению и других терапевтически активных соединений для лечения заболеваний или нарушений, опосредованных GD2.

Уровень техники

GD2 является первым ганглиозидом, который оказался эффективным антигеном-мишенью для иммунотерапии рака.

Ганглиозиды состоят из гликофинколипидов и сиаловых кислот (N-ацетилнейраминавая кислота, Neu5Ac или NANA), которые представляют собой моносахариды с девятью атомами углерода. Номенклатура ганглиозидов основана на количестве и положении остатков NANA. Сначала к керамиду добавляются моносахариды с образованием лактозилцерамида, а затем добавляются остатки NANA с образованием ганглиозидов. Каждый сахар связан с помощью определенных гликозилтрансфераз. GD2 имеет два NANA (α-2,8-сиаловая кислота и α-2,3- сиаловая кислота) и получен из предшественника GD3 путем добавления Gal-NAc через фермент GM2/GD2-синтазу (β1,4-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза). Концевой пентаолигосахарид составляет специфический эпитоп GD2, на который направлены наиболее специфические антитела. Этот критический фермент GM2/GD2-синтаза, ответственный за образование GD2, успешно использовался в качестве молекулярного маркера минимальной остаточной нейроblastомы в костном мозге, оказывая большое прогностическое влияние на выживаемость пациентов. Как показано на путях синтеза ганглиозидов, соседство эпитопа для GD2 может быть четко определено. Например, GD3 и GD1b являются наиболее распространенными перекрестно-реактивными ганглиозидами, распознаваемыми антителами против GD2. Производное GD2 с 9-O-ацетильной модификацией на концевой сиаловой кислоте называется O-ацетил-GD2. В то время как большинство антител против GD2 перекрестно реагируют с O-GD2, а некоторые нет. Антитела против O-GD2 без перекрестной реактивности с GD2 имели меньшую перекрестную реактивность с нормальными нейронами. Ганглиозиды обнаружены на поверхности клеток нервной системы позвоночных. У низших позвоночных, таких как рыбы и земноводные, больше полисиало-ганглиозидов, содержащих от четырех до пяти остатков NANA, тогда как у ганглиозидов высших позвоночных, включая рептилий, птиц и млекопитающих, есть только от одного до трех остатков NANA (MAYA SUZUKI ET AL., Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2015, v. 15, pages 349-362, PMID: 25604432, DOI: 10.1517/14728222.2014.986459).

GD2 экспрессируется на нервных стволовых клетках, мезенхимальных стволовых клетках (МСК) и периферических симпатoadренергических предшественниках, и он участвует в дифференцировке и пролиферации нейронов. В то время как роль полисиаловой кислоты в развитии нейронов широко изучалась, точные функции ганглиозидов, и в частности GD2, остаются неизвестными. После рождения экспрессия GD2 ограничена ЦНС, преимущественно телами нейрональных клеток и МСК, а также периферическими нервами и меланоцитами кожи на низких уровнях. Считается, что GD2 играет роль в поддержании и восстановлении нервных тканей, которые претерпевают постоянно прогрессирующие дегенеративные изменения посредством регуляции активации комплемента и последующего воспаления, хотя точный иммунологический механизм остается неясным. Следует отметить, что GD2 (+) МСК обладают потенциалом дифференцироваться в несколько клонов, включая нейроны (MAYA SUZUKI ET AL., Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2015, v. 15, pages 349-362, PMID: 25604432, DOI: 10.1517/14728222.2014.986459).

GD2 гиперэкспрессируется при различных эмбриональных раковых опухолях (нейробластома, опухоли головного мозга, ретинобластома, саркома Юинга, рабдомиосаркома), опухолях костей (остеосаркома, саркома Юинга), саркомах мягких тканей (лейомиосаркома, липосаркома, фибролросаркома), раке легкого, меланоме и раке груди.

Опухолевые моноклональные антитела (mAb) продемонстрировали эффективность в клинике, став важным методом иммунотерапии рака. Из-за своей ограниченной экспрессии в нормальной ткани дизialogанглиозид GD2, экспрессируемый на клетках нейроblastомы, является отличным кандидатом для терапии mAb.

В международной заявке WO2005070967A2 описано антитело к GD2.

На данный момент в мире всего 2 антитела к GD2 одобрено к терапевтическому использованию (динутуксимаб и натаксимаб). В связи с вышесказанным, актуальным является создание новых антагонистических антител, которое специфически связывается с GD2.

Краткое описание изобретения

Авторами данной группы изобретений были разработаны антитела, которые специфически связываются с GD2, а также имеют по меньшей мере 80 процентную степень гуманизации по варибельным доменам. Данные антитела обладают высокой термостабильностью.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GD2 (ганглиозид GD2), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(a) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: GHNMN (SEQ ID NO: 1) или GKNMN (SEQ ID NO: 2),

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью AIDPFYGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 3),

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: GMFY (SEQ ID NO: 4), GMFY (SEQ ID NO: 5), GMY (SEQ ID NO: 6) или GMLY (SEQ ID NO: 7); и

(b) варибельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: RSSRSLVHRNGNTYLH (SEQ ID NO: 8) или RSSQLVHRNGNTYLH (SEQ ID NO: 9),

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: KVSNRFG (SEQ ID NO: 10) или KVNNRFS (SEQ ID NO: 11),

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: GQSTHVPPLT (SEQ ID NO: 12) или SQSTHVPPLS (SEQ ID NO: 13).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает варибельный домен тяжелой цепи, который содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью

QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSCKASGSSFT (SEQ ID NO: 42),

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью WVRQNIGQGLEWMG (SEQ ID NO: 43),

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью

RVTLTVDKSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCVS (SEQ ID NO: 44) и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 45).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает варибельный домен легкой цепи, который содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSC (SEQ ID NO: 46),

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: WYLQKPGQSPKLLIH (SEQ ID NO: 47) или WYLQKPGQSPQLLIH (SEQ ID NO: 48),

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью

GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC (SEQ ID NO: 49) и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью FGQGTKLELK (SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

a) варибельный домен тяжелой цепи, который содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью

QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSCKASGSSFT (SEQ ID NO: 42),

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью WVRQNIGQGLEWMG (SEQ ID NO: 43),

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью

RVTLTVDKSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCVS (SEQ ID NO: 44) и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 45), и, где

b) варибельный домен легкой цепи, который содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSC (SEQ ID NO: 46),

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: WYLQKPGQSPKLLIH (SEQ ID NO: 47) или WYLQKPGQSPQLLIH (SEQ ID NO: 48),

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью

GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC (SEQ ID NO: 49) и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью FGQGTKLELK (SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает варибельный домен тяжелой цепи, который содержит:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает варибельный домен тяжелой цепи, который содержит:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает:

(а) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, и

(b) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает:

(а) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и

(b) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает:

(а) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и

(b) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любое вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и включает трансформирование клетки вышеуказанным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который заключается в культивировании вышеуказанной клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного антитела.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, которая содержит любое вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в терапевтически эффективном количестве в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, которая содержит любое вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования биологической активности GD2 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, который включает введение субъекту эффективного количества любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выбранного из группы:

- а) введения по меньшей мере одного другого терапевтически активного соединения,
- б) лучевой терапии,
- в) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток,
- г) хирургического лечения и, при необходимости, адъювантной терапии, или
- д) любой комбинации из вышеуказанных а)-г).

В некоторых вариантах осуществления способа лечения заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкокруглоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого вышеуказанного ан-

титела или его антигенсвязывающего фрагмента и меньшей мере одного из группы:

- а) другого терапевтически активного соединения,
- б) лучевой терапии,
- в) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток или

г) хирургического лечения и, при необходимости, адъювантной терапии, для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

В некоторых вариантах осуществления применения заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления применения другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления применения антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления применения антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления применения антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

В некоторых вариантах осуществления применения другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой структуру Fab-фрагмента в комплексе с мишенью GD2.

Фиг. 2 представляет собой карту вектора, несущего генетическую последовательность тяжелой цепи анти-GD2 антитела.

Фиг. 3 представляет собой карту вектора, несущего генетическую последовательность легкой цепи анти-GD2 антитела.

Для фигур 2-3.

Название	Расшифровка
CMV-promotor	Эукариотический промотор CMV
TPL	5' -нетранслируемая трехсторонняя лидерная последовательность аденовируса
E_MLP	Элемент энхансера главного позднего промотора аденовируса
Intron Acceptor	Акцептор сайт
Kozak sequence	GCCGCCACC
Leader IgK	Сигнальный лидерный мышинный пептид IgK
Anti-GD2_VH	Ген переменного домена тяжелой цепи aGD2 антитела. Под Anti-GD2_VH может подразумеваться переменный домен тяжелой цепи aGD2 антитела по изобретению, например, которое выбирают из группы антител к GD2: 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041
Anti-GD2_VL	Ген переменного домена легкой цепи aGD2 антитела. Под Anti-GD2_VL может подразумеваться переменный домен легкой цепи aGD2 антитела по изобретению, например, которое выбирают из группы антител к GD2: 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041
HumIgG1 CK	Ген константного домена легкой цепи СК (каппа)
HumIgG1 HC	Ген константного домена тяжелой цепи HC. HumIgG1 HC может обозначать как вариант без модификаций, так и варианты с точечными мутациями в Fc-фрагменте антитела, которые выбраны из группы: M252Y, S254T, T256 (YTE),

	K322A или YTE + K322A
PolyA signal	Сигнал полиаденилирования
EBV origin eukaryotic (OriP)	Эукариотический ориджин репликации вируса Эпштейна-Барр
pUC origin	Прокариотический ориджин репликации
AmpR	Ген бета-лактамазы, обуславливающий устойчивость к ампициллину. Позволяет вести селекцию культуры клеток E.coli
STOP	Стоп-кодон
START	Старт-кодон

Фиг. 4 представляет собой электрофореграмму кандидатов 10-008 в редуцирующих и нередуцирующих условиях, градиентный гель 4-20% SDS-PAGE.

1. Маркер молекулярного веса;
2. 10-008 1 мкг в нередуцирующих условиях;
3. 10-008 1 мкг в редуцирующих условиях.

Фиг. 5 представляет собой график, где показано наличие антителозависимой клеточной цитотоксичности антитела 10-008 в тесте с клетками-мишенями SK-N-BE(2). В качестве отрицательного контроля использовали точки без добавления антитела.

Фиг. 6 представляет собой график, где показана комплемент-зависимая цитотоксичность антител к GD2 по изобретению в тесте с клетками-мишенями SK-N-BE(2). На графике изображены кривые зависимости уровня флуоресценции витального красителя (отражает количество живых клеток) от концентрации антител при добавлении человеческой сыворотки. В программе SigmaPlot 14.0 на основе логистической модели были получены значения EC_{50} .

Определения и общие методы.

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Термин "Ka", как использовано в данном описании, относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин "KD" или "Kd" относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

"Аффинность связывания" обычно относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иначе, "аффинность связывания" относится к внутренней (характерной, истинной) аффинности связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y обычно можно представить константой диссоциации (Kd). Желательно, чтобы величина Kd составляла, примерно, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 8 нМ, 6 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ или менее. Аффинность можно измерять обычными методами, известными в уровне техники, включая методы по данному описанию. Низкоаффинные антитела обычно медленно связываются с антигеном и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно быстрее связывают антиген и имеют тенденцию дольше оставаться в связанном состоянии. В уровне техники известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из этих методов можно использовать для целей настоящего изобретения.

Термин "koff" или "kdis" относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Константу скорости диссоциации koff можно измерить посредством биослойной интерферометрии, например, с помощью системы Octet™.

Термин "kon" или "on-rate" относится к константе скорости ассоциации.

Термин "off-rate скрининг" относится к скринингу, в рамках которого кандидаты исследуются только на основании значений koff.

Термин "R²" относится к коэффициенту детерминации.

Термин "Response" относится к сигналу связывания антитела с антигеном.

Термин "in vitro" относится к биологическому объекту, биологическому процессу или биологической реакции вне организма, смоделированному в искусственных условиях.

Например, рост клеток in vitro должен пониматься как рост клеток в среде вне организма, например, в пробирке, культуральном флаконе или микропланшете.

Термин "IC50" (50% ингибирующая концентрация) относится к концентрациям препарата, при которых измеряемая активность или отклик, например, рост или пролиферация клеток, таких как опухолевые клетки, ингибируется на 50%. Значение IC50 может оцениваться с помощью соответствующих кривых зависимости от логарифма дозы, с использованием специальных статистических программ для обработки кривых.

Термин ED50 (EC50) (50% эффективная доза/концентрация) относится к концентрациям препарата, при которых измеримый биологический эффект достигается на 50% (может включать цитотоксичность).

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова "иметь", "включать" и "содержать" или их вариации, такие как "имеет", "имеющий", "включает", "включающий", "содержит" или "содержащий", следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Подробное описание изобретения

Антитело.

Настоящее изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GD2 (ганглиозид GD2).

Термин "моноклональное антитело" или "mAb" относится к антителу, которое синтезировано и выделено отдельной клональной популяцией клеток.

Антитело по изобретению является рекомбинантным антителом.

Термин "рекомбинантное антитело" означает антитело, которое экспрессируется в клетке или клеточной линии, содержащей нуклеотидную последовательность (нуклеотидные последовательности), которая кодирует антитело, при этом указанная нуклеотидная последовательность (нуклеотидные последовательности) не ассоциирована с клеткой в природе.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GD2 (ганглиозид GD2), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(a) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: GHNMN (SEQ ID NO: 1) или GKNMN (SEQ ID NO: 2),

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью AIDPFYGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 3),

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: GMIY (SEQ ID NO: 4), GMFY (SEQ ID NO: 5), GMYI (SEQ ID NO: 6) или GMLY (SEQ ID NO: 7); и

(b) варибельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: RSSRSLVHRNGNTYLH (SEQ ID NO: 8) или RSSQNLVHRNGNTYLH (SEQ ID NO: 9),

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: KVSNRFG (SEQ ID NO: 10) или KVNNRFS (SEQ ID NO: 11),

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: GQSTHVPPLT (SEQ ID NO: 12) или SQSTHVPPLS (SEQ ID NO: 13).

Определение "выделенный" ("изолированный"), применяемое для описания различных антител по данному описанию, означает антитело, идентифицированное и выделенное и/или регенерированное из клетки или клеточной культуры, в которой оно экспрессируется. Примеси (загрязняющие компоненты) из природной среды представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Обычно выделенный полипептид получают в результате по меньшей мере одной стадии очистки.

Амплификация гена GD2 и/или сверхэкспрессия его белка были обнаружены при многих раковых заболеваниях, например, при любом из заболеваний из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелко-клеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкокруглоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

Термин "антитело" или "иммуноглобулин" (Ig), как использовано в данном описании, включает целые антитела. Термин "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяже-

лые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании как VH) и константную область тяжелой цепи. Известно пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, которые обозначают греческими буквами: α , δ , ϵ , γ и μ . (Janeway C.A., Jr. и др., *Immunobiology*, 5-е изд., изд-во Garland Publishing, 2001). Присутствующий тип тяжелой цепи определяет класс антитела; указанные цепи обнаружены в антителах типа IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно (Rhoades R.A., Pflanzner R.G., *Human Physiology*, 4-е изд., изд-во Thomson Learning, 2002). Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; α и μ содержат примерно 450 аминокислот, ϵ и δ состоят примерно из 550 аминокислот. Константная область является идентичной во всех антителах одного и того же изотипа, но отличается в антителах различного изотипа. Тяжелые цепи γ , α и δ содержат константную область, которая состоит из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (выстроены в ряд) и шарнирной области, которая придает гибкость (Woof J., Burton D., *Nat Rev Immunol* 4, 2004, сс.89-99); тяжелые цепи μ и ϵ содержат константную область, которая состоит из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 (Janeway C.A., Jr. и др., *Immunobiology*, 5-е изд., изд-во Garland Publishing, 2001). У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда (λ) и каппа (κ). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно называемой в данном описании как VL) и константной области легкой цепи. Примерная длина легкой цепи составляет 211-217 аминокислот. Предпочтительно легкая цепь представляет собой легкую каппа (κ)-цепь, а константный домен CL предпочтительно представляет собой C-каппа (κ).

"Антитела" согласно изобретению могут представлять собой антитела любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1).

Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарности областями (CDR), разбросанные между областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторными клетками), и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела или "антигенсвязывающий фрагмент" (или просто "часть антитела" или "фрагмент антитела"), как использовано в данном описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин "антигенсвязывающая часть" антитела включают (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH в едином плече антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена VH/VNH. Кроме того, две области Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются разными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинантных способов с использованием синтетического линкера, который дает возможность получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные молекулы также включены в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Такие фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и эти фрагменты подвергаются скринингу таким же образом, как и интактные антитела.

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных доменов широко отличаются в последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределяется на участке вариабельных доменов из 110 аминокислот. Напротив, V области состоят из инвариантных фрагментов, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками чрезвычайной вариабельности, называемых "гипервариабельными областями" или CDR. Каждый вариабельный домен нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, связывающие, и в некоторых случаях являющиеся частью бета-складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с помощью FR и с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Inter-*

est. 5 th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, ADCC).

Термин "гипервариабельная область" по данному описанию относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Обычно гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR", и/или такие остатки из "гипервариабельной петли".

"Kabat номенклатура" или "номенклатура по Kabat" применяются в данной заявке к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем остальные аминокислотные остатки в вариабельных участках тяжелой и легкой цепи антитела (Kabat et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Антитело по данному изобретению, "которое связывает" целевой антиген, представляет собой антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью так, что антитело можно применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на белок или клетку или ткань, экспрессирующую антиген, и в незначительной степени перекрестно реагирует с другими белками. По данным аналитических методов: сортирования флуоресцентно-активированных клеток (FACS), радиоиммунопреципитации (RIA) или ИФА (ELISA), в таких вариантах изобретения степень связывания антитела с белком, не являющимся "мишенью" (с "нецелевым белком"), составляет менее 10% от связывания антитела с конкретным белком-мишенью. По отношению к связыванию антитела с молекулой-мишенью термин "специфическое связывание" или выражения "специфически связывается с" или "специфический к" конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени означает связывание, которое заметно (измеримо) отличается от неспецифического взаимодействия.

Специфическое связывание можно определять количественно, например, определяя связывание молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание можно определять конкурентной реакцией с другой молекулой, аналогичной мишени, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. В данном описании термин "специфическое связывание" или выражения "специфически связывается с" или "специфический к" конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени можно характеризовать на примере молекулы, имеющей Kd к мишени по меньшей мере около 200 нМ, или же по меньшей мере около 150 нМ, или же по меньшей мере около 100 нМ, или же по меньшей мере около 60 нМ, или же по меньшей мере около 50 нМ, или же по меньшей мере около 40 нМ, или же по меньшей мере около 30 нМ, или же по меньшей мере около 20 нМ, или же по меньшей мере около 10 нМ, или же по меньшей мере около 8 нМ, или же по меньшей мере около 6 нМ, или же по меньшей мере около 4 нМ, или же по меньшей мере около 2 нМ, или же по меньшей мере около 1 нМ или выше. В одном варианте изобретения термин "специфическое связывание" относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, практически не связываясь с каким-либо другим полипептидом или эпитопом на полипептиде.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит:

- (i) FR1 с аминокислотной последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGSSFT (SEQ ID NO: 42),
- (ii) FR2 с аминокислотной последовательностью WVRQNIGQGLEWMG (SEQ ID NO: 43),
- (iii) FR3 с аминокислотной последовательностью RVTLTVDKISISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVS (SEQ ID NO: 44) и
- (iv) FR4 с аминокислотной последовательностью WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 45).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен легкой цепи, который содержит:

- (i) FR1 с аминокислотной последовательностью DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSC (SEQ ID NO: 46),
- (ii) FR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: WYLQKPGQSPKLLIH (SEQ ID NO: 47) или WYLQKPGQSPQLLIH (SEQ ID NO: 48),
- (iii) FR3 с аминокислотной последовательностью GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC (SEQ ID NO: 49) и
- (iv) FR4 с аминокислотной последовательностью FGQGTKLELK (SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

- а) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит:
 - (i) FR1 с аминокислотной последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGSSFT (SEQ ID NO: 42),
 - (ii) FR2 с аминокислотной последовательностью WVRQNIGQGLEWMG (SEQ ID NO: 43),

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью
RVTLTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCVS (SEQ ID NO: 44) и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 45), и, где

b) вариабельный домен легкой цепи, который содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSC (SEQ ID NO: 46),

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы:
WYLQKPGQSPKLLIH (SEQ ID NO: 47) или WYLQKPGQSPQLLIH (SEQ ID NO: 48),

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC (SEQ ID NO: 49) и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью FGQGTKLELK (SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен легкой цепи, который содержит:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен легкой цепи, который содержит:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, (ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, (iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12. В

некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 98 процентов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID

PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCVSGMYWGQGLTV

TVSS (SEQ ID NO: 14),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGSSFTGHNMNWVRQNIQGLEWMGAID

PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCVSGMLYWGQGLTV

VSS (SEQ ID NO: 15),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID

PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCVSGMIYWGQGLTV

VSS (SEQ ID NO: 16)

или

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID

PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCVSGMFYWGQGLTV

VSS (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 96 процентов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокис-

кислотную последовательность, которую выбирают из группы:

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSRSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
VSNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCGQSTHVPPLTFGQGTKLELK
(SEQ ID NO: 18),

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSRSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIHK
VSNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCGQSTHVPPLTFGQGTKLELK
(SEQ ID NO: 19),

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSRSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
VNNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPPLSFGQGTKLELK
(SEQ ID NO: 20)

или

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSQNLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
VNNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCGQSTHVPPLTFGQGTKLELK
(SEQ ID NO: 21).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 98 процентов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

(b) вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 96 процентов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17;

(b) вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

(b) вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

(b) вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с GD2, представляет собой полноразмерное антитело IgG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG, которое относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG, которое относится к изотипу IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело содержит мутации YTE (M252Y, S254T, T256E) и/или K322A в Fc фрагменте в сравнении с природной последовательностью Fc фрагмента.

Вышеуказанные мутации в Fc фрагменте пронумерованы согласно нумерации аминокислот цепей антител EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, ee. 78- 85; Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)".

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIGQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCVSGMYWQGGLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY T
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGHNMNWVRQNIGQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCVSGMLYWGQGLV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIGQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCVSGMIYWGQGLV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIGQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCVSGMFYWGQGLV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIGQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCVSGMYWQGGLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY T
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGHNMNWVRQNIGQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCVSGMLYWGQGLV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNVWRQNIQGLEWMGAIDPFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVSGMIYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNVWRQNIQGLEWMGAIDPFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVSGMFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNVWRQNIQGLEWMGAIDPFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVSGMYWYGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 30),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNVWRQNIQGLEWMGAIDPFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVSGMLYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVSGMIYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVSGMFIYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 33),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVSGMIYWGQGLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGHNMNWVRQNIQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVSGMLYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35),

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNWVRQNIQGLEWMGAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVSGMIYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)

или

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSSFTGKNMNVWRQNIQGLEWMAID
 PFYGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVSGMFYWGQGLTLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы:

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSRSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
 VSNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCGQSTHVPPLTFGQGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 38),

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSRSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIHK
 VSNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCGQSTHVPPLTFGQGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 39),

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSRSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
 VNNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPPLSFGQGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40)

или

DIVMTQTPLSLSVTPGERASLSCRSSQNLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK
 VNNRFGGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCGQSTHVPPLTFGQGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 41).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает:

(a) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, и

(b) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает:

(a) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и

(b) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело включает:

(a) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и

(b) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с GD2, представляет собой антитело 07-006. Антитело 07-006 включает:

(a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. Антитело 07-

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) CDR1 (IMGT) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64,

(ii) CDR2 (IMGT) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66, (iii) CDR3 (IMGT) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68, и (b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) CDR1 (IMGT) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72, (ii) CDR2 (IMGT) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, (iii) CDR3 (IMGT) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75. Предлагается модификация(и) аминокислотных последовательностей антител. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают введением соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Осуществляют любое сочетание делеции, инсерции и замены, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционные процессы в антителе, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Вариант модификации аминокислотных последовательностей антител с помощью аминокислотных замен. Такой вариант представляет собой замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в молекуле антитела на другой остаток. Места, представляющие наибольший интерес для мутагенеза путем замен, включают гипервариабельные области или CDR, но также предполагаются изменения и в области FR или Fc. Консервативные замены показаны в табл. 1 под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть введены дополнительные существенные изменения, названные "примерами замен" в таблице A, или изменения, дополнительно описанные ниже при описании классов аминокислот, и может быть проведен скрининг продуктов.

Таблица A		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu

Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031, 07-041 включают Fc фрагмент, который содержит мутации YTE (M252Y, S254T, T256E) и/или K322A в сравнении с природной последовательностью Fc фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031, 07-041 включают Fc фрагмент, который содержит мутации YTE (M252Y, S254T, T256E) и K322A в сравнении с природной последовательностью Fc фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031, 07-041 включают Fc фрагмент, который содержит мутации YTE (M252Y, S254T, T256E) в сравнении с природной последовательностью Fc фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031, 07-041 включают Fc фрагмент, который содержит мутацию K322A в сравнении с природной последовательностью Fc фрагмента.

Антитело 07-006 с YTE и K322A мутациями включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и
- (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

Антитело 07-015 с YTE и K322A мутациями включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Антитело 07-016 с YTE и K322A мутациями включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. Антитело 07-028 с YTE и K322A мутациями включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. Антитело 07-031 с YTE и K322A мутациями (или антитело 10-02) включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Антитело 07-041 с YTE и K322A мутациями (или антитело 10-08) включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. Антитело 07-006 с YTE мутациями включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. Антитело 07-015 с YTE мутациями включает:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Антитело 07-016 с YTE мутациями включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. Антитело 07-028 с YTE мутациями включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. Антитело 07-031 с YTE мутациями (или антитело 10-01) включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Антитело 07-041 с YTE мутациями (или антитело 10-07) включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. Антитело 07-006 с K322A мутацией включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. Антитело 07-015 с K322A мутацией включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Антитело 07-016 с K322A мутацией включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. Антитело 07-028 с K322A мутацией включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. Антитело 07-031 с K322A мутацией (или антитело 10-03) включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Антитело 07-041 с K322A мутацией (или антитело 10-09) включает:
- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и
 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению могут быть афукозилированными.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению могут быть фукозилированными.

Наличие или отсутствие фукозилирования антител будет зависеть от культуры клеток, которая используется для получения антител по изобретению.

Фрагменты антител.

В определенных обстоятельствах целесообразно применять фрагменты антител, а не полные антитела. Меньший размер фрагментов способствует их быстрому клиренсу и может способствовать лучшему проникновению в плотные опухоли.

Для получения фрагментов антител разработаны различные методы. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto и др., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24, 1992, сс. 107-117 и Brennan и др., *Science*, 229, 1985, с. 81). Однако в настоящее время эти фрагменты можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител можно экспрессировать и секретировать из *E. coli*, что позволяет облегчать производство больших количеств указанных фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител. Согласно другому варианту Fab'-SH-фрагменты можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (Carter и др., *Bio/Technology*, 10, 1992, сс. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагмент с повышенным временем полужизни *in vivo*, в которых сохранены остатки эпитопсвязывающего рецептора, описаны в US 5869046. Специалистам в данной области должны быть очевидны другие методики получения фрагментов антител. В других вариантах осуществления изобретения выбранное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) (см. WO 93/16185; US 5571894 и US США 5587458). Fv и scFv представляют собой единственные виды с интактными связывающими сайтами, лишённые константных областей; в результате их можно применять для пониженного неспецифического связывания при применении *in vivo*. Слитые белки, несущие scFv, можно конструировать для получения слияния эффекторного белка либо на N-, либо на C-конце scFv (см. *Antibody Engineering*, под ред. Vogtbaeck, выше). Фрагмент антитела может представлять собой также "линейное антитело", например описанное в US 5641870.

Молекула нуклеиновой кислоты.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любое вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2.

В любом из указанных выше вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот могут быть выделенными.

Термины "нуклеиновая кислота", "нуклеиновая последовательность" или "нуклеиновокислотная последовательность", "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "полинуклеотидная последовательность" и "нуклеотидная последовательность", которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает его комплимент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-76. Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать любую комбинацию указанных нуклеотидных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

Молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может быть выделена из любого источника, который продуцирует моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может быть синтезирована, а не выделена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела 07-006, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела 07-006, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела 07-015, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела 07-015, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела 07-016, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела 07-016, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела 07-028, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность переменного домена легкой

цепи антитела 07-028, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 07-031, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 07-031, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 07-041, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 07-041, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела 10-001, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи антитела 10-001, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела 10-002, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи антитела 10-002, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела 10-003, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи антитела 10-003, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела 10-007, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи антитела 10-007, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела 10-008, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи антитела 10-008, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела 10-009, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи антитела 10-009, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 100.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться для экспрессии рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2.

Вектор.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему вышеуказанную выделенную нуклеиновую кислоту. Настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе.

Термин "вектор" при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двуцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены

(например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы" ("вектор экспрессии" или "экспрессионный вектор")).

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любую из аминокислотных последовательностей моноклонального антитела, которое специфически связывается с GD2, или их частей (например, последовательностей связывающих доменов тяжелой цепи и/или легкой цепи) как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение далее относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или фрагменты данных антител.

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК, кодирующие частично или по всей длине последовательности первого и второго связывающих доменов (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательность тяжелой и легкой цепи) могут быть введены в отдельные векторы. В одном варианте осуществления изобретения любая комбинация указанных выше молекул ДНК вводится в тот же экспрессионный вектор. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящим вектором является тот, который включает места рестрикции так, что любая последовательность VH или VL может быть легко включена и экспрессирована, как описано выше. Прекращение полиаденилирования и транскрипции может произойти вниз по ходу сайта нативной хромосомы кодируемых участков. Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает выработку цепочки антитела клеткой-хозяином. Ген цепочки антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца цепи иммуноглобулина. Сигнальным пептидом может быть сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

В некоторых вариантах осуществления изобретения помимо цепочки генов антител, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антител в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в дополнение к генам цепи антитела и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемого маркера. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор может включать последовательность контроля экспрессии. Термин "последовательность контроля экспрессии", используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую

мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролируемых последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролируемые последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролируемые последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин "контролируемые последовательности" включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

Клетка-хозяин.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, и включает трансформирование клетки вышеуказанным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, которая содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") при использовании в данном документе означает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут включать, например, вектор в соответствии с настоящим изобретением, описанным выше. Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, которые включают, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающие части, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающие части, или обе из них, связывающего домена связывающей молекулы по данному изобретению. Следует понимать, что "рекомбинантная клетка-хозяин" и "клетка-хозяин" означают не только конкретную заявленную клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку модификации могут проходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, на самом деле, быть идентичным родительской клетке, но такие клетки по-прежнему включены в объем термина "клетка-хозяин" при использовании в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, по изобретению и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего или его клетки, растения или его клетки, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстран опосредованную трансфекцию, трансфекцию комплексом нуклеиновой кислоты и позитивно заряженного полимера, трансфекцию преципитатом нуклеиновых кислот и фосфата кальция, полибрен опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, трансфекцию инкапсулированными в липосомы полинуклеотидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. В дополнение молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами.

Клеточные линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий. К ним относятся, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, НЕК-293Т клетки, 293 Фристайл клетки (Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (ВНК), клетки почек африканских зеленых мартышек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необходимые характеристики продуцируемого белка. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, антитела или их фрагменты продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточно для экспрессии антител или их фрагментов в клетках-хозяевах или, предпочтительнее, выделения антител или их фрагментов в питательную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, могут быть выделены из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ясню, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, уровень продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS)

является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях.

Вполне вероятно, что моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, различных клеточных линий будут отличаться друг от друга профилем гликозилирования. Однако моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе, или содержащее аминокислотные последовательности, приведенные в настоящем документе, являются частью данного изобретения, независимо от состояния гликозилирования связывающих молекул и в целом, независимо от наличия или отсутствия посттрансляционных модификаций.

Вышеуказанная клетка-хозяин не относится к клетке-хозяину, полученной с использованием человеческих эмбрионов.

Вышеуказанная клетка-хозяин не относится к клетке-хозяину, полученной с модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

Способ получения антитела.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, заключающемуся в культивировании описанной выше клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его фрагмента, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его фрагмента.

Настоящего изобретения относится к способам получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению. Один вариант осуществления изобретения относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, как определено в настоящем документе, содержащему получение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать моноклональное антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, культивированию указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, и выделение полученного моноклонального антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с GD2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, полученные такой экспрессией в таких рекомбинантных клетках-хозяевах упоминается в данном документе как "рекомбинантное моноклональное антитело, которое специфически связывается с GD2" или "антигенсвязывающий фрагмент рекомбинантного моноклонального антитела, который специфически связывается с GD2". Изобретение также относится к потомству таких клеток-хозяев.

Фармацевтические композиции.

Другим аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента (или в качестве единственного активного ингредиента) моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, которая содержит любое из вышеуказанных антител или его антигенсвязывающих фрагментов в терапевтически эффективном количестве в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

"Фармацевтическая композиция" обозначает композицию, включающую в себя антитело согласно изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных, распределяющих и воспринимающих средств, средств доставки, таких как консерванты, стабилизаторы, наполнители, измельчители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, подсластители, отдушки, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, лубриканты, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Примерами суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен, сорбитол и сорбитовый эфир, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси этих веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как парабены, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобные им соединения. Композиция может включать также изотонические агенты, например, сахара, полиолы, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, растительные масла (такие, как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры (такие, как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и им подобные. Примерами измельчителей и распределяющих средств являются крахмал, альгиновая кислота и ее соли, силикаты. Примерами лубрикантов являются стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоль с высо-

ким молекулярным весом. Фармацевтическая композиция для перорального, сублингвального, трансдермального, внутриглазного, внутримышечного, внутривенного, подкожного, местного или ректального введения активного начала, одного или в комбинации с другим активным началом, может быть введена животным и людям в стандартной форме введения в виде смеси с традиционными фармацевтическими носителями. Пригодные стандартные формы введения включают пероральные формы, такие как таблетки, желатиновые капсулы, пилюли, порошки, гранулы, жевательные резинки и пероральные растворы или суспензии, сублингвальные и трансбуккальные формы введения, аэрозоли, имплантаты, местные, трансдермальные, подкожные, внутримышечные, внутривенные, интраназальные или внутриглазные формы введения и ректальные формы введения.

Термин "эксципиент" или "вспомогательное вещество" используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от антигена по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для улучшения, профилактики или лечения нарушений, которые могут быть связаны с GD2.

Термин "заболевание или нарушение, опосредованное GD2", подразумевает все заболевания или нарушения, которые либо прямо, либо косвенно связаны с GD2, включая этиологию, развитие, прогресс, персистенность или патологию заболевания или нарушения.

"Лечить", "лечение" и "терапия" относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Используемый в данном документе, чтобы "облегчить" болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на "лечение" включает ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин "нарушение" означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению. В определение данного термина входят хронические и острые нарушения или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к возникновению данного нарушения.

"Терапевтически эффективным количеством" считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланомы, В-клеточная лимфома, мелко-клеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкокруглоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солюбилизаторы. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного фармацевтического ингредиента, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, масла и инъекционные органические сложные эфиры.

Любой способ введения пептидов, белков или антигенов, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для моноклонального антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает один или несколько совместимых жидких или твердых компонентов, которые подходят для введения млекопитающему, предпочтительно человеку.

Под термином "буфер", "буферная композиция", "буферный агент" понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату антигена, которое специфически связывается с GD2, проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Термины "тонический агент", "осмолитик" или "осмотический агент" в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антигена. "Изотоничный" препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое дав-

ление, эквивалентное давлению человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм/кг. В качестве изотонических агентов могут быть использованы полиолы, моно- и дисахара, аминокислоты, соли металлов, например, хлорид натрия, и т.п., но, не ограничиваясь ими.

Под "стабилизатором" понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента. В качестве стабилизаторов могут быть использованы аминокислоты, например, аргинин, гистидин, глицин, лизин, глутамин, пролин, но, не ограничиваясь ими; поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 20 (торговое наименование Tween 20), полисорбат 80 (торговое наименование Tween 80), полиэтилен-полипропилен гликоль и его кополимеры (торговые наименования Полоксамер (Poloxamer), Плуроник (Pluronic)), натрия додецилсульфат (SDS), но, не ограничиваясь ими; антиоксиданты, например, метионин, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота, моноиоглицерол, соли серистых кислот, и т.п., но не ограничиваясь ими; хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), цитрат натрия и т.п., но не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция по изобретению является стабильной.

Фармацевтическая композиция является "стабильной", если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8°C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин "единичная стандартная доза" означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, как правило, пригодны для парентерального введения в виде стерильных лекарственных средств, предназначенных для введения в организм человека с нарушением целостности кожных покровов или слизистых оболочек, минуя желудочно-кишечный тракт путем инъекций, инфузий или имплантации. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает, помимо прочего, подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную, внутривенную, внутрисуставную, трансдермальную инъекцию или инфузию; и почечные диализные инфузионные методики. Внутриопухолевая доставка, например, внутриопухолевая инъекция, также может быть применима. Также предусмотрена региональная перфузия. Предпочтительные варианты осуществления изобретения включают внутривенный и подкожный пути. Любой способ введения пептидов или белков, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению.

Инъекционные лекарственные средства могут быть изготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах, флаконах, полимерных контейнерах, преднаполненных шприцах, устройствах для автоинъекции, но, не ограничиваясь ими. Лекарственные средства для парентерального введения включают, помимо прочего, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных основах, пасты и тому подобное.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является лекарственное средство для парентерального введения, где фармацевтическая композиция предоставлена в сухой форме, то есть, порошка или гранул для растворения в подходящем растворителе (например, стерильной апиrogenной воде) перед введением. Такое лекарственное средство может быть получено, например, с помощью лиофилизации, т.е. процесса, известного в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающая в себя замораживание препарата и последующее удаление растворителя из замороженного содержимого.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению, может также вводиться интраназально или ингаляционно, самостоятельно, в виде смеси с подходящим фармацевтически приемлемым наполнителем из ингалятора, такого как аэрозольный контейнер под давлением, помпа, спрей, распылитель или небулайзер, в котором используется или не используется подходящий пропеллент, или в виде назальных капель или спрея.

Лекарственное средство для парентерального введения может быть немедленного или модифицированного высвобождения. Лекарственные средства с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, нацеленное и программируемое высвобождение.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, которая содержит любое вышеуказанное анти-

тело или его антигенсвязывающий фрагмент и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтической композиции другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

Терапевтическое применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2.

В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, применяется в лечении нарушений, опосредованного с активностью GD2.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола и любого возраста.

В случае опухоли (например, раковой опухоли) терапевтически эффективное количество антитела или фрагмента антитела (например, антитела или фрагмента антитела, которое специфически связывается с GD2) может уменьшать число раковых клеток; уменьшать начальный размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, прекращать) инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать, до некоторой степени, один или более симптомов, обусловленных расстройством. Антитело или фрагмент антитела может, до некоторой степени, предупреждать рост и/или убивать имеющиеся раковые клетки, оно может вызывать цитостатический и/или цитотоксический эффект. При терапии рака эффективность *in vivo* можно определять, например, оценивая продолжительность жизни, время до прогрессирования заболевания (TTP), частоту ответа опухоли на лечение (RR), продолжительность ответа и/или качество жизни.

Используемые в данном документе применения или способы, относящиеся к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GD2, с одним или более другими терапевтическими агентами, как предполагают, означают, ссылаются или включают:

1) одновременное введение такой комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в одной лекарственной форме, из которой указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

2) одновременное введение такой комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

3) последовательное введение такой комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются в последовательно по времени указанным пациентом со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в практически разное время указанному пациенту; а также

4) последовательное введение такой комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в единый лекарственной форме, из которой высвобождение указанных компонентов происходит контролируемым образом, после чего они одновременно, последовательно или совместно высвобождаются в одно и то же время и/или разное время указанному пациенту, где каждая часть может быть введена одним или разными путями.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, может назначаться без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования биологической активности GD2 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, который включает введение субъекту эффективного количества любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, который включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, любого из вышеуказанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и выбранного из группы:

- а) введения по меньшей мере одного другого терапевтически активного соединения,
- б) лучевой терапии,
- в) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток,
- г) хирургического лечения и, при необходимости, адъювантной терапии, или
- д) любой комбинации из вышеуказанных а)-г).

В некоторых вариантах осуществления способа лечения заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланомы, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

"Химиотерапевтическим средством" является химическое соединение, применимое для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохинон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (например, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), СРТ-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистанин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (например, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги КW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкрати-статин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидроклорид оксида мехлорэтамину, мелфалан, новем-бихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединные антибиотики (например, калихеамицин, например, калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; эспер-мицин; а также хромофор неокарцинонстатина и родственные хромофоры хромопротеинов - энединные антибиотики, акладиномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, кара-бицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая ADRIAMICIN®, морфолинодоксорубин, циано-морфолинодоксорубин, 2-пирролинодоксорубин, доксорубино HCl в инъектируемых липосомах (DOXOL®), липосомный доксорубин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомный доксору-бицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубин), эпирубицин, эзрубицин, идарубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломи-цин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флу-

дарабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклоротетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеллатон; гликозид альдофосфамида; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихон; элфорнитин; ацетат эллиптигия; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (например, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("ага-С"); тиотепа; таксоид, например паклитаксел (TAXOL®), препарат паклитаксела на основе сконструированных связанных с альбумином наночастиц (ABRAXANETM) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; средства на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые предотвращают полимеризацию тубулина из образующихся микротрубочек, включая винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклоротетин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бифосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризендронат (ACTONEL®); троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в пролиферацию аберрантных клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы I (например, LURTOTECAN®); gmRH (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (Pfizer); перифосин, ингибитор ЦОГ-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (811577); орафениб, ABT510; ингибитор Vcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE®); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназ (см. определение ниже); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств, такие как СНОР, сокращенное название комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращенное название схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Гормональные средства - это средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли. Примеры таких средств включают антиэстрогены со смешанным профилем агонист/антагонист, включая тамоксифен (NOLVADEX®), 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, торемифен (FARESTON®); идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVISTA®), триоксифен, кеоксифен и избирательные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), такие как SERM3; чистые антиэстрогены без агонистических свойств, такие как фулвестрант (FASLODEX®) и EM800 (такие средства могут блокировать димеризацию рецепторов эстрогена (ER), ингибировать связывание ДНК, усиливать метаболизм ER и/или снижать уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и эксместан (AROMASIN®), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастрозол (ARIMIDEX®), летрозол (FEMARA®) и аминоклоротетимид и другие ингибиторы ароматазы, включая ворозол (RIVISOR®), ацетат мегестрола (MEGASE®), фадрозол, имидазол; агонисты рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона, включая лейпролид (LUPRON® и ELIGARD®), гозерелин, бузерелин и триптерелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как ацетат мегестрола и ацетат медроксипрогестерона, эстрогены, такие как диэтилstilбестрол и премарин и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, полностью трансретиноевая кислота и фенретинид; онапристон; антипрогестероны; понижающие регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; тестолактон; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

Термин "ингибитор контрольных точек иммунитета" (или ингибитор контрольной точки) относится к соединениям, которые подавляют активность контрольных точек иммунитета. Ингибирование включает снижение функции или полную блокаду. Примеры ингибиторных молекул контрольных точек вклю-

чают B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, KIR, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, TIGIT и VISTA. В некоторых вариантах осуществления изобретения осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом, специфически распознающим белок иммунных контрольных точек. Известен ряд ингибиторов иммунных контрольных точек, и в ближайшем будущем могут быть разработаны альтернативные ингибиторы иммунных контрольных точек по аналогии с этими известными ингибиторами белков иммунных контрольных точек. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают, в качестве неограничивающих примеров, пептиды, антитела, молекулы нуклеиновой кислоты и низкомолекулярные соединения.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1. Примеры антител, которое специфически связывается с PD-1, включают пембролизумаб (pembrolizumab), ниволумаб (nivolumab), пролголимаб (pdl1g), торипалимаб (toripalimab), цемиплимаб (cemiplimab), синтилимаб (sintilimab) и другие. Наиболее предпочтительным является пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4. Примеры антител, которое специфически связывается с CTLA4, включают ипилимумаб (ipilimumab), тремелимуаb (tremelimumab), залифрелимаб (zalifrelimab), нурулимаб и другие. Наиболее предпочтительным является ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и меньшей мере одного из группы:

- а) другого терапевтически активного соединения,
- б) лучевой терапии,
- в) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток или
- г) хирургического лечения и, при необходимости, адъювантной терапии, для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

В некоторых вариантах осуществления применения заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления применения другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления применения антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления применения антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

В некоторых вариантах осуществления применения ингибитор PD-L1 представляет собой антитело,

которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления применения антитела, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

В некоторых вариантах осуществления применения другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

Дозы и пути введения.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению будет вводиться в количестве, эффективном для лечения состояния, о котором идет речь, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, по поводу которого проводится лечение, возраста, пола и веса пациента, а также является ли введение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, самостоятельным лечением или оно проводится в комбинации с одним или более дополнительных препаратов или методов лечения.

Схемы приема лекарственных средств можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ. Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза могут быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно полезным является изготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма при использовании в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению, как правило, диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик терапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которые должны быть достигнуты, и (b) ограничений, присущих в технике компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

Таким образом, квалифицированным специалистам понятно, исходя из раскрытия, представленного в данном документе, что дозы и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. Это означает, что может быть легко установлена максимально переносимая доза и может быть также определено эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемый терапевтический эффект для пациента, так же как и требования к времени введения каждого агента для достижения видимого терапевтического эффекта для пациента. Таким образом, хотя некоторые дозы и схемы режима введения приведены в качестве примеров в данном документе, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут понадобиться для пациента в практике применения настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения дозировки могут изменяться, в зависимости от типа и тяжести состояния, которое следует облегчить, и может включать одну или более доз. Кроме того, необходимо понимать, что для любого конкретного пациента, конкретные схемы введения должны быть скорректированы через некоторое время согласно индивидуальной потребности и на усмотрение медицинского работника, который осуществляет введение или контролирует введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций. Кроме того, режим дозирования с композициями по данному изобретению может быть основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояния здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретном используемом моноклональном антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которое специфически связывается с GD2. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но может определяться регулярно с помощью стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических и фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное повышение дозы, которое определяется квалифицированным специалистом. Определение необходимой дозы и режимы хорошо известны в соответствующей области техники и будут понятны специалисту в данной области после ознакомления с идеями, раскрытыми в данном документе.

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше. Предполагается, что подходящая доза моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению будет в диапазоне от 0,1 -200 мг/кг, предпочтительно 0,1-100 мг/кг, в том числе около 0,5-50 мг/кг, например, около 1-20 мг/кг. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, может быть введено, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг, на-

пример, по меньшей мере 1,5 мг/кг, например, также как не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг; и например вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например, раз в неделю, раз в две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

Диагностическое использование антитела, которое специфически связывается с GD2.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, по настоящему изобретению также используются в диагностических целях (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, данное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2, по данному изобретению может использоваться для обнаружения или измерения уровня GD2 в образцах, полученных от пациента, например, образец ткани или образец жидкости тела, такой как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка крови, жидкость кишечника, слюна или моча. Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), хемилюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистология.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы.

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина, представлена у: Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител пронумерованы согласно нумерации EU (Edelman G.M. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 1969, ee. 78- 85; Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 1400 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПНР-амплификацию и последующее клонирование через сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях.

Применяли пакет программ фирмы Unipro UGENE версия 1.29 и SnapGene Viewer для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы.

Для экспрессии описанных в материалах заявки антител применяли варианты экспрессионных плазмид, предназначенных для экспрессии антител в клетках прокариот (*E.coli*) кратковременной экспрессии в клетках эукариот (например, в клетках CHO). Помимо экспрессионной кассеты антитела векторы содержали: сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в *E.coli*, гены, придающие устойчивость в *E.coli* к различным антибиотикам (например, к ампициллину, канамицину).

Слияние генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для кратковременных трансфекций создавали большие количества плазмид посредством получения плазмид из трансформированных культур *E. coli*.

Пример 1.

Выбор последовательностей анти-GD2 антител.

Материалом для создания молекул анти-GD2 антител были структурные данные, полученные *in silico*. Скаффолдинг *in silico* проводился с использованием внутреннего алгоритма ЗАО "Биокад". Для подготовки структур использовался инструмент Prep Wizard из Schrodinger Suite 2017-2. После чего проводился фолдинг с использованием инструмента Prime из Schrodinger Suite 2017-2.

Был применен подход последовательного изменения аминокислотного состава переменных доменов.

Антитела оптимизировали *in silico*, таким образом, были получены кандидаты антител для дальнейших исследований, которые указаны в табл. 1.

Таблица 1

Кандидаты антител для дальнейших исследований	
Название антитела к GD2	
07-001	
07-002	
07-003	
07-004	
07-005	
07-006	
07-007	
07-008	
07-009	
07-010	
07-011	
07-012	
07-013	
07-014	
07-015	
07-016	
07-017	
07-019	
07-028	
07-029	
07-030	
07-031	
07-032	
07-033	
07-041	
07-042	
07-043	
07-044	

Из табл. 1 были отобраны 6 лидерных антител: 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031, 07-041, которые неожиданно обладали наилучшими параметрами (см. примеры далее).

Пример 2.

Анализ идентичности и гуманизации переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей анти-GD2 антител 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

В табл. 2 показан анализ идентичности переменных фрагментов тяжелой цепи анти-GD2 антител

07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

Таблица 2

Процент идентичности по VH антител

процент идентичности по VH	07-006	07-015	07-016	07-028	07-031	07-041
07-006	100	98	98	98	99	99
07-015	98	100	100	100	98	98
07-016	98	100	100	100	98	98
07-028	98	100	100	100	98	98
07-031	99	98	98	98	100	99
07-041	99	98	98	98	99	100

Таким образом, переменные фрагменты тяжелой цепи анти-GD2 по изобретению имеют по меньшей мере 98 процентную идентичность между собой.

В табл. 3 показан анализ гуманизации переменных фрагментов тяжелой цепи анти-GD2 антител 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

Таблица 3

Степень гуманизации VH антител

Степень гуманизации VH	
07-006	0.806
07-015	0.806
07-016	0.806
07-028	0.806
07-031	0.806
07-041	0.806

Таким образом, переменные фрагменты тяжелой цепи анти-GD2 антител по изобретению имеют более 80 процентную степень гуманизации.

В табл. 4 показан анализ идентичности переменных фрагментов легкой цепи анти-GD2 антител 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

Таблица 4

Процент идентичности по VL антител

процент идентичности по VL	07-006	07-015	07-016	07-028	07-031	07-041
07-006	100	99	100	96	99	96
07-015	99	100	99	96	100	96
07-016	100	99	100	96	99	96
07-028	96	96	96	100	96	96
07-031	99	100	99	96	100	96
07-041	96	96	96	96	96	100

Таким образом, переменные фрагменты легкой цепи анти-GD2 антител по изобретению имеют по меньшей мере 96 процентную идентичность между собой.

В табл. 5 показан анализ гуманизации переменных фрагментов легкой цепи анти-GD2 антител 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

Таблица 5
Степень гуманизации VL

Степень гуманизации VL антител	
07-006	0.8
07-015	0.81
07-016	0.8
07-028	0.8
07-031	0.81
07-041	0.8

Таким образом, переменные фрагменты легкой цепи кандидатов анти-GD2 по изобретению имеют более 80 процентную степень гуманизации.

Пример 3.

Получение последовательностей анти-GD2 антител 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

Гены переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела к GD2 по изобретению, которое выбирают из группы: 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041, были синтезированы *de novo*. Для этого синтезировали олигонуклеотиды по 55-60 н.о. каждый, образующие полностью перекрывающуюся последовательность гена. Сборку каждого гена производили методом двухраундовой ПЦР, в результате чего получали фрагменты длиной 339 п.н. каждый. Слияние гена переменного домена тяжелой цепи и Fc-фрагмента IgG1 человека, переменного домена легкой цепи и СК осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием SOE-PCR (Splicing by overlap extension).

Гены тяжелой и легкой цепей антитела к GD2 по изобретению, которое выбирают из группы: 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041, были клонированы в плазмиды pEE для наработки белка в формате IgG1 в клетках млекопитающих. Клонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Полученные плазмиды (фиг. 2 и 3) получали в необходимых количествах в клетках *E. coli* и очищали при помощи коммерческого набора для выделения плазмидной ДНК компании Qiagen.

Полученные генетические конструкции передали на транзientную наработку белков в клеточной линии CHO.

Пример 4.

Модификация константного домена тяжелой цепи Fc антител aGD2 07-006, 07-015, 07-016, 07-028, 07-031 или 07-041.

Для получения антител с улучшенными свойствами проводили модификацию константного домена тяжелой цепи Fc путем введения точечных мутаций M252Y, S254T, T256 (YTE) и/или K322A. Набор мутаций YTE позволяет достичь пролонгированной фармакокинетики, а внесение мутация K322A снижает комплемент-зависимую цитотоксичность полученных антител. Также за счет экспрессии в клеточной линии CHO-IgG-Fut8 происходило афукозилирование Fc части антитела, что дает усиление антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. Полученные антитела указаны в табл. 6.

Варианты антител к GD2 по изобретению

Название исходного антитела без модификаций Fc-фрагмента	Название антитела с мутациями M252Y, S254T, T256E (YTE) в Fc-фрагмента	Название антитела с мутацией K322A в Fc-фрагмента	Название антитела с мутациями M252Y, S254T, T256E (YTE) + K322A в Fc-фрагмента
07-006	07-006 + YTE	07-006 + K322A	07-006 + YTE + K322A
07-015	07-015 + YTE	07-015 + K322A	07-015 + YTE + K322A
07-016	07-016 + YTE	07-016 + K322A	07-016 + YTE + K322A
07-028	07-028 + YTE	07-028 + K322A	07-028+ YTE+ K322A
07-031	10-001	10-003	10-002
07-041	10-007	10-009	10-008

Сборка генетических конструкций включала в себя слияние гена переменного домена тяжелой цепи и Fc IgG1 человека, в которую предварительно вводили точечные мутации.

Гены тяжелых цепей с заменами были клонированы в плазмиды pEE для наработки белка совместно с уже полученными конструкциями легких цепей, в формате IgG1 в клеточной линии CHO-1g6-Fut8. Клонированные нуклеотидные последовательности подтверждались секвенированием ДНК. Полученные плазмиды (фиг. 2, 3) нарабатывали в необходимых количествах в клетках *E.coli* и очищали при помощи набора Qiagen.

Полученные генетические конструкции передали на транзientную наработку белков в клеточной линии CHO-1g6-Fut8.

Пример 5.

Получение, выделение и очистка антител к GD2 из суспензионной культуры клеток млекопитающих.

Полноразмерные антитела продуцировали в среде роста клеток CHO, афукозилированные формы полноразмерных антител - в среде роста клеток CHO-1g6-Fut8. После трансфекции клеток экспрессионными векторами проводили орбитальное feed-batch культивирование в бессывороточной среде в течение 7 дней. Контроль секреции исследуемых антител проводили с использованием системы анализа молекулярных взаимодействий Pall ForteBio Octet RED96 на биосенсорах proteinA.

По окончании культивирования среду центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии на хроматографической системе Akta Pure 25, используя колонки HiTrap rProtein A FF. Культуральную жидкость наносили на колонку HiTrap rProtein A FF, после чего отмыли колонку PBS и элюировали белок раствором 0,1 M глицинового буфера pH 3, после чего нейтрализовали раствор белка добавлением 1 M Tris-HCl pH8 в отношении 1/5 v/v. Далее белок переводили в PBS pH 7.4 с помощью диализа, после фильтровали полученный раствор (0,22 мкм). Препарат хранили при -70°C. Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг. 4).

Пример 6.

Кинетические исследования аффинности антител к GD2 с ганглиозидом GD2 с помощью Forte Bio OctetRed96.

Оценку связывания антитела с GD2 провели методом биослойной интерферометрии на приборе OctetRed96 (Pall). Сенсоры AR2G покрывали ганглиозидом GD2. Затем сенсоры с иммобилизованным GD2 погружали в лунки с антителом. После ассоциации антитела и ганглиозида сенсоры погружались в рабочий раствор для последующей стадии диссоциации. Полученные сенсограммы с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 8.2) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1. KD для антител aGD2 по изобретению приведены в табл. 7.

Таблица 7

Константы диссоциации антител к GD2

Название антитела	KD, M
07-006	7,58E-10
07-015	4,49E-10
07-016	7,03E-10
07-028	6,13E-10
07-031	10,6E-10
07-041	8,41E-10
10-008	7,56 E-10

Таким образом, все анализируемые анти-GD2 антитела специфически связываются с ганглиозидом GD2 (табл. 7) с высокой аффинностью.

Пример 7.

Анализ термостабильности антител к GD2.

Антитела нагревали в PBS pH 7.4 с помощью амплификатора в пластиковых пробирках при 50°C в течение 48 часов с последующим переходом на +4°C. После окончания программы анализировали пробы до и после прогрева с помощью аналитической гель-хроматографии на колонке TSK Gel G3000 SWxl. Сравнили площади целевых пиков образцов до и после прогрева. Изменение менее чем 5% площади пика мономера после нагрева в течение 48 ч свидетельствует о стабильности препарата и возможности длительного хранения (табл. 8).

Таблица 8

Сравнение соотношения площади пиков на хроматограммах препаратов антител до и после прогрева

Название антитела	% соотношение пиков			
		Σагрегатов, %	мономер, %	Σфрагментов, %
07-006	до прогрева	1,49	96,06	2,46
	после прогрева	1,30	94,81	3,88
07-015	до прогрева	1,81	95,64	2,55

	после прогрева	1,58	91,46	6,95
07-016	до прогрева	1,11	96,85	2,04
	после прогрева	1,14	92,32	6,54
07-028	до прогрева	1,41	96,50	2,08
	после прогрева	1,39	93,21	5,41
07-031	до прогрева	0,72	89,95	9,33
	после прогрева	0,65	89,68	9,67
07-041	до прогрева	0,86	97,50	1,64
	после прогрева	1,03	95,68	3,29
10-008	до прогрева	0,34	98,17	1,49
	после прогрева	0,65	96,12	3,23

Таким образом, все анализируемые анти-GD2 антитела обладают высокой термостабильностью (табл. 8).

Пример 8.

Определение антителозависимой клеточной цитотоксичности антител к GD2. Использовали репортерную клеточную линию, созданную на основе клеточной линии Jurkat, стабильно экспрессирующую на поверхности CD16 и содержащую ген, кодирующий люциферазу светлячка, под контролем NFAT-промотора; в качестве клеток мишеней использовали SK-N-BE(2). Клетки Jurkat-NFAT-Luc-CD16 культивировали при 37°C 5% CO₂ на среде RPMI-1640 (10% FBS, 10 мкг/мл гентамицина, 2mM L-глутамин, 0,3 мкг/мл пурамицина и 200 мкг/мл гигромицина), при тех же условиях культивировали SK-N-BE(2) в среде DMEM/F12 (10% FBS, 10 мкг/мл гентамицина и 2mM L-глутамин).

В каждую лунку 96-луночного культурального планшета вносили по 25 000 клеток-эффекторов Jurkat-NFAT-Luc-CD16 и 25 000 клеток-мишеней SK-N-BE(2) в объеме 50 мкл, а также разведения антител в указанной на графике концентрации в объеме 50 мкл.

В качестве отрицательного контроля использовали точки без добавления антитела. Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂ и далее, с помощью субстрата для люциферазы (ЗАО БИО-КАД), измеряли интенсивность люминесценции в лунках на планшетном ридере Spark (Tecan), обработку данных и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 14.0. Значения параметра EC₅₀ образцов анти-GD2 антител приведены в табл. 9.

Таблица 9
Значения параметра EC₅₀ образцов анти-GD2 антител

Название антитела	EC50 (нг/мл)
07-001	3.2
07-002	3.6
07-003	2.2±1.3
07-004	4.5
07-005	2.8
07-006	1.3±0.6
07-007	5.3
07-008	4
07-009	2.7±1.7
07-010	3.6
07-011	1.8
07-012	1.3±0.9
07-013	1
07-014	1
07-015	1.1
07-016	1
07-017	1.4
07-019	0.7
07-028	0.7
07-029	1.3
07-030	2.6
07-031	8.5±2.6
07-032	10.3
07-033	1.1
07-041	4.1±3.9
07-042	2.4
07-043	1.6
07-044	2.2
07-041-dFuc (афукозилированный вариант 07-041)	0.9±0.3
10-007	0.7±0.2
10-008	1±0.7
10-009	0.6±0.1
10-010	13.6±0.7
10-011	19.8±9.3
10-012	3.3±1.6

На фиг. 5 показано, что антитело 10-008 обладает антителозависимой клеточной цитотоксичностью в тесте на репортерной клеточной линии Jurkat-NFAT-Luc-CD16.

Пример 9.

Анализ комплемент зависимой клеточной цитотоксичности.

Для проведения анализа в качестве клеток мишеней использовали линию SK-N-BE (2) (нейробластома человека). Клетки подращивали в среде ДМЕМ с 10% бычьей сыворотки. Для постановки анализа готовили суспензию клеток в среде ДМЕМ с 0,1% бычьего сывороточного альбумина в концентрации 1×10^6 кл/мл, также готовили ряд разведений исследуемых кандидатов антител.

В 96-луночный культуральный планшет вносили по 50 мкл разведений антител, по 50 мкл суспензии клеток и 50 мкл человеческой свежeweделенной сыворотки, взятой от здоровых доноров. Инкубировали планшет при 37°C, 5% CO₂ в течение 3х ч. После завершения инкубации во все лунки добавляли 15 мкл витального красителя "Alamar Blue" (Invitrogen) и оставляли планшет инкубироваться при 37 °C, 5% CO₂ в течение 18 ч.

Встряхивали планшет в течение 10-20 мин при комнатной температуре на орбитальном шейкере для перемешивания. Измеряли показания флуоресценции используя планшетный ридер TECAN Spark. Детектируемый сигнал флуоресценции пропорционален количеству жизнеспособных клеток. Для обработки данных и построения графиков использовали программное обеспечение Excel и SigmaPlot 14.0.

Исследуемые антитела 07-041dFuc ((афукозилированный вариант 07-041)), 10-007, 10-008, 10-009 вызывают гибель клеток-мишеней в присутствии человеческой сыворотки. Антитела 10-008 и 10-009 обладают сниженным эффектом по сравнению с другими антителами (см. фиг. 6).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GD2 (ганглиозид GD2), включающее:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7; и

(b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) CDR1 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9,

(ii) CDR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11,

(iii) CDR3 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42,

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43,

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44 и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельный домен легкой цепи содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46,

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48,

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49 и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где

a) вариабельный домен тяжелой цепи содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42,

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43,

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44 и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45, и, где

b) вариабельный домен легкой цепи содержит:

(i) FR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46,

(ii) FR2 с аминокислотной последовательностью, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48,

(iii) FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49 и

(iv) FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельный домен легкой цепи содержит:

бельный домен тяжелой цепи, содержит:

- (i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5; или
- (ii) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный домен легкой цепи, содержит:

- (i) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12; или
- (ii) CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 98% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17.

8. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 96% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

11. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где:

- (a) переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 98% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;
- (b) переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 96% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

12. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где:

- (a) переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17;
- (b) переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

13. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где:

- (i) (a) переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
- (b) переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или
- (ii) (a) переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;
- (b) переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

14. Выделенное моноклональное антитело по любому из пп.1-13, где антитело, которое специфично связывается с GD2, представляет собой полноразмерное антитело IgG.

15. Выделенное моноклональное антитело по п.14, где полноразмерное антитело IgG относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

16. Выделенное моноклональное антитело по п.1, где антитело содержит мутации YTE (M252Y, S254T, T256E) и/или K322A в Fc фрагменте в сравнении с природной последовательностью Fc фрагмента.

17. Выделенное моноклональное антитело по п.1, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37.

18. Выделенное моноклональное антитело по п.1, включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

19. Выделенное моноклональное антитело по п.1, включающее:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ

ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

20. Выделенное моноклональное антитело по п.1, включающее:

(i) (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; или

(ii) (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

21. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20.

22. Выделенная нуклеиновая кислота по п.21, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

23. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.21-22.

24. Способ получения клетки-хозяина для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20, включающий трансформирование клетки вектором по п.23.

25. Клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.21-22.

26. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20, заключающийся в культивировании клетки-хозяина по п.25 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного антитела.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, где заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20 и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

31. Фармацевтическая композиция по п.30, для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

32. Фармацевтическая композиция по п.31, где заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланома, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

33. Фармацевтическая композиция по п.30, где другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии или ингибитор контрольных точек иммунитета или где другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

34. Фармацевтическая композиция по п.33, где ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

35. Фармацевтическая композиция по п.34, где ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

36. Фармацевтическая композиция по п.35, где антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

37. Фармацевтическая композиция по п.34, где ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

38. Фармацевтическая композиция по п.37, где антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

39. Фармацевтическая композиция по п.34, где ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

40. Фармацевтическая композиция по п.39, где антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

41. Способ ингибирования биологической активности GD2 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20.

42. Способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20 или фармацевтической композиции по любому из п.27 или 30 в терапевтически эффективном количестве.

43. Способ лечения по п.42, где способ дополнительно включает:

- а) введения по меньшей мере одного другого терапевтически активного соединения,
- б) лучевой терапии,
- в) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток,
- г) хирургического лечения и, при необходимости, адъювантной терапии, или
- д) любой комбинации из вышеуказанных а)-г).

44. Способ по любому из пп.42-43, где заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланомы, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

45. Способ по п.43, где другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии или ингибитор контрольных точек иммунитета или где другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

46. Способ по п.45, где ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

47. Способ по п.46, где ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

48. Способ по п.47, где антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: проголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

49. Способ по п.46, где ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

50. Способ по п.49, где антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

51. Способ по п.46, где ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

52. Способ по п.51, где антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

53. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-30 или фармацевтической композиции по любому из п.27 или 30 для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2 у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

54. Применение по п.53, где применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-30 или фармацевтической композиции по любому из п.27 или 30 и меньшей мере одного из группы:

- а) другого терапевтически активного соединения,
- б) лучевой терапии,
- в) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток или
- г) хирургического лечения и, при необходимости, адъювантной терапии, для лечения заболевания или нарушения, опосредованного GD2.

55. Применение по п.53, где заболевание или нарушение, опосредованное GD2, выбрано из группы: опухоль головного мозга, нейробластома, глиобластома, медуллобластома, ретинобластома, астроцитомы, меланомы, В-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак легких, карцинома почек, десмопластическая мелкоклеточная фиброма, остеосаркома, саркома Юинга, рак молочной железы, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, липосаркома, фибросаркома или саркома мягких тканей.

56. Применение по п.54, где другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета или где другое терапевтически активное соединение выбрано из группы: IL-2, GM-CSF, изотретиноин, одного или нескольких других цитокинов или любой комбинации терапевтически активных соединений из данной группы.

57. Применение по п.56, где ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

58. Применение по п.57, где ингибитор PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

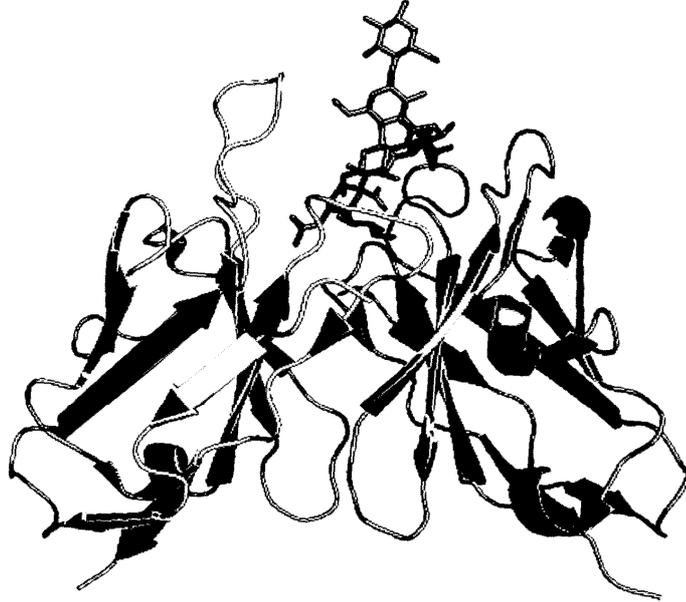
59. Применение по п.58, где антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: проголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

60. Применение по п.57, где ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

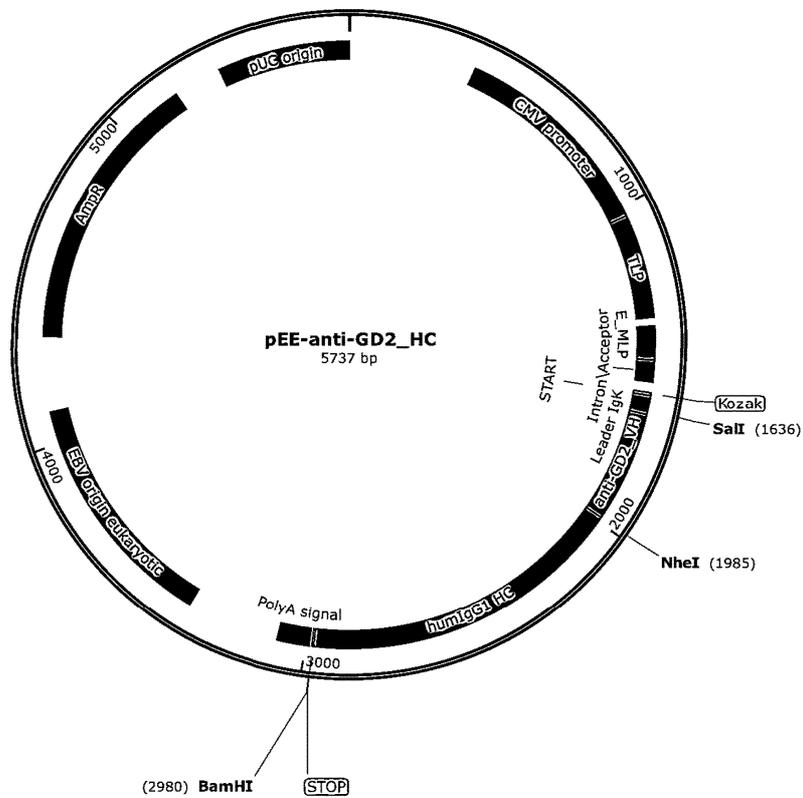
61. Применение по п.60, где антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или нурулимаб.

62. Применение по п.57, где ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

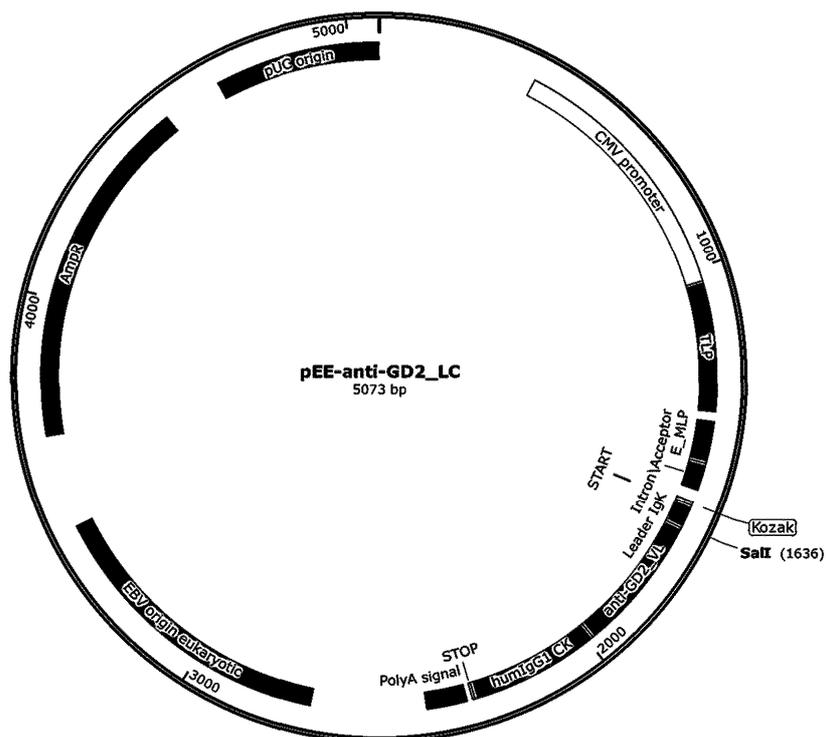
63. Применение по п.62, где антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.



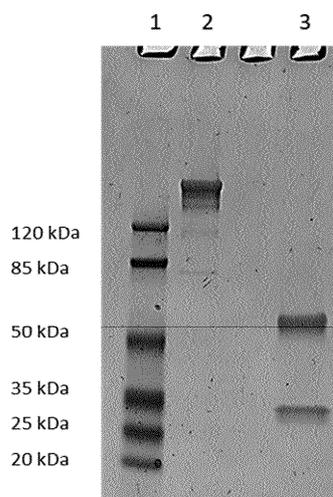
Фиг. 1



Фиг. 2

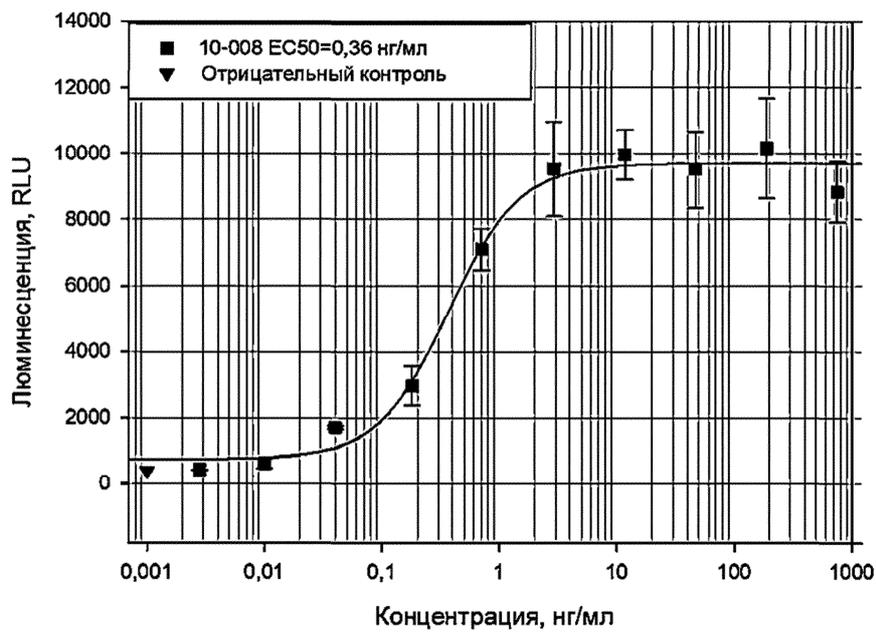


Фиг. 3

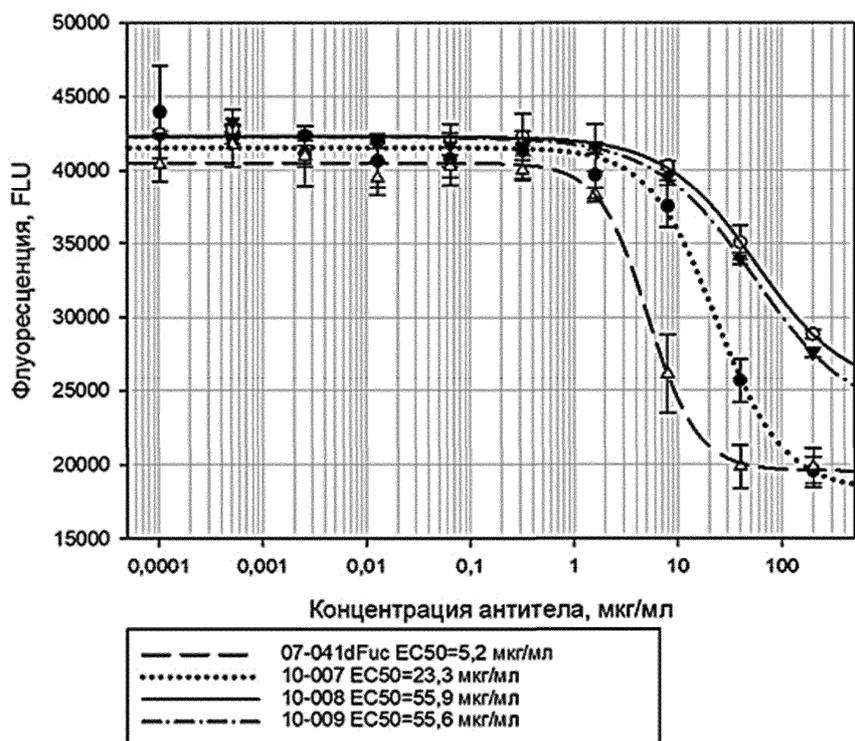


- 1) Pierce™ Prestained Protein MW Marker;
- 2) 10-008 1 мкг в нередуцирующих условиях;
- 3) 10-008 1 мкг в редуцирующих условиях.

Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2