

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392478** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.03.26

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

(22) Дата подачи заявки
2022.04.25

(54) **АНТИТЕЛА К ADGRE2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **63/179,756**

(32) **2021.04.26**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/026161**

(87) **WO 2022/232035 2022.11.03**

(71) Заявитель:

МИЛЛЕНИУМ

ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Банерджи Антара, Хэ Синьюэ,
Дженнингс Шон (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении описаны антитела, их фрагменты и слитые белки, которые специфически связываются с ADGRE2, а также способы получения и применения таких антител. Такие антитела, слитые белки и их фрагменты применимы для лечения и диагностики различных аутоиммунных заболеваний и рака, включая, например, острый миелоидный лейкоз.

A1

202392478

202392478

A1

АНТИТЕЛА К ADGRE2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/179 756, поданной 26 апреля 2021 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 19 апреля 2022 года, называется MIL-018WO_SL.txt и имеет размер 38304 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Антитела к ADGRE2 связывают рецептор E2, сопряженный с G-белком адгезии, антиген ADGRE2, также известный как EMR2, CD312, VBU или CD97. ADGRE2 экспрессируется моноцитами, макрофагами, дендритными клетками и гранулоцитами. ADGRE2 экспрессируется на раковых клетках при раке, включая острый миелоидный лейкоз. ADGRE2 связывается с хондроитинсульфатным фрагментом цепей гликозаминогликана и способствует прикреплению клеток. ADGRE2 высоко экспрессируется в раковых клетках, включая клетки острого миелоидного лейкоза.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В данном изобретении предложены гуманизированные антитела к ADGRE2 и их антигенсвязывающие фрагменты для лечения аутоиммунных заболеваний и рака, включая лейкоз, лимфому или миелому, включая, например, рецидивирующий и рефрактерный острый миелоидный лейкоз. Антитела и их фрагменты по настоящему изобретению можно использовать по отдельности, в виде слитых белков или конъюгировать по меньшей мере с одним диагностическим и/или терапевтическим агентом, или в комбинации с другими способами лечения.

[0005] В некоторых аспектах в данном документе предложено гуманизированное

антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) варибельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTA YGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 7), и

варибельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPG LAPRLLIYDTSK LASGIPDRF SGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) варибельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTA YGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 9), и

варибельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKSGLSPKRWIYDTSK LASGVPRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) варибельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTA YGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 11), и

варибельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKSGLSPKRWIYDTSK LASGVPRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12); или

(d) варибельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTA YGMDYWGQGT

LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASSSVSYMHWYQQKPLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR FSGSGSGTDYFTTIRRLPEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 16);

(f) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCASSSVSYMHWYQQKPLAPRRWIYDTSKLASGVDPDR FSGSGSGTDYFTTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18);

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

[0006] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(а) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 7), и

переменную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGAPRLLIYDTSKLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 9), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVPD
RFSGSGSGTDYFTFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 11), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVPD
RFSGSGSGTDYFTFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

или

(d) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 15), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASSSVSYMHYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTIRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16);

(f) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 17), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKPG LAPRRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18);

(g) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую
аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLSAG
VPAFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
31).

[0007] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено
гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент,
содержащие:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую
аминокислотную последовательность GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), HCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность VYPGDGD (SEQ ID NO: 2), HCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3); и

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, содержащую
аминокислотную последовательность SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6);

[0008] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено
гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом
антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы,
состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или
мультиспецифического антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fd'-
фрагмента, Fd-фрагмента, изолированных CDR или их наборов; одноцепочечного
вариабельного фрагмента (scFv), слитого полипептид-Fc, однодоменного антитела,
антитела верблюдовых; маскированного антитела, малое модульное
иммунофармацевтическое средство («SMIPs™»), одноцепочечного антитела, tandemного
диатела, VHH, антикалина, нанотела, минител, BiTE, белка с анкириновыми повторами,
DARPIN, авимера, DART, ТКР-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела;
аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирина и KALBITOR.

[0009] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело к
ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное

антитело или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[0010] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой антитело, содержащее константную область IgG.

[0011] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[0012] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит сигнальную последовательность, вариабельную последовательность тяжелой цепи, GS-линкер и вариабельную последовательность легкой цепи.

[0013] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, по меньшей мере на около 80% идентичную:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
GQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQKPGAPRLLIYDTSKLAGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

[0014] В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) содержит последовательность:

QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMCSASSSVSYMHWYQQK
SGQSPKRWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG
GGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMCSASSSVSYMHWYQQK
SGLSPKRWIYDTSKSLASGVPDFRSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG
GGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMCSASSSVSYMHWYQQK
SGLSPKRWIYDTSKSLASGVPDFRSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG
GGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWY
QQKPLAPRLLIYDTSKSLASGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLT
FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

[0015] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело к ADGRE2 имеет константу диссоциации (K_D) менее около 10^{-8} М K_D , менее около 10^{-9} М K_D , менее около 10^{-10} М K_D , менее около 10^{-11} М K_D , менее около 10^{-12} М K_D или менее около 10^{-13} М K_D .

[0016] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело к ADGRE2 имеет EC50 от около 1 до 100 нМ.

[0017] В некоторых вариантах осуществления EC50 составляет около 10–95 нМ.

[0018] В некоторых вариантах осуществления EC50 составляет около 25–75 нМ.

[0019] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение гуманизованного антитела к ADGRE2 или

его антигенсвязывающего фрагмента.

[0020] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из лейкоза, лимфомы и миеломы.

[0021] Некоторые аспекты относятся к фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело к ADGRE2 или его фрагмент, и фармацевтически приемлемый носитель, причем гуманизованное антитело к ADGRE2 или его фрагмент антитела содержат:

(a) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 7), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGAPRLLIYDTSKSLASGIPDRF SSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 9), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKSLASGVDP RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 11), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQYQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQYQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASSSVSYMHYQYQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
RFSGSGSGTDYFTIRLRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(f) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFKGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 17), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQYQKPGLAPRRWIYDTSKLASGVDP

RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18);

или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQKSGQSPKRWIYDTSKLAGS VPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

[0022] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гуманизованное антитело к ADGRE2 или антигенсвязывающий фрагмент, причем гуманизованное антитело к ADGRE2 или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(a) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 7), и

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQKPGAPRLLIYDTSKLAGSIPDRF SSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 9), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQKSGLSPKRWIYDTSKLAGSVPD

RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 11), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVVSS (SEQ ID NO: 13), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 15), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASSSVSYMHYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTIRRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(f) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG

DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTA VYYCARGFTAYGMDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERV T MSCSASSSVSYMHWYQQK PGLAPRRWIYDTSK LASGVPD
RFSGSGSGTDYTF TISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 18);
или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична
QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTA VYYCARGFTAYGMDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERV T MSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSK LASG
V PARFSGSGSGTDYTF TISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:
31).

[0023] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гуманизованное антитело к ADGRE2 или его фрагмент антитела, содержащие:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность VYPGDGD (SEQ ID NO: 2), HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3); и

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6);

[0024] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')2-

фрагмента, Fd'-фрагмента, Fd-фрагмента, изолированных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слитого полипептид-Fc, однодоменного антитела, антитела верблюдовых; маскированного антитела, малое модульное иммунофармацевтическое средство («SMIPs™»), одноцепочечного антитела, tandemного диатела, VHH, антикалина, нанотела, минител, BiTE, белка с анкириновыми повторами, DARPIN, авимера, DART, ТКР-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела; аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирин и KALBITOR.

[0025] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой моноклональное антитело или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

[0026] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело, содержащее константную область IgG.

[0027] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

[0028] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит сигнальную последовательность, переменную последовательность тяжелой цепи, GS-линкер и переменную последовательность легкой цепи.

[0029] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, по меньшей мере на около 80% идентичную:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSVSYMHW
YQQKSGQSPKRWIYDTSKLSGVPARFSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSVSYMHW
YQQKSGLSPKRWIYDTSKLSGVPDRFSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
GQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQQKPGAPRLLIYDTSKLAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

[0030] В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный переменный фрагмент (scFV) содержит последовательность:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
GQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQQKPGAPRLLIYDTSKLAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

[0031] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 90% идентична любой из SEQ ID No: 7-18.

[0032] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты.

[0033] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка, содержащая вектор.

[0034] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение гуманизованного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, причем гуманизованное антитело к ADGRE2 содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSED TAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 7), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRLLIYDTSK LASGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDD TAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 9), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERV TMSCSASSSVSYMHWYQQK SGLSPKRWIYDTSK LASGVDP RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG

DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDТАVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 11), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVТМССASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKЛASGVPD RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGТKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFКGRVTMTRDTSTSTVYMEЛSSLRSEDТАVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVТМССASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKЛASGVPA RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGТKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFКGRVTMTADKSTSTVYMEЛSSLRSEDТАVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKЛASGVDPDR FSGSGSGTDYFTIRRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGТKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(f) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDТАVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATLSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKPLAPRRWIYDTSKLAGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18);

или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична
QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLAG
VPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
31).

[0035] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение гуманизированного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, причем гуманизированное антитело к ADGRE2 содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 7), и

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPLAPRLLIYDTSKLAGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 9), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(с) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 11), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность
EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(g) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTIRRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(h) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 17), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKPLAPRRWIYDTSKLASGVPD
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18);
или

(g) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 30), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 31).

[0036] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение гуманизованного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, причем гуманизованное антитело к ADGRE2 содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность VYPGDGD (SEQ ID NO: 2), HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3); и

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6);

[0037] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение гуманизированного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, причем гуманизированное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

[0038] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение гуманизированного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, причем гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой антитело, содержащее константу области IgG.

[0039] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

[0040] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит лидерную последовательность, переменную последовательность тяжелой цепи, GS-линкер и переменную последовательность легкой цепи.

[0041] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, по меньшей мере на около 80% идентичную:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYW GQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM HWYQQKPLAPRLLIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS NPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

[0042] В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) содержит последовательность:

QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQK SGQSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQK SGLSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQK SGLSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWY QQKPLAPRLLIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

[0043] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из лейкоза, лимфомы или миеломы.

[0044] В некоторых вариантах осуществления лечение включает введение одного или нескольких дополнительных агентов.

[0045] В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных

агентов выбраны из антитела, химиотерапевтического средства или лучевой терапии.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0046] В контексте данного документа форма единственного числа объекта включает соответствующую форму множественного числа (*т.е.* по меньшей мере одного) объекта. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

[0047] *Аффинность*: Используемый в данном документе термин «аффинность» относится к характеристикам связывающего взаимодействия между связывающим фрагментом (например, антигенсвязывающим фрагментом (например, варибельным доменом, описанным в настоящем документе) и/или фрагментом, связывающим Fc-рецептор (например, FcRn-связывающим фрагментом, описанным в настоящем документе)) и мишенью (например, антигеном (например, ADGRE2) и/или FcR (например, FcRn)) и указывает на силу связывающего взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления показатель аффинности выражен в виде константы диссоциации (K_D). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент обладает высокой аффинностью к мишени (например, K_D составляет менее около 10^{-7} М, менее около 10^{-8} М или менее около 10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент обладает низкой аффинностью к мишени (например, K_D составляет более около 10^{-7} М, более около 10^{-6} М, более около 10^{-5} М или более около 10^{-4} М). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент обладает высокой аффинностью к мишени при первом значении рН, имеет низкую аффинность к мишени при втором значении рН и имеет промежуточную аффинность к мишени при уровне рН между первым и вторым значениями рН.

[0048] *Приблизительно или около*: В контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

[0049] *Антитело*: Используемый в данном документе термин «антитело» относится

к полипептиду, который включает по меньшей мере одну переменную область иммуноглобулина, например, аминокислотную последовательность, которая обеспечивает переменный домен иммуноглобулина, или последовательность переменного домена иммуноглобулина. Например, антитело может включать переменную область тяжелой (H) цепи (обозначаемую в данном документе VH) и переменную область легкой (L) цепи (обозначаемую в данном документе VL). В другом примере антитело включает две переменные области тяжелой (H) цепи и две переменные области легкой (L) цепи. Термин «антитело» охватывает антигенсвязывающие фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd, Fv и dAb), а также полные антитела, например, интактные иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы). Легкие цепи иммуноглобулина могут относиться к типам каппа или лямбда.

[0050] *Связывающий фрагмент*: Используемый в данном документе «связывающий фрагмент» представляет собой любую молекулу или часть молекулы, способную специфически связывать мишень, например, представляющую интерес мишень (например, антиген (например, ADGRE2) и/или FcR (например, FcRn)). Связывающие фрагменты включают, например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, Fc-области или их Fc-фрагменты, миметики антител, пептиды и аптамеры.

[0051] *Антигенсвязывающий фрагмент* или *его фрагмент антитела* относятся к части интактного антитела. Антигенсвязывающий фрагмент или его фрагмент антитела относятся к части интактного антитела, которая связывается с антигеном (например, ADGRE2). Антигенсвязывающий фрагмент может содержать определяющие антигенность переменные области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, миметики антител, scFv и одноцепочечные антитела, но не ограничиваются ими.

[0052] *Определяющая комплементарность область (CDR)*: «CDR» переменного домена представляют собой аминокислотные остатки в пределах переменной области, которые идентифицируют в соответствии с определениями по Kabat, Chothia, аккумуляцией Kabat и Chothia, AbM, контактными и/или конформационными определениями или любым способом определения CDR, хорошо известным в данной области техники. CDR антитела могут быть идентифицированы как гиперпеременные области, первоначально определенные по Kabat et al. См., например, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Положения CDR также могут быть идентифицированы как петлевые структуры, первоначально описанные Chothia и другими. См., например, Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Другие подходы

к идентификации CDR включают «определение AbM», которое представляет собой компромисс между Kabat и Chothia и получено с использованием программного обеспечения для моделирования антител Oxford Molecular AbM (теперь Accelrys®), или «определение контакта» CDR на основе наблюдаемых контактов антигена, изложенное в MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. В другом подходе, называемом в данном документе «конформационным определением» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпийные вклады в связывание антигена. См., например, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283: 1156-1166, 2008. Другие определения границ CDR могут не строго следовать одному из вышеперечисленных подходов, но, тем не менее, будут перекрываться по меньшей мере с частью CDR по Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете предположений или экспериментальных данных о том, что определенные остатки или группы остатков, или даже целые CDR не оказывают существенного влияния на связывание антигена. Используемый в данном документе CDR может относиться к CDR, определенным любым известным в данной области подходом, включая комбинации подходов. В способах, используемых в настоящем документе, могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного варианта осуществления, содержащего более одной CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений по Kabat, Chothia, расширенных, AbM, контактных и/или конформационных определений.

[0053] *Константная область:* Используемый в данном документе термин «константная область» относится к полипептиду, который соответствует или получен из одного или нескольких иммуноглобулиновых доменов константной области антитела. Константная область может включать любой или все из следующих доменов иммуноглобулина: домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 (полученный из IgA, IgD, IgG, IgE или IgM) и домен CH4 (полученный из IgE или IgM).

[0054] *Эпитоп:* Используемый в данном документе термин «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, представлять собой объединенные две или более несмежные области полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить, например, с помощью ЯМР-спектроскопии,

исследований дифракционной рентгеновской кристаллографии, анализов методом ИФА, анализов обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов сканирования массива олигопептидов и/или картирования мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области способов (например, Giege R et al, (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4) : 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5 : 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251 : 6300-6303). Антитело: кристаллы антигена можно изучать с использованием хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей и можно уточнять с помощью компьютерного программного обеспечения, известного в данной области, например, Refmac и Phenix. Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалистам в данной области техники. См., например, Champe M et al, (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085 для описания методов исследования мутагенеза, включая методы исследования аланин-сканирующим мутагенезом.

[0055] *Fc-область*: Используемый в данном документе термин «Fc-область» относится к димеру двух «Fc-полипептидов», каждый из которых «Fc-полипептид» содержит константную область антитела, за исключением первого иммуноглобулинового домена константной области. В некоторых вариантах осуществления «Fc-область» включает два Fc-полипептида, связанных одной или несколькими дисульфидными связями, химическими линкерами или пептидными линкерами. «Fc-полипептид» относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, и может также включать часть или весь N-конец гибкого шарнира по отношению к этим доменам. Для IgG «Fc-полипептид» включает иммуноглобулиновые домены Сгамма2 (C γ 2) и Сгамма3 (C γ 3) и нижнюю часть шарнира между Сгамма1 (C γ 1) и C γ 2. Хотя границы Fc-полипептида могут варьироваться, Fc-полипептид тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как содержащий остатки, начинающиеся с T223, или C226, или P230, до его карбокси-конца, где нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, VA). Для IgA Fc-полипептид включает иммуноглобулиновые домены Сальфа2 (C α 2) и Сальфа3 (C α 3) и нижнюю часть шарнира между Сальфа1 (C α 1) и C α 2. Fc-область может быть синтетической, рекомбинантной или

полученной из природных источников, таких как IVIG.

[0056] *Гуманизированные антитела:* В данном документе гуманизированные антитела представляют собой антитела, полученные от видов, отличных от человека, чьи белковые последовательности были модифицированы для увеличения их сходства с вариантами антител, естественным образом вырабатываемыми у человека. «Гуманизация» обычно применяется к моноклональным антителам, разработанным для введения людям (например, антителам к ADGRE2, разработанным в качестве противораковых препаратов). В некоторых вариантах осуществления гуманизация применяется при разработке специфического антитела в иммунной системе, отличной от человека (например, у мышей).

[0057] *K_a:* Используемый в данном документе термин «K_a» относится к скорости ассоциации конкретного связывающего фрагмента и мишени с образованием комплекса связывающий фрагмент/мишень.

[0058] *K_d:* Используемый в данном документе термин «K_d» относится к скорости диссоциации конкретного комплекса связывающий фрагмент//мишень.

[0059] *K_D:* Используемый в данном документе термин «K_D» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения K_D можно определить с использованием методов, хорошо зарекомендовавших себя в данной области техники, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса или с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

[0060] *Эталон:* «Эталонный» объект, система, количество, набор условий и т. д. представляет собой объект, с которым сравнивается тестовый объект, систему, количество, набор условий и т. д., как описано в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления «эталонное» антитело представляет собой контрольное антитело, которое не было сконструировано, как описано в настоящем документе.

[0061] *Избирательное связывание:* Используемые в данном документе термины «избирательное связывание», «избирательно связывает», «специфическое связывание» или «специфически связывает» в отношении связывающего фрагмента и мишени относятся к предпочтительной ассоциации связывающего фрагмента с мишенью, а не с объектом, который не является мишенью. Определенная степень неспецифического связывания может иметь место между связывающим фрагментом и не-мишенью. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент селективно связывается с мишенью, если

связывание между связывающим фрагментом и мишенью более чем в 2 раза, более чем в 5 раз, более чем в 10 раз или более чем в 100 раз превышает связывание связывающего фрагмента и не-мишени. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент селективно связывается с мишенью, если аффинность связывания составляет менее около 10^{-5} М, менее около 10^{-6} М, менее около 10^{-7} М, менее около 10^{-8} М или менее около 10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью иммунологических анализов, прибора BIACORE®, KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов, известных в области техники.

[0062] *Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv):* Используемый в данном документе термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку переменных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера $V_H::V_L$. Тяжелая (V_H) и легкая цепи (V_L) либо соединены напрямую, либо соединены кодирующим пептид линкером (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L . Линкер обычно обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[0063] *Субъект:* Термин «субъект», используемый в данном документе, означает любого субъекта, для которого желательны диагноз, прогноз или терапия. Например, субъект может быть млекопитающим, *например*, человеком или приматом, отличным от человека (таким как человекообразная обезьяна, мартышка, орангутанг или шимпанзе), собакой, кошкой, морской свинкой, кроликом, крысой, мышью, лошастью, крупным рогатым скотом или коровой.

[0064] *Мишень:* Используемый в данном документе термин «мишень» представляет собой любую молекулу, специфически связанную связывающим фрагментом антитела или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления мишенью является антиген, описанный в настоящем документе (например, ADGRE2). В некоторых вариантах осуществления мишенью является FcR (например, FcRn). Термины «первая мишень» и «вторая мишень» используются в данном документе для обозначения молекул

двух разных молекулярных видов, а не двух молекул одного и того же молекулярного вида. Например, в некоторых вариантах осуществления первая мишень представляет собой белок сыворотки, а вторая мишень представляет собой FcRn.

[0065] *Терапевтически эффективное количество:* Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтической молекулы (например, антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе), которая оказывает терапевтическое действие на субъекта, подвергающегося лечению, с разумным соотношением польза/риск, применимым к любому медикаментозному лечению. Терапевтический эффект может быть объективным (т. е. измеряемым каким-либо тестом или маркером) или субъективным (т. е. субъект указывает на эффект или ощущает его). В частности, «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтической молекулы или композиции, эффективной для лечения, облегчения или предотвращения конкретного заболевания или состояния или для проявления поддающегося обнаружению терапевтического или профилактического эффекта, такого как облегчение симптомов, связанных с заболеванием, предотвращение или отсрочка начала заболевания и/или также уменьшение тяжести или частоты симптомов заболевания. Терапевтически эффективное количество можно вводить в режиме дозирования, который может включать множественные стандартные дозы. Для любой конкретной терапевтической молекулы терапевтически эффективное количество (и/или подходящая стандартная доза в пределах эффективного режима дозирования) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими агентами. Также, конкретное терапевтически эффективное количество (и/или стандартная доза) для любого конкретного субъекта может зависеть от множества факторов, включая подлежащее лечению расстройство и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого фармацевтического агента; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта; время введения, способ введения и/или скорость выведения или метаболизма конкретной используемой терапевтической молекулы; продолжительность лечения; и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

[0066] *Лечение:* Используемый в данном документе термин «лечение» (также «лечить» или «процесс лечения») относится к любому введению терапевтической молекулы (например, антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе), которое частично или полностью облегчает, ослабляет, улучшает, подавляет, задерживает начало, снижает тяжесть и/или уменьшает частоту возникновения одного или более симптомов или

признаков конкретного заболевания, расстройства и/или состояния. Такое лечение может проводиться у субъекта, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекта, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. Альтернативно или дополнительно, такое лечение может проводиться у субъекта, у которого проявляется один или более установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0067] Графические материалы предназначены только для иллюстрации; не для ограничения.

[0068] На Фиг. 1 представлена таблица, в которой показано количество измененных остатков в гуманизованных антителах к ADGRE2 относительно эталонной последовательности мыши. В таблице также показано количество остатков, отличающихся от последовательности зародышевой линии.

[0069] ФИГ. 2 показывает таблицу, в которой показано количество измененных остатков в гуманизованных антителах к ADGRE2 относительно эталонной последовательности мыши. В таблице также показано количество остатков, отличающихся от последовательности зародышевой линии.

[0070] На Фиг. 3-1, Фиг. 3-2 и Фиг. 3-3 показаны двумерные проекции типовой последовательности VH антитела. Показано, что аминокислотная последовательность образует девять антипараллельных β -цепей укладки иммуноглобулина. От N до C-конца первичной последовательности можно проследить от верхнего левого угла до нижнего правого. Фиг. 3-4 раскрывает SEQ ID NO: 39-40, 43, 41-42 и 44, соответственно, в порядке появления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0071] Данное изобретение частично основано на открытии сконструированных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые проявляют связывание с рецептором E2, сопряженным с G-белком адгезии, ADGRE2 (например, ADGRE2 человека). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено гуманизованное антитело к ADGRE2 и его фрагменты. ADGRE2, также известный как

EMR2, CD312, VBU или CD97, представляет собой рецептор клеточной поверхности, который является членом семейства рецепторов, сопряженным с G-белком адгезии (GPCR). ADGRE2 связывается с хондроитинсульфатным фрагментом цепей гликозаминогликана и способствует прикреплению клеток.

[0072] ADGRE2 экспрессируется моноцитами, макрофагами, дендритными клетками и гранулоцитами, играя роль в хемотаксисе, клеточной адгезии и дегрануляции. В макрофагах ADGRE2 способствует высвобождению воспалительных цитокинов, включая IL8 и TNF, передающих сигналы через G-белки.

[0073] ADGRE2 высоко экспрессируется в раковых клетках, в том числе, например, при рецидивирующем и рефрактерном остром миелоидном лейкозе. В некоторых вариантах осуществления ингибирование ADGRE2 используется для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления ингибирование ADGRE2 применяют для лечения рецидивирующего и рефрактерного острого миелоидного лейкоза.

Антитела

[0074] Антитело к ADGRE2 связывается с антигеном ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 связывает ADGRE2 человека. ADGRE2 описан в данной области техники и описан, например, в эталонной последовательности Uniprot № Q9UHX3-1.

[0075] В некоторых вариантах осуществления ADGRE2 человека содержит EGF-подобный домен 1, EGF-подобный домен 2, EGF-подобный домен 3, EGF-подобный домен 4, EGF-подобный домен 5 и GPS-домен.

[0076] Антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, может быть иммуноглобулином, антителом с тяжелой цепью, антителом с легкой цепью, антителом на основе LRR или другим белковым каркасом с антителоподобными свойствами, а также другим иммунологическим связывающим фрагментом, известным в данной области техники, включая, например, Fab, Fab', Fab'2, Fab₂, Fab₃, F(ab')₂, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, антитело, диатело, триантитело, тетратело, минитело, макситело, тандемное диатело (tandab), DVD, BiTe, четырехвалентное тандемное антитело (TandAb) и т.п., или любую их комбинацию. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов антител известны в данной области техники.

[0077] Антитело может представлять собой молекулу иммуноглобулина, состоящую из четырех полипептидных цепей, например, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей. Тяжелая цепь может включать переменный домен тяжелой цепи и константный

домен тяжелой цепи. Константный домен тяжелой цепи может включать области СН1, шарнира, СН2, СН3 и, в некоторых случаях, СН4. Подходящая константная область тяжелой цепи может быть получена из любого иммуноглобулина (например, IgA, IgG или IgE). В некоторых вариантах осуществления подходящая константная область тяжелой цепи может быть получена из IgG1, IgG2 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления подходящая константная область тяжелой цепи получена из IgG1. Легкая цепь может включать переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Константный домен легкой цепи может включать либо легкую цепь каппа, либо легкую цепь лямбда. Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи обычно можно дополнительно разделить на области изменчивости, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый из таких переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи может включать три CDR и четыре каркасных участка, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, один или несколько из которых могут быть сконструированы, как описано в данном документе. Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям по Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 та 1991)) или по Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). Используемые в данном документе CDR относятся к каждой из тяжелых (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и легких (LCDR1, LCDR2, LCDR3) цепей.

[0078] Варианты осуществления изобретения включают антитела, содержащие CDR, обнаруженные в доменах VH и VL, описанных в настоящем документе, которые идентифицируются с использованием обычных систем нумерации, таких как системы нумерации IMGT, Kabat и Chothia. Такие системы нумерации хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления CDR идентифицируют или нумеруют в соответствии с системой нумерации IMGT.

Типовые антитела

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитела к ADGRE2 или их фрагменты, описанные в настоящем документе, содержат общую переменную область тяжелой цепи.

[0080] В некоторых вариантах осуществления CDR идентифицируют по системе

нумерации IMGT.

[0081] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (VH): CDR1 VH: GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), CDR2 VH: VYPGDGD (SEQ ID NO: 2) и CDR3 VH: ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3).

[0082] В некоторых вариантах осуществления варибельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 7).

[0083] В некоторых вариантах осуществления варибельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 9).

[0084] В некоторых вариантах осуществления варибельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 11).

[0085] В некоторых вариантах осуществления варибельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTT
LVTVSS (SEQ ID NO: 13).

[0086] В некоторых вариантах осуществления варибельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность
QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGLT
VTVSS (SEQ ID NO: 15).

[0087] В некоторых вариантах осуществления варибельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 17).

[0088] В некоторых вариантах осуществления вариабельная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFQKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 30).

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на около 85%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичную последовательности из SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30.

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на около 85%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30, при этом также включающую одну или несколько из последовательностей CDR1_{VH}, vHCDR2 и/или vHCDR3, описанные в настоящем документе.

[0091] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30. В некоторых вариантах осуществления V_H содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% (*например*, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30. Например, V_H содержит аминокислотную последовательность, на около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% идентичную или гомологичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит не более 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных

замен относительно SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30.

[0092] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела к ADGRE2 кодируется полинуклеотидом, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность гуманизированного антитела к ADGRE2.

[0093] Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность CDR тяжелой цепи можно легко комбинировать, например, методами молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, представленными в настоящем документе или иным образом известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники.

[0094] В различных сконструированных антителах, описанных в настоящем документе, константный домен тяжелой цепи может относиться к любому классу (или подклассу). В различных сконструированных антителах, описанных в настоящем документе, константный домен тяжелой цепи может включать аминокислотную последовательность любого одного или нескольких из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, включая подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2. В различных вариантах осуществления константный домен сконструированных антител, описанных в настоящем документе, может включать смесь двух или более классов (или подклассов) константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, антитело к ADGRE2 может включать первую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, выбранного из константного домена класса IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, и вторую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, отличную от первой и выбранную из константного домена класса IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. В некоторых случаях константный домен антитела к ADGRE2, описанный в настоящем документе, может включать смесь двух или более подклассов конкретного класса константных доменов, например, первую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, выбранного из константного домена подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и вторую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, отличную от первой и выбранную из константного

домена подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых конкретных вариантах осуществления константный домен включает весь или часть константного домена IgG2 и весь или часть константного домена IgG4.

[0095] В некоторых случаях антитело к ADGRE2 включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, который проявляет измененное связывание (по сравнению с эталонной константной областью) с одним или несколькими Fc-рецепторами (например, рецептором FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIV или FcRn). В некоторых вариантах осуществления константная область, Fc-область или Fc-фрагмент сконструированы таким образом, чтобы связываться с мишенью (например, рецептором FcRn) измененным образом (например, чувствительным к pH образом (например, более или менее чувствительным к pH образом) и/или сниженным или повышенным связыванием) по сравнению с эталонной константной областью, Fc-областью или Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые проявляют пониженное связывание (по сравнению с эталонной константной областью) с одним или несколькими рецепторами Fcγ (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIV). В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые проявляют повышенное связывание с рецептором FcRn (по сравнению с эталонной константной областью) при pH сыворотки и/или при внутриклеточном pH.

[0096] Например, антитело к ADGRE2 может включать константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, сконструированные таким образом, чтобы они включали вставку, делецию или замену аминокислоты одного или нескольких аминокислотных остатков 251-256, 285- 290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация по Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)). Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что одна или несколько из этих аминокислот константной области, Fc-области или Fc-фрагмента опосредуют взаимодействие с Fc-рецептором, например, FcRn. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из этих описанных аминокислот заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления остаток негистидина заменен остатком гистидина. В некоторых вариантах осуществления остаток гистидина заменен остатком негистидина.

[0097] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает

константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 308, 309, 311, 312 и 314, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких положениях 308, 309, 311, 312 и 314 на треонин, пролин, серин, аспарагиновую кислоту и лейцин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 308, 309 и 311 заменены на изолейцин, пролин и глутаминовую кислоту, соответственно. В других вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 308, 309, 311, 312 и 314 заменены на треонин, пролин, серин, аспарагиновую кислоту и лейцин, соответственно.

[0098] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 251, 252, 254, 255 и 256, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких из этих положений. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 заменен на лейцин или аргинин, остаток 252 заменен на лейцин, тирозин, фенилаланин, серин, триптофан или треонин, остаток 254 заменен на треонин или серин, остаток 255 заменен на лейцин, глицин, изолейцин или аргинин и/или остаток 256 заменен на серин, фенилаланин, аргинин, глутамин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, аланин, аспарагин или треонин. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 заменен на лейцин, остаток 252 заменен на тирозин или лейцин, остаток 254 заменен на треонин или серин и/или остаток 255 заменен на аргинин. В других вариантах осуществления остаток 252 заменен на фенилаланин и/или остаток 256 заменен на аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 заменен на лейцин, остаток 252 заменен на тирозин, остаток 254 заменен на треонин или серин и/или остаток 255 заменен на аргинин.

[0099] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 428, 433, 434, 435 и 436, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких из этих положений. В некоторых вариантах осуществления остаток 428 заменен на метионин, треонин, лейцин, фенилаланин или серин, остаток 433 заменен на лизин, аргинин, серин, изолейцин, пролин, глутамин или гистидин, остаток 434 заменен на фенилаланин, тирозин или гистидин, остаток 435 заменен на тирозин и/или остаток 436 заменен на гистидин, аспарагин, аргинин, треонин, лизин, метионин или треонин. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 433, 434, 435 и 436 заменены на лизин, фенилаланин, тирозин и гистидин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остаток 428

заменен на метионин и/или остаток 434 заменен на тирозин.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 385, 386, 387 и 389, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких из этих положений. В некоторых вариантах осуществления остаток 385 заменен на аргинин, аспарагиновую кислоту, серин, треонин, гистидин, лизин или аланин, остаток 386 заменен на треонин, пролин, аспарагиновую кислоту, серин, лизин, аргинин, изолейцин или метионин, остаток 387 заменен на аргинин, гистидин, серин, треонин, аланин или пролин, и/или остаток 389 заменен на пролин или серин. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 385, 386, 387 и 389 заменены на аргинин, треонин, аргинин и пролин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 385, 386 и 389 заменены на аспарагинову кислоту, пролин и серин, соответственно.

[0101] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие одну или несколько из следующих замен: лейцин в остатке 251, тирозин или лейцин в остатке 252, треонин или серин в остатке 254, аргинин в остатке 255, треонин в остатке 308, пролин в остатке 309, серин в остатке 311, аспарагиновая кислота в остатке 312, лейцин в остатке 314, аргинин в остатке 385, треонин в остатке 386, аргинин в остатке 387, пролин в остатке 389, метионин в остатке 428, лизин в остатке 433, фенилаланин или тирозин в остатке 434, тирозин в положении 435 и/или тирозин в положении 436. Дополнительные аминокислотные замены, которые могут быть включены в константную область, Fc-область или Fc-фрагмент, включают замены, описанные, например, в патентах США № 6277375; 8012476; и 8163881.

[0102] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, включает константный домен тяжелой цепи, который включает мутацию Ala-Ala, описанную, например, в публикациях PCT № WO 94/28027 и WO 98/47531; и Xu et al. (2000) Cell Immunol 200:16-26. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 с одной или несколькими мутациями в константной области тяжелой цепи, включая мутацию Ala-Ala, обладает сниженной эффекторной функцией или не имеет ее. В соответствии с этими вариантами осуществления константная область антитела к ADGRE2, описанная в настоящем документе, может содержать замену аланина в положении 234 и/или мутацию аланина в положении 235 (нумерация EU).

[0103] Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность константного домена тяжелой цепи можно легко комбинировать, например, методами молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, представленными в настоящем документе или иным образом известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники.

[0104] В данном изобретении дополнительно предложено антитело к ADGRE2 или его фрагмент, содержащие различные указанные последовательности в одной или нескольких переменных областях легкой цепи, включая определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1-3. В различных вариантах осуществления молекулы с указанными переменными областями легкой цепи снабжены последовательностями тяжелой цепи, как обсуждалось выше. В некоторых вариантах осуществления CDR идентифицируют по системе нумерации IMGH.

[0105] Таким образом, в одном аспекте в данном изобретении предложено антитело к ADGRE2 или его фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6).

[0106] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент содержат переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 90% идентична SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 31, и переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 90% идентична SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 30.

[0107] В некоторых вариантах осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 95% идентична SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 31.

[0108] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент содержат переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGLAPRLLIYDTSKLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8).

[0109] В некоторых вариантах осуществления вариабельная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10).

[0110] В некоторых вариантах осуществления вариабельная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12).

[0111] В некоторых вариантах осуществления вариабельная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 14).

[0112] В некоторых вариантах осуществления вариабельная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTIRLRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16).

[0113] В некоторых вариантах осуществления вариабельная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGLAPRRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18).

[0114] В некоторых вариантах осуществления вариабельная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

[0115] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на около 85%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичную последовательности из SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 31.

[0116] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или около 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 31, при этом также включающую одну или несколько из последовательностей CDR1 VL, vLCDR2 и/или vLCDR3, описанных в настоящем документе.

[0117] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 31. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 содержит не более 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 31.

[0118] Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность CDR легкой цепи можно легко комбинировать, например, методами молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, представленными в настоящем документе или иным образом известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники.

[0119] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, которая включает любую последовательность константного домена легкой цепи, например, константную последовательность легкой цепи, известную специалистам в данной области техники. Как известно специалистам в данной области техники, константный домен легкой цепи может представлять собой константный домен каппа-легкой цепи или константный домен лямбда-легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константный домен легкой цепи, как описано в настоящем документе, представляет собой константный домен каппа-легкой цепи. В различных вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, включает константный домен легкой цепи.

[0120] Сконструированные антитела могут включать различные тяжелые цепи и легкие цепи, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 может включать две тяжелые цепи и легкие цепи. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает антитело, включающее по

меньшей мере одну тяжелую цепь и/или легкую цепь, как описано в настоящем документе, по меньшей мере один каркасный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе, по меньшей мере один CDR варибельного домена тяжелой цепи и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе, и/или любой константный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе.

[0121] Таким образом, в одном аспекте в данном изобретении предложено антитело к ADGRE2 или его фрагмент, содержащие варибельную область тяжелой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) CDR1 VH: GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), CDR2 VH: VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2) и CDR3 VH: ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3), и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность QWSSNPLT (SEQ ID NO: 6).

[0122] В таблице ниже показаны типичные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи гуманизованных антител к ADGRE2, описанных в настоящем документе.

Домен	Последовательности варибельных областей тяжелой и легкой цепи антитела к ADGRE
VH_1	QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQG LEWIGAVYYPGDGDRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSE DTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 7)
VL_1	EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPK RWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQ WSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14)
VH_2	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQG LEWIGAVYYPGDGDRYTKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRRLRSD DTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 9)
VL_2	EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKR WIYDTSKSLASGVPDFRSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWS

	SNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10)
VH_3	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWIGAVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRS EDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
VL_3	EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCASSSVSYMHWYQQKSGLSPKR WIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWS SNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12)
VH_4	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGAVYPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 13)
VL_4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVSYMHWYQQKPLAPRL LIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWS SNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8)
VH_5	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPG QGLEWIGAVYPGDGDTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 15)
VL_5	QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVSYMHWYQQKPLSPKR WIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTIRLEPEDFATYYCQQW SSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)
VH_6	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQ GLEWIGAVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLR SEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 17)
VL_6	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCASSSVSYMHWYQQKPLAPRR WIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQW SSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18).
VH_7	QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQG LEWIGAVYPGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSE DTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 30)

VL_7	EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKR WIIDTSKLGSGVSPARFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWS SNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).
------	---

[0123] В различных вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описано в настоящем документе, представляет собой гомодимерное моноклональное антитело. В различных вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в данном документе, представляет собой гетеродимерное антитело. В различных вариантах осуществления антитело к ADGRE2 представляет собой, например, типичное антитело или диатело, триатело, тетратело, минитело, макситело, тандемное диатело (tandab), DVD, BiTe, scFv, четырехвалентное тандемное антитело (TandAb), scFv, Fab, Fab₂, Fab₃, F(ab')₂ и т.п., или любую их комбинацию.

[0124] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, как описано в настоящем документе, или их часть, и один или несколько дополнительных полипептидов.

Примеры одноцепочечных переменных фрагментов

[0125] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен одноцепочечный переменный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека. «Одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку переменных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера V_H:V_L. Тяжелая (V_H) и легкая цепи (V_L) либо соединены напрямую, либо соединены кодирующим пептид линкером (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L. Линкер обычно обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер G4S (SEQ ID NO: 45).

[0126] Альтернативно или дополнительно, scFv может быть получен из Fab (вместо

антитела, например, получен из библиотек Fab). В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой Fab. В некоторых вариантах осуществления Fab является перекрестно связанным. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его связывающий фрагмент представляют собой $F(ab)_2$. Любая из вышеуказанных молекул может быть включена в состав слитого белка с гетерологичной последовательностью для образования антитела к антигену ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0127] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере около 1×10^{-6} М, по меньшей мере около 1×10^{-7} М, по меньшей мере около 1×10^{-8} М, по меньшей мере около 1×10^{-9} М или по меньшей мере около 1×10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере около 2×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) от около 2×10^{-8} М до около 8×10^{-9} М.

[0128] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) от около 1 нМ до 50 нМ, от около 5 нМ до 30 нМ, от около 5 нМ до 25 нМ, или от около 8 нМ до 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере около 50 нМ, по меньшей мере около 40 нМ, по меньшей мере около 35 нМ, по меньшей мере около 30 нМ, по меньшей мере около 25 нМ, по меньшей мере около 20 нМ, по меньшей мере около 19 нМ, по меньшей мере около 18 нМ, по меньшей мере около 17 нМ, по меньшей мере около 16 нМ, по меньшей мере около 15 нМ, по меньшей мере около 14 нМ, по меньшей мере около 13 нМ, по меньшей мере около 12 нМ, по меньшей мере около 11 нМ, по меньшей мере около 10 нМ, по меньшей мере около 9 нМ, по меньшей мере около 8 нМ, по меньшей мере около 7 нМ, по меньшей мере около 6 нМ, по меньшей мере около 5 нМ.

[0129] В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22.

[0130] В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит линкер, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в

SEQ ID NO: 24, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 24)

[0131] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 25)

[0132] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 26)

[0133] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 27)

[0134] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 или его фрагмент содержит модификацию консервативной последовательности (например, антитела к ADGRE2 или его фрагмента, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления модификация консервативной последовательности представляет собой аминокислотную модификацию, которая существенно не влияет или не изменяет характеристики связывания описанного в данном документе антитела к ADGRE2 или его фрагмента (например, антитела или его фрагмента), содержащего аминокислотную последовательность. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, вставки и делеции. Модификации могут быть введены в антитела к ADGRE2 или их фрагменты с помощью стандартных методов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты можно разделить на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами, такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены — это замены аминокислотного остатка на аминокислоту из той же группы. Например, аминокислоты можно классифицировать по заряду: положительно заряженные аминокислоты включают лизин, аргинин, гистидин, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аминокислоты с нейтральным зарядом включают аланин, аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин,

фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты можно классифицировать по полярности: к полярным аминокислотам относятся аргинин (основные полярные), аспарагин, аспарагиновая кислота (кислотные полярные), глутаминовая кислота (кислотные полярные), глутамин, гистидин (основные полярные), лизин (основные полярные), серин, треонин и тирозин; неполярные аминокислоты включают аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в области CDR могут быть заменены другими аминокислотными остатками из той же группы, и измененное антитело может быть проверено на сохранение функции. В некоторых вариантах осуществления изменено не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в указанной последовательности или области CDR.

[0135] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь и/или тяжелая цепь scFv к ADGRE2 содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% гомологичную или идентичную одной аминокислотной последовательности, выбранной из MALPVTALLPLALLLHA (SEQ ID NO: 32), METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 33), MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 34), METPAQLLFLLLLWLPDPTTG (SEQ ID NO: 35), MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 36), MKWVTFISLLFSSAYS (SEQ ID NO: 37), MDSKGSSQKGSRLLLLVSNNLLCQGVVS (SEQ ID NO: 38), MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC (SEQ ID NO: 28) или MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит MALPVTALLPLALLLHA (SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 34). В некоторых вариантах осуществления м представляет собой METPAQLLFLLLLWLPDPTTG (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 36). В некоторых вариантах осуществления

сигнальный пептид представляет собой MKWVTFISLLFSSAYS (SEQ ID NO: 37). В некоторых вариантах осуществления м представляет собой MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNLLLCQGVVS (SEQ ID NO: 38). В некоторых вариантах осуществления м представляет собой MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 29).

[0136] В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDТАVYYCARGFTAYGMDYWGGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVТMSCSASSSVSYMHWYQQK SGQSPKRWIYDTSKЛASGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 19) (scFv «K»);

[0137] QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWI GAVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGM DYWGQGTТVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVТMSCSASSSVS YMHWYQQKSGЛSPKRWIYDTSKЛASGVРDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQ QWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20) (scFv «B»);

[0138] QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEW IGAVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDТАVYYCARGFTAYGM DYWGQGTТVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVТMSCSASSSVS YMHWYQQKSGЛSPKRWIYDTSKЛASGVРDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQ QWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21) (scFv «N»); или

[0139] QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEW MGAVYPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEЛSSLRSEDТАVYYCARGFTAYG MDYWGGQGTЛVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATЛSLSPGERATЛSCSASS SVSYMHWYQQKPLAPRLLIYDTSKЛASGIPDRFSGSGSGTDFTЛTISRLEPEDFAVYYC QQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22) (scFv «A»).

[0140] В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 70 %, по меньшей мере на около 75 %, по меньшей мере на около 80 %, по меньшей мере на около 85 %, по меньшей мере на около 90 %, по меньшей мере на около 91 %, по меньшей мере на около 92 %, по меньшей мере на около 93 %, по меньшей мере на около 94 %, по меньшей мере на около

95 %, по меньшей мере на около 96 %, по меньшей мере на около 97 %, по меньшей мере на около 98 % или по меньшей мере на около 99 % гомологичную или идентичную SEQ ID NO: 19, 20, 21 или 22.

[0141] В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 20, 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

Нуклеотидные последовательности

[0142] Настоящее изобретение включает нуклеотидные последовательности, кодирующие одну или несколько тяжелых цепей, переменные домены тяжелой цепи, каркасные области тяжелой цепи, CDR тяжелой цепи, константные домены тяжелой цепи, легкие цепи, переменные домены легкой цепи, каркасные области легкой цепи, CDR легкой цепи, константные домены легкой цепи или другие иммуноглобулиноподобные последовательности или антитела, описанные в настоящем документе. В различных вариантах осуществления такие нуклеотидные последовательности могут присутствовать в векторе. В различных вариантах осуществления такие нуклеотиды могут присутствовать в геноме клетки, например, клетки субъекта, нуждающегося в лечении, или клетки для продукции антитела, например, клетке млекопитающего для продукции антитела.

Сконструированные антитела и слитые белки

[0143] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены слитые белки, содержащие (i) одну или несколько антигенсвязывающих областей, описанных в настоящем документе (например, антигенсвязывающую область иммуноглобулина, антитело с тяжелой цепью, антитело с легкой цепью, антитело на основе LRR или другой белковый каркас с антителоподобными свойствами, а также другие антигенсвязывающие фрагменты, известные в данной области техники, включая, например, Fab, Fab', Fab'2, Fab₂, Fab₃, F(ab')₂, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, антитело, диатело, триатело,

тетратело, минитело, макситело, тандемное диатело (tandab), DVD, ViTe, тандемное диатело (TandAb), и т.п.), например, один или несколько переменных доменов, описанных в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) и (ii) один или несколько дополнительных полипептидов. Например, альбумин является широко распространенным сывороточным белком, который защищен от деградации за счет pH-зависимой рециркуляции, опосредованной взаимодействием с FcRn. В некоторых вариантах осуществления один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, как описано в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) сливаются с альбумином, его частью (например, частью альбумина, которая связывается с FcRn) и/или сконструированным вариантом альбумина, который связывается с FcRn с повышенной аффинностью. В других случаях один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, описанных в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) сливаются с полипептидом, который связывается с альбумином, с образованием слитого комплекса белок-альбумин, который, в свою очередь, может связываться с FcRn. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связывается с альбумином, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Альбумин или его часть могут включать мутацию одной или нескольких аминокислот, которая может модифицировать его связывание с FcRn. Такие мутации известны в данной области (см., например, Andersen et al., *Nature Communications* 3:610 doi: 10.1038/nocmms1607 (2012)). В других случаях один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, описанных в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) сливаются с трансферрином. Трансферрин рециркулирует путем связывания с рецептором трансферрина (см., например, Widera et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1439-66 (2003)).

Сконструированные антитела и их фрагменты

[0144] Антитела ADGRE2 и их фрагменты в соответствии с данным изобретением сконструированы так, чтобы включать один или несколько связывающих фрагментов, которые специфически связывают одну или несколько представляющих интерес мишеней. Антитела ADGRE2 и их фрагменты включают нуклеиновые кислоты (например, РНК и ДНК), белки (например, антитела) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления pH-зависимые связывающие фрагменты могут представлять собой или включать,

например, нуклеиновые кислоты (например, РНК и ДНК) и аптамеры, полипептиды (например, антитела или их фрагменты, альбумины, рецепторы, лиганды, сигнальные пептиды, авидин и белок А), полисахариды, биотин, гидрофобные группы, гидрофильные группы, лекарственные средства и любые органические молекулы, которые связываются с рецепторами.

[0145] Антитела к ADGRE2, описанные в настоящем документе, представляют собой гуманизированные антитела и их фрагменты. В данной области техники известны различные способы гуманизации, которые включают, например, способы гуманизации Хома и другие способы, основанные на биоинформатике.

Антитело или его фрагмент в качестве связывающих фрагментов

[0146] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, представляют собой антитело к ADGRE2. В некоторых случаях один или несколько связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, представляют собой или включают антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и/или их Fc-области (или Fc-фрагменты). Основная структура антитела IgG состоит из двух идентичных полипептидных легких цепей и двух идентичных полипептидных тяжелых цепей, связанных вместе дисульфидными связями. Первый домен, расположенный на аминоконце каждой цепи, имеет переменную аминокислотную последовательность, обеспечивающую специфичность связывания антител, характерную для каждого отдельного антитела. Они известны как переменные области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL). Другие домены каждой цепи относительно инвариантны в аминокислотной последовательности и известны как константные области тяжелой (CH) и легкой (CL) цепи. Для антитела IgG легкая цепь включает одну переменную область (VL) и одну константную область (CL). Тяжелая цепь IgG включает переменную область (VH), первую константную область (CH1), шарнирную область, вторую константную область (CH2) и третью константную область (CH3). В антителах IgE и IgM тяжелая цепь включает дополнительную константную область (CH4).

[0147] Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, сконструированные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две

молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, слитые антитела (иногда называемые в данном документе «конъюгатами антител»), гетероконъюгированные антитела, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), верблужьки антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), минитела, однодоменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител») и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к популяциям поликлональных антител.

[0148] Термин «Fc-фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким фрагментам Fc-области, которые сохраняют функцию и/или активность Fc, описанные в настоящем документе, такие как связывание с Fc-рецептором. Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, scFv-фрагмент, dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) и выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на функциональность таким же образом, что и для интактных антител.

[0149] В некоторых аспектах в данном изобретении предложены антитела или их фрагменты, которые связываются с ADGRE2 человека, содержащие константные области тяжелой и/или легкой цепи человека, где константная область тяжелой цепи человека содержит изотипический вариант, содержащий Fc-область IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека.

[0150] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело или его фрагмент, которое связывается с ADGRE2 человека, где антитело содержит вариант Fc-области IgG человека, который содержит аминокислотную замену S324N, заменяющую серин в положении аминокислоты 324

исходного антитела на аспарагин, тогда как антитело, содержащее вариант Fc-области IgG человека, проявляет улучшенную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) по сравнению с исходным антителом.

[0151] Антитела или их фрагменты могут быть получены любым известным в данной области способом синтеза антител (см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Химерные антитела могут быть получены способами, описанными, например, в Morrison, 1985, *Science* 229:1202, а гуманизированные антитела способами, описанными, например, в патенте США № 6180370.

[0152] Дополнительные композиции и способы, описанные в настоящем документе, представляют собой биспецифические антитела и мультивалентные антитела, как описано, например, в Segal et al., *J. Immunol. Methods* 248:1-6 (2001) и Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Сконструированные антигенсвязывающие области

[0153] В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент представляет собой или включает антитело (например, антитело IgG, например, антитело IgG1, IgG2 или IgG3) или антигенсвязывающий фрагмент, сконструированный для связывания с мишенью (т.е. антигеном) измененным образом (например, чувствительным к pH образом, например, более или менее чувствительным к pH образом) по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Например, антитело можно сконструировать путем модификации (например, путем вставки, удаления или замены) аминокислоты в одном или нескольких CDR антитела и/или в положении, вовлеченном в структуру CDR антитела. Примерные неограничивающие сайты антитела, которые можно модифицировать, включают следующие (положения аминокислот указаны на основе нумерации по Kabat (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, NIH)).

[0154] Тяжелая цепь: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b и H102.

[0155] Легкая цепь: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 и L94.

[0156] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из этих описанных аминокислот могут быть заменены гистидином, аргинином, лизином,

аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что замена аминокислоты в одном или нескольких из этих положений на гистидин может привести к получению антитела, обладающего рН-зависимыми антигенсвязывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления остаток негистидина заменен остатком гистидина. В некоторых вариантах осуществления остаток гистидина заменен остатком негистидина. Дополнительные сконструированные антигенсвязывающие области включают области, описанные, например, в публикации патента США № 20110229489.

Сконструированные константные области

[0157] В некоторых случаях связывающий фрагмент представляет собой или включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, который связывает один или несколько Fc-рецепторов (например, рецептор Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIV или FcRn). В некоторых вариантах осуществления константная область, Fc-область или Fc-фрагмент сконструированы таким образом, чтобы связываться с мишенью (например, Fc-рецептором) измененным образом (например, чувствительным к рН образом например, более или менее чувствительным к рН образом) по сравнению с эталонной константной областью, Fc-областью или Fc-фрагментом.

[0158] В некоторых случаях связывающий фрагмент может представлять собой или включать константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, сконструированные таким образом, чтобы они включали вставку, делецию или замену аминокислоты одного или нескольких аминокислотных остатков, описанных в настоящем документе (например, 251-256, 285- 290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация по Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH))).

Получение антител к ADGRE2 и их фрагментов

[0159] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы они включали один или несколько связывающих фрагментов, которые проявляют связывание с одной или несколькими мишенями, путем мутагенеза с использованием известных методов. Например, можно получить последовательность эталонного полипептида (например, терапевтического антитела или терапевтического слитого белка), и можно вставить, удалить или заменить один или несколько аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков могут быть заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой

кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот заменены на гистидин.

[0160] В некоторых вариантах осуществления, не желая ограничиваться теорией, полагают, что замена аминокислотного остатка на гистидин приводит к вставке сайта протонирования, что может повысить чувствительность связывающего фрагмента к рН. Полипептиды можно получать с использованием стандартных способов и анализировать на связывание с интересующими мишенями, как описано в настоящем документе. Дополнительные способы повышения чувствительности связывающего фрагмента к рН описаны, например, в Sarkar et al., *Nature Biotechnology* 20:908-913 (2002); Murtaugh et al., *Protein Science* 20:1619-1631 (2011) и публикации патента США № 20110229489.

[0161] В некоторых вариантах осуществления выбирают первую представляющую интерес мишень, и обеспечивают, получают и/или продуцируют антитело, которое избирательно связывается с мишенью (например, с использованием известных способов, описанных в настоящем документе). Одну или несколько аминокислот антигенсвязывающей области и/или Fc-участка заменяют (например, гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином), и определяют чувствительность связывания с мишенью к рН (и, дополнительно или альтернативно, с FcRn).

[0162] В некоторых вариантах осуществления обеспечивают, получают и/или продуцируют полипептид, который естественным образом связывается с представляющей интерес мишенью. Полипептид конъюгируют с Fc-областью или Fc-фрагментом, описанными в настоящем документе (например, который связывается с FcRn с желаемой аффинностью связывания) с использованием известных способов. Например, полипептид и Fc-область или Fc-фрагмент можно конъюгировать химическими средствами или с помощью рекомбинантной экспрессии в виде слитого белка. Дополнительно или альтернативно одна или несколько аминокислот полипептида могут быть заменены (например, гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином), и определяют чувствительность связывания полипептида и мишени к рН.

[0163] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы включать один или несколько связывающих фрагментов, идентифицированных и/или отобранных путем скрининга. Например, антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген, может быть идентифицирован с использованием библиотеки, например, фаговой библиотеки,

экспрессирующей антигенсвязывающие фрагменты. Известны способы скрининга библиотек рекомбинантных антител (см., например, Hoogenboom, Nature Biotech. 23:1105-1116 (2005); патент США № 5837500; патент США № 5571698; WO 2012/044831).

ПЭГилирование

[0164] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, как описано в настоящем документе, может быть ПЭГилировано для включения моно- или поли- (например, 2-4) фрагментов ПЭГ. Такие ПЭГилированные антитела могут демонстрировать увеличенный период полужизни по сравнению с не-ПЭГилированным эталонным антителом, например, антителом, имеющим ту же аминокислотную последовательность, но другую степень ПЭГилирования или отсутствие ПЭГилирования.

[0165] ПЭГилирование можно проводить любой подходящей реакцией, известной в данной области техники. Способы получения ПЭГилированного белка обычно могут включать (а) взаимодействие полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, при которых полипептид становится присоединенным к одной или нескольким группам ПЭГ; и (b) получение продукта(ов) реакции. Как правило, условия реакций можно определять в каждом конкретном случае на основе известных параметров и желаемого результата.

[0166] Существует ряд способов присоединения ПЭГ, доступных специалистам в данной области техники. Например, стадия ПЭГилирования антитела или его фрагмента, описанная в настоящем документе, может быть осуществлена посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой полиэтиленгликоля.

Измерение взаимодействия связывающих фрагментов и мишеней

[0167] Связывающие свойства описанного в настоящем документе антитела или его фрагмента (например, антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе) с мишенью (например, ADGRE2) можно измерить способами, известными в данной области техники, например, одним из следующих методов: анализ BIACORE, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), рентгеновская кристаллография, анализ последовательности и сканирующий мутагенез. Связывающее взаимодействие антитела и ADGRE2 и/или FcRn можно анализировать с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). ППР или анализ биомолекулярных взаимодействий (АБВ) выявляет

биоспецифические взаимодействия в режиме реального времени без мечения каких-либо взаимодействующих веществ. Изменения массы на поверхности связывания (свидетельствующие о событии связывания) чипа АБВ приводят к изменению показателя преломления света вблизи поверхности. Изменения рефракции генерируют обнаруживаемый сигнал, который измеряется как показатель реакций в реальном времени между биологическими молекулами. Способы использования ППР описаны, например, в патенте США № 5641640; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 и онлайн-ресурсах, предоставленных BIAcore International AB (Uppsala, Sweden). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (анализ кинетического исключения), доступный от Sapidyne Instruments (Бойсе, штат Айдахо).

[0168] Информация по результатам ППР может быть использована для точного и количественного измерения равновесной константы диссоциации (K_D) и кинетических параметров, включая K_{on} и K_{off} , для связывания связывающего фрагмента с мишенью (например, антитела к ADGRE2 с ADGRE2 и/или FcRn). Такие данные можно использовать для сравнения различных молекул. Информация по результатам ППР также может использоваться для разработки отношений структура-активность (ОСА). Например, можно оценить кинетические и равновесные параметры связывания конкретных фрагментов связывания с мишенями при различных уровнях pH. Могут быть идентифицированы варианты аминокислот в заданных положениях, которые коррелируют с конкретными параметрами связывания, например, высокой аффинностью, низкой аффинностью и медленным K_{off} , при определенных уровнях pH.

Способы лечения

[0169] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), используют в способе лечения одного или нескольких состояний, связанных с ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанное в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), предназначено для применения в качестве лекарственного средства. Состояния, связанные с ADGRE2, могут включать, без ограничения, состояния, которые вызваны, включают, включают симптомы, возникающие полностью или частично в результате или, как известно, возникающие в связи с экспрессией ADGRE2.

[0170] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен способ лечения рака,

включающий введение агента, который специфически связывает ADGRE2 (например, описанное в данном документе антитело к ADGRE2 или его фрагмент). Рак представляет собой широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные части тела по лимфатической системе или кровотоку В некоторых вариантах осуществления «рак» или «раковая ткань» включает солидную опухоль. Примеры рака, который можно лечить посредством способов по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, рак иммунной системы, включая лимфому, лейкоз, миелому и другие злокачественные лейкоцитарные заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

[0171] В некоторых вариантах осуществления лимфома выбрана из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), СПИД-ассоциированной лимфомы, ALK-положительной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), классической лимфомы Ходжкина, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВКЛ), фолликулярной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфоме, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при мультицентрической болезни Кастанеллана, ассоциированной с HHV8, лимфоматоидного гранулематоза, лимфоплазмочитарной лимфомы, лимфомы мантийных клеток (ЛМК), В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы лимфатической ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (ЛТАС), узловой В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (УЛМЗ), лимфомы Ходжкина с преобладанием узловых лимфоцитов, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, первичной выпотной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и макроглобулинемии Вальденстрема. В некоторых вариантах осуществления лимфома выбрана из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВКЛ), фолликулярной лимфомы, лимфомы мантийных клеток (ЛМК), В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы лимфатической ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (ЛТАС) и неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий и рефрактерный острый миелоидный лейкоз.

[0172] В определенных вариантах осуществления опухоль представляет собой рак.

В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак крови. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза, лимфомы и миелоидных злокачественных новообразований. Неограничивающие примеры рака крови включают множественную миелому, лейкоз и лимфомы. Неограничивающие примеры лейкоза включают острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый промиелоцитарный лейкоз (APL), острый лейкоз смешанного фенотипа (MLL), волосатоклеточный лейкоз и В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз. Лимфома может быть лимфомой Ходжкина или неходжкинской лимфомой. Неограничивающие примеры миелоидных злокачественных новообразований включают миелодиспластические синдромы (MDS), миелопролиферативные новообразования (MPN), миелоидные/лимфоидные новообразования (например, миелоидные/лимфоидные новообразования с эозинофилией и перестройкой рецептора альфа тромбоцитарного фактора роста (PDGFRA), рецептора бета тромбоцитарного фактора роста (PDGFRB) или рецептора роста фибробластов 1 (FGFR1), или с PCM1-JAK2), острый миелоидный лейкоз (AML), бластное плазмцитоидное новообразование дендритных клеток, В-лимфобластный лейкоз/лимфому и Т-лимфобластный лейкоз/лимфому. В некоторых вариантах осуществления миелоидные злокачественные новообразования включают миелодиспластические синдромы.

[0173] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. Неограничивающие примеры В-клеточного злокачественного новообразования включают В-клеточную лимфому (BCL), В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественную миелому (MM), CLL с трансформацией Рихтера и лимфому ЦНС. В-клеточная лимфома включает В-клеточную неходжкинскую лимфому (NHL) и В-клеточную лимфому Ходжкина.

[0174] В различных вариантах осуществления введение антитела или его фрагмента, описанных в настоящем документе (например, антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе, или его фрагмента) приводит к снижению распространенности, частоты, уровня и/или количества одного или нескольких симптомов или биомаркеров состояния, связанного с ADGRE2, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники, например, снижение по меньшей мере на около 3%, около 4%, около 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9%, около 10%, около 15%,

около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% одного или нескольких симптомов или биомаркеров по сравнению с предыдущим измерением у субъекта или с эталонным значением.

[0175] В некоторых вариантах осуществления введение антитела или его фрагмента, описанного в настоящем документе (например, антитела к ADGRE2, описанных в настоящем документе) субъекту, страдающему раком, приводит к большему уменьшению или улучшению одного или нескольких симптомов или биомаркеров рака, чем эталонное антитело, например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание ADGRE2 в сопоставимых условиях.

[0176] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, как описано в настоящем документе), проявляют пониженную эффективную дозу по сравнению с эталонным белком (например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2). Например, эффективная доза антитела к ADGRE2, как описано в настоящем документе, может составлять, например, менее 1000 мг/дозу, например, менее 900 мг/дозу, 800 мг/дозу, 700 мг/дозу, 600 мг/дозу, 500 мг/дозу, 550 мг/дозу, 400 мг/дозу, 350 мг/дозу, 300 мг/дозу, 200 мг/дозу, 100 мг/дозу, 50 мг/дозу, 25 мг/дозу или менее. В некоторых случаях эффективная доза антитела к ADGRE2, как описано в настоящем документе, ниже, чем эффективная, рекомендуемая или утвержденная доза эталонного антитела, причем эта доза эталонного антитела может составлять, например, 900 мг/дозу или 600 мг/дозу. В качестве альтернативы или в сочетании с дозировкой, описанной в настоящем документе, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, можно эффективно или с пользой вводить с частотой реже одного раза в неделю, например, реже одного раза в неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или год. В некоторых случаях эффективная или полезная частота введения антитела к ADGRE2, как описано в настоящем документе, ниже, чем эффективная, рекомендуемая или одобренная частота введения эталонного антитела, при этом частота введения может быть еженедельной (например, в дозе 300-600 мг, в зависимости от массы субъекта) или каждые две недели (например, в дозе 300-1200 мг, в зависимости от массы субъекта).

[0177] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем

документе), можно вводить в уменьшенной дозе по сравнению с эталонным белком, например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2, в то время как достижение равного, равноэффективного, сравнительно эффективного или существенно эффективного результата, когда антитело к ADGRE2 вводят в идентичном, эквивалентном или практически эквивалентном составе и/или с помощью идентичного, эквивалентного или практически эквивалентного способа введения, что и эталонное (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание ADGRE2). В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, можно вводить с увеличенным интервалом по сравнению с эталонным антителом (например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2), в то время как достижение равного, равноэффективного, сравнительно эффективного или существенно эффективного результата, когда антитело к ADGRE2 вводят в идентичном, эквивалентном или практически эквивалентном составе и/или с помощью идентичного, эквивалентного или практически эквивалентного способа введения, что и эталонное. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, можно вводить в меньшем количестве разовых доз и/или в течение меньшего периода лечения по сравнению с эталонным антителом, в то время как достижение равного, равноэффективного, сравнительно эффективного или существенно эффективного результата, когда антитело к ADGRE2 вводят в идентичном, эквивалентном или практически эквивалентном составе и/или с помощью идентичного, эквивалентного или практически эквивалентного способа введения, что и эталонное (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание ADGRE2).

[0178] В соответствии с некоторыми такими вариантами осуществления введенная доза антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе, может с меньшей вероятностью вызывать неблагоприятный ответ при введении субъекту, например, неблагоприятный иммунный ответ, чем эффективная доза эталонного антитела, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2. Соответственно, в различных вариантах осуществления антитело к ADGRE2, как описано в настоящем документе, может с меньшей вероятностью, чем эталонное антитело, на введенную единицу активности вызвать неблагоприятную реакцию или побочный эффект. В различных вариантах осуществления описанное в настоящем документе антитело к ADGRE2 может с меньшей вероятностью, чем эталонное антитело, на введенную единицу активности вызвать неблагоприятную реакцию или побочный эффект, имеющий определенную степень тяжести. В различных вариантах осуществления описанное в настоящем

документе антитело к ADGRE2 может вызывать одну или несколько неблагоприятных реакций или побочных эффектов в меньшей степени или у меньшего числа пациентов, чем эталонное антитело, на введенную единицу активности. Примеры неблагоприятных реакций или побочных эффектов, которые могут быть связаны с введением антитела, способного связывать ADGRE2, могут включать головную боль, назофарингит, боль в спине, тошноту, диарею, гипертонию, инфекцию верхних дыхательных путей, боль в животе, рвоту, анемию, кашель, периферические отеки и/или инфекции мочевыводящих путей.

[0179] В некоторых вариантах осуществления при введении субъекту (например, в виде разовой дозы), антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), можно вводить, измеряют на повышенном уровне в плазме в определенное время после введения (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) по сравнению с уровнем контроля в то же определенное время (например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2). Например, в определенное время после введения разовой дозы уровень антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе, составляет по меньшей мере на около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 100%, около 150%, около 200%, около 300%, около 400% или около 500% выше, чем соответствующий уровень эталонного антитела.

[0180] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), измеряют на повышенном уровне в плазме в определенное время (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) после введения (например, разовой дозы) по сравнению с уровнем контроля в то же определенное время. Например, в определенное время после введения уровень антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе, составляет по меньшей мере на около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 100%, около 150%, около 200%, около 300%, около 400% или около 500% выше, чем соответствующий уровень эталонного антитела.

[0181] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, имеет увеличенный период полужизни (например, по сравнению с контролем, например, эталонным антителом, например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2), и, таким образом, антитело к ADGRE2 можно вводить субъекту с увеличенными интервалами между дозами. Например, антитело к

ADGRE2 можно вводить один раз в неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые 6 недель, каждые 8 недель или дольше.

[0182] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента, описанных в настоящем документе (например, антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе), составляет около 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% от эффективного количества эталонного терапевтического белка, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2). В некоторых вариантах осуществления разовая доза антитела к ADGRE2, описанного в данном документе, обеспечивает сравнимый терапевтический эффект с двумя или более дозами эталонного антитела.

[0183] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), вводят в дозе, которая составляет около 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% от концентрации целевого антигена (например, ADGRE2) у субъекта.

[0184] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), могут быть физически введены субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Типичные способы введения раскрытых в данном документе составов включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте настоящего документа фраза «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, но не ограничиваясь ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления состав вводят непарентеральным путем, включая местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или большего количества продолжительных периодов.

[0185] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), можно использовать в ряде диагностических и терапевтических применений. Например, детектируемо-меченые версии сконструированных антител, как описано в настоящем документе, можно использовать в анализах для обнаружения присутствия или количества ADGRE2 в образце (например, биологическом образце). Описанные в данном документе сконструированные антитела можно использовать в анализах *in vitro* для изучения связывания с ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, можно использовать в качестве положительного контроля в анализе, предназначенном для выявления дополнительных новых соединений, которые в остальном пригодны для лечения расстройств, связанных с ADGRE2. Например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, можно использовать в качестве положительного контроля в анализе для идентификации дополнительных соединений (например, низкомолекулярных соединений, аптамеров или антител), которые связываются с ADGRE2.

[0186] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, можно использовать для наблюдения за субъектом, например, субъектом, имеющим, подозреваемым в наличии, подверженным риску развития или находящимся на лечении одного или нескольких состояний, связанных с ADGRE2. Мониторинг может включать определение количества или активности ADGRE2 у субъекта, например, в сыворотке субъекта. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят не менее одного (1) часа, например, не менее 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 часов, или не менее 1 дня, 2 дней, 4 дней, 10 дней, 13 дней, 20 дней или более, или по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 10 недель, 13 недель, 20 недель или более после введения антитела к ADGRE2, как описано в настоящем документе. Субъекта можно оценивать в один или несколько из следующих периодов: до начала лечения; во время лечения; или после введения одного или нескольких элементов лечения. Оценка может включать оценку необходимости дальнейшего лечения, например, оценку необходимости изменения дозировки, частоты введения или продолжительности лечения. Это также может включать оценку необходимости добавления или исключения выбранного терапевтического воздействия, например, добавления или исключения любого из описанных в данном документе способов лечения расстройства, связанного с ADGRE2.

Составы и введение

[0187] В различных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), могут быть включены в фармацевтическую композицию. Такая фармацевтическая композиция может быть применима, например, для профилактики и/или лечения заболеваний, например, расстройства, связанного с ADGRE2. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены способами, известными специалистам в данной области (например, описанными в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)).

[0188] Подходящее средство введения может быть выбрано в зависимости от возраста и состояния субъекта. Разовая доза фармацевтической композиции, содержащей антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе), может быть выбрана из диапазона от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела. С другой стороны, доза может быть выбрана в диапазоне от 0,001 до 100000 мг/кг массы тела, но настоящее изобретение не ограничивается такими диапазонами. Доза и способ введения варьируются в зависимости от массы тела, возраста, состояния и т.п. пациента и могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области техники.

[0189] В различных вариантах осуществления можно составить фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Композиции по данному изобретению могут включать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания.

[0190] В различных вариантах осуществления композиция, содержащая описанное в данном документе антитело, например, стерильный состав для инъекций, может быть составлена в соответствии с традиционной фармацевтической практикой с использованием дистиллированной воды для инъекций в качестве носителя. Например, физиологический раствор или изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие добавки, такие как D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия, можно использовать в качестве водного раствора для инъекций, необязательно в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, например, спиртом, таким как этанол, и полиспиртом, таким как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, и неионогенным поверхностно-активным веществом, таким как

полисорбат 80™, НСО-50 и т. п.

[0191] Как описано в данном документе, фармацевтическая композиция может находиться в любой форме, известной в данной области техники. Такие формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории.

[0192] Выбор или применение любой конкретной формы может частично зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Например, композиции, содержащие композицию, предназначенную для системной или местной доставки, могут быть в форме растворов для инъекций или инфузий. Соответственно, композиции могут быть составлены для введения парентеральным способом (например, внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекцией). В контексте данного документа парентеральное введение относится к способам введения, отличным от энтерального и местного, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, интраназальную, интраокулярную, легочную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, внутрилегочную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную, интрацеребральную, интракраниальную, интракаротидную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

[0193] Путь введения может представлять собой парентеральным, например, введение путем инъекции, трансназальное введение, транспульмональное введение или чрескожное введение. Введение может быть системным или местным, осуществляемым путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции.

[0194] В различных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения композиции, описанной в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения композиции, описанной в данном

документе, в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных растворов для инъекций, способы изготовления включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, которая приводит к получению порошка композиции, описанной в данном документе, плюс любого дополнительного необходимого ингредиента (смотрите ниже) из предварительно стерильно профильтрованного раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию реагента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

[0195] Фармацевтическую композицию можно вводить парентерально в форме инъекционной композиции, содержащей стерильный раствор или суспензию в воде или другой фармацевтически приемлемой жидкости. Например, фармацевтическая композиция может быть составлена путем подходящего объединения терапевтической молекулы с фармацевтически приемлемыми носителями или средами, такими как стерильная вода и физиологический раствор, растительное масло, эмульгатор, суспендирующий агент, поверхностно-активное вещество, стабилизатор, ароматизирующий эксципиент, разбавитель, носитель, консервант, связующее вещество, с последующим смешиванием в форме единичной дозы, необходимой в рамках общепринятой фармацевтической практики. Количество фармацевтической композиции, включенной в фармацевтические препараты, является таким, чтобы обеспечить подходящую дозу в указанном диапазоне. Неограничивающие примеры масляной жидкости включают кунжутное масло и соевое масло, которые можно комбинировать с бензилбензоатом или бензиловым спиртом в качестве солюбилизующего агента. Другие элементы, которые могут быть включены в состав, включают буфер, такой как фосфатный буфер или буфер на основе ацетата натрия, успокаивающий агент, такой как гидрохлорид прокаина, стабилизатор, такой как бензиловый спирт или фенол, и антиоксидант. Состав для инъекций может быть упакован в подходящую ампулу.

[0196] В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена для хранения при температуре ниже 0°C (например, -20°C или -80°C). В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена для хранения до 2 лет (например, в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти

месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 года, 11/2 года или 2 лет) при 2–8°C (например, 4°C). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции стабильны при хранении в течение по меньшей мере 1 года при 2-8°C (например, 4°C).

[0197] В конкретных случаях фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде раствора. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена, например, в виде забуференного раствора подходящей концентрации и подходящего для хранения при 2-8°C (например, 4°C).

[0198] Композиции, включающие одно или несколько сконструированных антител, как описано в настоящем документе, могут быть включены в состав иммунолипосомных композиций. Такие составы могут быть приготовлены способами, известными в данной области. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты, например, в патенте США № 5013556.

[0199] В определенных вариантах осуществления композиции могут быть составлены с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочная кислота. Многие методы приготовления таких составов известны в данной области. См., например, J. R. Robinson (1978) "*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*," Marcel Dekker, Inc., New York.

[0200] В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены в виде композиции, подходящей для внутрилегочного введения (например, для введения через ингалятор или небулайзер) млекопитающему, такому как человек. Способы составления таких композиций хорошо известны в данной области. Составы для ингаляторов сухого порошка и подходящие системы для введения составов также известны в данной области. Легочное введение может быть пероральным и/или назальным. Примеры фармацевтических устройств для доставки в легкие включают дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка (DPI — англ.: dry powder inhaler) и небулайзеры. Например, описанная в данном документе композиция может быть введена в легкие субъекта с помощью ингалятора сухого порошка. Эти ингаляторы представляют собой устройства без пропеллента, которые доставляют диспергируемые и стабильные сухие порошковые композиции в легкие. Ингаляторы сухого порошка хорошо известны в области

медицины и включают, без ограничения: TURBOHALER® (AstraZeneca; Лондон, Англия), ингалятор AIR® (ALKERMES®; Кембридж, штат Массачусетс); ROTAHALER® (GlaxoSmithKline; Лондон, Англия); и ECLIPSE™ (Sanofi-Aventis; Париж, Франция). См. также, например, публикации РСТ № WO 04/026380, WO 04/024156 и WO 01/78693. Устройства DPI использовались для легочного введения полипептидов, таких как инсулин и гормон роста. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе композиция может вводиться внутривнегочно с помощью ингалятора с отмеренной дозой. В этих ингаляторах для доставки дискретной дозы соединения в легкие используется пропеллент. Дополнительные устройства и способы внутривнегочного введения изложены, например, в публикациях патентных заявок США №№ 20 050 271 660 и 20 090 110 679, раскрытия каждого из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0201] В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены для доставки в глаз, например, в форме фармацевтически приемлемого раствора, суспензии или мази. Препарат для лечения глаз может быть в форме стерильного водного раствора, содержащего, например, дополнительные ингредиенты, такие как, помимо прочего, консерванты, буферы, тонизирующие агенты, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные смачивающие или осветляющие агенты и агенты, повышающие вязкость. Препарат, описанный в данном документе, можно вводить местно в глаз субъекта, нуждающегося в лечении (например, субъекта, страдающего ВМД), обычными способами, например, в форме капель или ванночек для глаз применением терапевтического раствора, содержащего одну или более композиций.

[0202] В определенных вариантах осуществления для введения композиции, описанной в данном документе, могут подходить различные устройства для введения лекарственных средств в полость стекловидного тела глаза. Например, в публикации США № 2002/0026176 описан obturator слезного канальца, содержащий фармацевтический препарат, который можно вводить через склеру таким образом, чтобы он выступала в полость стекловидного тела и доставлял фармацевтический препарат в полость стекловидного тела. В другом примере в патенте США № 5443505 описано имплантируемое устройство для введения в супрахориоидальное пространство или бессосудистую область для замедленного высвобождения лекарственного средства во внутренние структуры глаза. Каждый из патентов США №№ 5 773 019 и 6 001 386 раскрывает имплантируемое устройство для доставки лекарственного средства, прикрепляемое к склеральной поверхности глаза. Дополнительные способы и устройства

(например, транссклеральный пластырь и доставка через контактные линзы) для доставки терапевтического средства в глаз описаны, например, у Ambati and Adamis (2002) *Prog Retin Eye Res* 21(2):145-151; Ranta and Urtili (2006) *Adv Drug Delivery Rev* 58(11):1164-1181; Barocas and Balachandran (2008) *Expert Opin Drug Delivery* 5(1):1-10(10); Gulsen and Chauhan (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2342-2347; Kim et al. (2007) *Ophthalmic Res* 39:244-254; и в публикации РСТ № WO 04/073551, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0203] В некоторых вариантах осуществления введение антитела, как описано в настоящем документе, достигается путем введения субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтическое антитело, описанное в настоящем документе, могут быть включены в генную конструкцию для использования в качестве части протокола генной терапии для доставки нуклеиновых кислот, которые можно использовать для экспрессии и продукции антитела внутри клеток. Конструкции экспрессии таких компонентов можно вводить в любом терапевтически эффективном носителе, например любом составе или композиции, способных эффективно доставлять компонентный ген в клетки *in vivo*. Подходы включают вставку рассматриваемого гена в вирусные векторы, включая рекомбинантные ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и вирус простого герпеса-1 (HSV-1), или рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды. Вирусные векторы могут напрямую трансфицировать клетки; плазмидная ДНК может быть доставлена с помощью, например, катионных липосом (липофектин) или дериватизированных, полилизиновых конъюгатов, грамицидина S, искусственных вирусных оболочек или других подобных внутриклеточных носителей, а также прямого введения генной конструкции или преципитации CaPO₄ (см., например, WO04/060407). Примеры подходящих ретровирусов включают pLJ, pZIP, pWE и pEM, которые известны специалистам в данной области техники (см., например, Eglitis et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J Immunol* 150:4104-4115; патенты США №№ 4868116 и 4980286; и публикации РСТ №№ WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345 и WO92/07573). В другой системе доставки

вирусного гена используют векторы, полученные из аденовируса (см., например, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434 и Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). Подходящие аденовирусные векторы, полученные из штамма аденовируса Ad типа 5 dl324 или других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т. д.), известны специалистам в данной области техники. Еще одной вирусной векторной системой, пригодной для доставки гена субъекта, является аденоассоциированный вирус (AAV). См., например, Flotte et al. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J Virol* 63:3822-3828 и McLaughlin et al. (1989) *J Virol* 62:1963-1973.

[0204] В различных вариантах осуществления подкожное введение может осуществляться с помощью устройства, такого как шприц, предварительно заполненный шприц, автоинжектор (например, одноразовый или многоразовый), шприц-ручка, пластыревый иньектор, портативный иньектор, амбулаторный шприцевой инфузионный насос с наборами для подкожной инфузии или другого устройства для комбинирования с антителом для подкожной иньекции.

[0205] В иньекционной системе по настоящему изобретению может использоваться ручка для доставки, как описано в патенте США № 5308341. Шприц-ручка, наиболее часто используемые для самостоятельной доставки инсулина пациентам с диабетом, хорошо известны в данной области техники. Такие устройства могут содержать по меньшей мере одну иньекционную иглу (например, иглу 31-го размера длиной от 5 до 8 мм), обычно предварительно заполненную одной или несколькими терапевтическими разовыми дозами терапевтического раствора, и их можно использовать для быстрой доставки раствора к субъекту с минимально возможной болью. Одна ручка для доставки лекарств включает в себя держатель флакона, в который может быть помещен флакон с терапевтическим или другим лекарством. Ручка может быть полностью механическим устройством или может быть объединена с электронной схемой для точной установки и/или индикации дозировки лекарства, вводимого пользователю. См., например, патент США № 6192891. В некоторых вариантах осуществления игла шприц-ручки является одноразовой, и наборы включают одну или несколько сменных игл одноразового использования. Шприц-ручки, подходящие для доставки любой из представленных композиций, также описаны, например, в патенте США №№ 6277099; 6200296 и 6146361, описание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Шприц-ручка на основе микроиглы описана, например, в патенте США № 7556615, описание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также устройство Precision Pen Injector (PPI), MOLLY™, производства компании Scandinavian Health Ltd.

[0206] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, может быть терапевтически доставлена субъекту посредством местного введения. В контексте данного документа термины «местное введение» или «местная доставка» могут относиться к доставке, которая не зависит от переноса композиции или агента в предполагаемые целевые ткани или участок через сосудистую систему. Например, композицию можно доставлять путем инъекции или имплантации композиции или агента или путем инъекции или имплантации устройства, содержащего композицию или агент. В определенных вариантах осуществления после местного введения вблизи целевых тканей или участка композиция или агент, или один или более из их компонентов, могут диффундировать к предполагаемым целевым тканям или участку, которые не являются местом введения.

[0207] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе композиции представлены в виде единичной лекарственной формы, причем единичная лекарственная форма может подходить для самостоятельного введения. Такая единичная лекарственная форма может поставляться в контейнере, как правило, например, во флаконе, картридже, предварительно заполненном шприце или одноразовом шприце-ручке. Дозатор, такой как дозирующее устройство, описанное в патенте США №№ 6302855, также может быть использован, например, с системой инъекции, как описано в данном документе.

[0208] Подходящая доза композиции, описанной в данном документе, которая способна лечить или предотвращать расстройство у субъекта, может зависеть от множества факторов, включая, например, возраст, пол и массу тела субъекта, подлежащего лечению, и конкретное используемое соединение-ингибитор. Например, для лечения субъекта с расстройством, связанным с ADGRE2, может потребоваться другая доза одной композиции, включающей антитело, как описано в настоящем документе, по сравнению с дозой другого состава этого антитела. Другие факторы, влияющие на дозу, вводимую субъекту, включают, например, тип или тяжесть расстройства. Например, субъекту с одним расстройством, связанным с ADGRE2, может потребоваться введение другой дозы, чем субъекту с другим расстройством, связанным с ADGRE2. Другие факторы могут включать, например, другие медицинские расстройства, одновременно или ранее поражающие субъекта, общее состояние здоровья субъекта, генетическую предрасположенность субъекта, рацион питания, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных препаратов и любых других дополнительных терапевтических средств, которые вводятся субъекту. Также следует понимать, что конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного субъекта также могут быть скорректированы на

основании заключения лечащего врача.

[0209] Композицию, описанную в данном документе, можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе миллиграмм на килограмм (мг/кг). В некоторых вариантах осуществления доза также может быть выбрана для снижения или предотвращения выработки антител или других иммунных ответов хозяина против одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции. Хотя это никоим образом не предназначено для ограничения, примерные дозы антитела, такого как композиция, описанная в настоящем документе, включают, например, 1-1000 мг/кг, 1-100 мг/кг, 0,5-50 мг/кг, 0,1-100 мг/кг, 0,5-25 мг/кг, 1-20 мг/кг и 1-10 мг/кг. Примеры дозировок описанной в данном документе композиции включают, без ограничения, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4 мг/кг, 8 мг/кг или 20 мг/кг.

[0210] Фармацевтический раствор может содержать терапевтически эффективное количество описанной в данном документе композиции. Специалист в данной области техники может легко определить такие эффективные количества, частично на основании эффекта вводимой композиции или комбинированного эффекта композиции и одного или более дополнительных активных агентов, если используют более одного агента. Терапевтически эффективное количество композиции, описанной в настоящем документе, также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, а также способности композиции (и одного или нескольких дополнительных активных агентов) вызывать желаемый ответ у индивидуума, например, улучшение по меньшей мере одного параметра состояния, например, улучшение по меньшей мере одного симптома расстройства, связанного с ADGRE2. Например, терапевтически эффективное количество композиции, описанной в настоящем документе, может ингибировать (уменьшать тяжесть или устранять возникновение) и/или предотвращать конкретное расстройство и/или любой из симптомов конкретного расстройства, известных в данной области, или описанного в данном документе. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

[0211] Подходящие для человека дозы любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут быть дополнительно оценены, например, в исследованиях фазы I с повышением дозы. См., например, van Gorp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8):1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531 и Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

[0212] Токсичность и терапевтическую эффективность композиций можно определить с помощью известных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных (например, на животных моделях любых расстройств, связанных с ADGRE2). Эти процедуры можно использовать, например, для определения LD₅₀ (доза, смертельная для 50% популяции) и ED₅₀ (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Дозовое соотношение между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Композиция, описанная в данном документе, которая демонстрирует высокий терапевтический индекс, является предпочтительной. Хотя можно использовать композиции, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани и сводит к минимуму потенциальное повреждение нормальных клеток и, таким образом, уменьшает побочные эффекты.

[0213] Специалистам в данной области техники будет понятно, что данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы для определения диапазона дозировок для применения у людей. Соответствующие дозировки композиций, описанных в настоящем документе, обычно находятся в диапазоне циркулирующих концентраций композиций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой дозированной формы и используемого пути введения. Для композиции, описанной в настоящем документе, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена на основе анализов клеточных культур. Доза может быть составлена в животных моделях для достижения диапазона циркулирующей плазменной концентрации, который включает I₀ (т. е. концентрацию антитела, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз, пригодных для людей. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, например, когда желателно местное введение (например, в глаз или сустав), можно использовать клеточную культуру или моделирование на животных для определения дозы, необходимой для достижения терапевтически эффективной концентрации в локальном участке.

Комбинированная терапия

[0214] В различных вариантах осуществления антитело к ADGRE2, как описано в настоящем документе, может быть включено в курс лечения, который дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного агента. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом к ADGRE2, как описано в настоящем документе, может представлять собой химиотерапевтический агент. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом, как описано в настоящем документе, может представлять собой агент, ингибирующее воспаление.

[0215] В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) со специфичностью в отношении ADGRE2 человека. В некоторых вариантах осуществления scFv к ADGRE2 может быть конъюгирован (например, связан) с терапевтическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом и радиоактивным атомом) для связывания с раковой клеткой, доставки терапевтического агента в раковую клетку и уничтожения раковой клетка, которая экспрессирует ADGRE2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к ADGRE2 связано с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, цитокин, радиоактивный атом, миРНК или токсин. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой радиоактивный атом.

[0216] В некоторых вариантах осуществления способы можно применять в сочетании с другими видами терапии расстройств, связанных с ADGRE2. Например, композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после метода адоптивной терапии.

[0217] В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом к ADGRE2, как описано в настоящем документе, можно вводить одновременно с антителом к ADGRE2, в тот же день, что и антитело к ADGRE2, или в ту же неделю, что и антитело к ADGRE2. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом к ADGRE2, как описано в настоящем документе, может вводиться в одном составе с антителом к ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент вводят способом, временно отделенным от введения антитела к ADGRE2, как описано в настоящем документе, например, за один или несколько часов до или после, за один или несколько дней до или

после, за одну или несколько недель до или после или за один или несколько месяцев до или после введения антитела к ADGRE2. В различных вариантах осуществления частота введения одного или нескольких дополнительных агентов может быть такой же, аналогичной или отличной от частоты введения антитела к ADGRE2, как описано в настоящем документе.

[0218] В состав комбинированной терапии входит схема лечения, включающая введение двух различных антител, как описано в настоящем документе, и/или схема лечения, включающая введение антитела, как описано в настоящем документе, в виде множества составов и/или способов введения.

[0219] В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, например, дополнительными терапевтическими средствами для лечения или профилактики расстройства, связанного с ADGRE2 (например, рака или аутоиммунного расстройства), у субъекта. Дополнительные агенты для лечения расстройства, связанного с ADGRE2, у субъекта будут варьироваться в зависимости от конкретного расстройства, которое лечат, но могут включать, помимо прочего, ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон, осфамид, карбоплатин, этопозид, дексаметазон, цитарабин, цисплатин, циклофосфамид или флударабин.

[0220] Композиция, описанная в настоящем документе, может заменить или дополнить ранее или в настоящее время применяемую терапию. Например, при лечении композицией, описанной в настоящем документе, введение одного или нескольких дополнительных активных агентов может быть прекращено или уменьшено, например, может быть введено при более низких уровнях, например, при более низких уровнях эталонного антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2, после введения антитела к ADGRE2, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления можно поддерживать предыдущую терапию. В некоторых вариантах осуществления предыдущую терапию будут поддерживать до тех пор, пока уровень композиции не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Эти две терапии можно применять в комбинации.

Рекомбинантная генная технология

[0221] В соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы

традиционные методы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы описаны в литературе (см., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

[0222] Рекомбинантная экспрессия гена, такого как нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, такой как антитело к ADGRE2, описанное в настоящем документе, может включать конструирование вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид. После получения полинуклеотида вектор для продукции полипептида может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, известных в данной области техники. Известные способы можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие полипептид, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

[0223] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяин обычными методами, а затем трансфицированные клетки могут быть культивированы обычными методами для получения полипептидов.

[0224] Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. Кроме того, материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не носят ограничительного характера. Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании данного изобретения, подходящие способы и материалы описаны в данном документе.

ПРИМЕРЫ

[0225] В следующих примерах описываются некоторые из предпочтительных способов получения и применения настоящего изобретения. Однако следует понимать, что эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Идентификация и характеристика антител к ADGRE2

[0226] Настоящий пример демонстрирует получение и характеристику аффинности связывания антител к ADGRE2.

[0227] Антитела были разработаны с использованием технологии гибридом, включающей 24 гуманизованные последовательности мышинового клона Эталон 1. Антитела были выбраны на основе экспрессии в виде вариантов рекомбинантного белка, связывания с клетками EL4 мышинной лимфомы, сверхэкспрессирующих ADGRE2, как измерено с помощью FACS, и показателя иммуногенности, были выбраны 18 гуманизованных рекомбинантных антител, представляющих диапазон аффинности связывания ADGRE2.

Секвенирование антитела к ADGRE2 Эталон 1

[0228] Аминокислотную последовательность антитела к ADGRE2 Эталон 1 определяли путем расщепления эндопротеазой и последующего анализа пулов пептидов методом ЖХ-МС/МС. Вкратце, тяжелые и легкие цепи антитела разделяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях. После окрашивания кумасси синим соответствующие бэнды вырезали из геля и расщепляли с помощью Asp N, химотрипсином, трипсином и эндопептидазами эластазы. Кроме того, антитело расщепляли в растворе пепсином. Пул пептидов, полученных в результате расщепления, анализировали на анализаторе Orbitrap (ЖХ-МС/МС Q-Exactive, ThermoFisher). Данные ЖХ-МС/МС обрабатывали с использованием программного обеспечения для секвенирования антител PEAKS AB.

[0229] Последовательности, кодирующие VH и VL антитела к ADGRE2 Эталон 1, были получены из соответствующих последовательностей цепей антител и клонированы с константной областью IgG2. Рекомбинантное антитело Эталон 1 экспрессировали в клетках НЕК293, и очищенное антитело сравнивали с коммерчески доступным антителом Эталон 1 методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализ K_D с использованием рекомбинантно полученного белка, содержащего внеклеточный домен ADGRE2, а также определение EC50 проводили для связывания с клетками, экспрессирующими ADGRE2. Для последующего скрининга антител в качестве эталонного антитела использовали

очищенное рекомбинантное антитело Эталон 1.

Гуманизация переменных доменов антитела к ADGRE2 (EMRE2) Эталон 1

[0230] Была использована программа биоинформатики для прогнозирования конструирования для человека, называемая методом гуманизации Хома, включающая программное обеспечение «TSF Humanization». Программное обеспечение использует зародышевые линии базы данных Kabat для конструирования и гуманизации мышинового клона Эталон 1. Была создана панель вариантов человеческой последовательности, представляющая наилучшее совпадение(я) человеческой зародышевой линии из базы данных Kabat путем парного выравнивания последовательностей, для введения точечных аминокислотных мутаций в мышиную последовательность для «появления» в человеческой последовательности. Это осуществляли как для тяжелых, так и для легких цепей мышинового антитела, как показано на Фиг. 1 и 2. Исходное описание рекомендаций по гуманизации или конструированию для человека обсуждается в Руководстве пользователя программного обеспечения Хома и патенте США № US 5766886 А, полностью включенными в настоящий документ посредством ссылки.

Создание гуманизованных вариантов клона Эталон 1

[0231] Было выбрано лучшее совпадение зародышевой линии, и из выравнивания были извлечены определения CDR по Kabat. Каждую из них оценивали на предмет воздействия на связывание и воздействие растворителя, и, соответственно, выбирали «гуманизованную» последовательность. Также была выполнена двумерная проекция взаимосвязи последовательность-структура (Фиг. 3).

[0232] Типичный клон гуманизовали путем пересадки CDR самых больших CDR в зародышевую линию HC человека IGHV1-46*01 и зародышевую линию каппа IGKV3D-20*01. Для обеспечения большей гибкости пары HV/LC использовался более длинный линкер GS. В линкере использовали первые 3 аминокислоты константного домена HC, за которыми следовал стандартный линкер 3xGS (SEQ ID NO: 47): ASTGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 46).

Пример 2. Связывание антител к ADGRE2 на клетке

[0233] Этот пример иллюстрирует связывание антител к ADGRE2 на клетках, измеренное с помощью проточной цитометрии.

[0234] Связывание антител к ADGRE2 на клетках оценивали с помощью проточной цитометрии на клетках E4, сверхэкспрессирующих ADGRE2. Каждый из scFv тестировали

на связывание с ADGRE2 и сравнивали с mAb Эталон 1.

[0235] Вкратце, высевали 100 000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с V-образным дном, разводили scFv до 200 нМ scFv, затем последовательно разводили 1:4 до концентрации 0,01 нМ. Дозозависимое титрование scFv подтвердило фолдинг и связывание рекомбинантных scFv с ADGRE2.

[0236] Аффинность EC50 сравнивали, чтобы лучше интерпретировать любые различия, наблюдаемые *in vivo*, которые могли быть вызваны изменениями аффинности, возникающими в результате процесса гуманизации. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Prism с использованием четырехпараметрической регрессии.

[0237] Приблизительные значения EC50 были определены с использованием уравнения: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Hill-Slope}))}$, где подобранные параметры определяют следующим образом: «Bottom», нижнее плато, описывающее минимальное достигаемое связывание; «Top», верхнее плато, описывающее максимальное достигаемое связывание; LogEC50, точка перегиба кривой зависимости доза-ответ, также известная как концентрация, вызывающая полумаксимальный ответ; и «Hill-Slope» — наклон кривой зависимости доза-ответ.

[0238] **Таблица 1. Аффинность связывания scFv к ADGRE2**

scFv	Содержит соответствующую SEQ ID NO:	Аффинность (EC50 нМ)
A	22	16,4
B	20	55,3
E	15 и 16	10,6
K	19	93,8
M	17 и 18	16,4
N	21	53,2
Эталон 1		10,1

[0239] Как показано в Таблице 1, значения EC50, рассчитанные по кривым, показывают, что каждое из антител связывает клетки со аффинностью от 10,6 до 93,8.

[0240] В целом результаты показали, что протестированные гуманизированные scFv имели значения EC50, сравнимые со стандартом Эталона 1.

Пример 3. Анализ иммуногенности in silico

[0241] Этот пример иллюстрирует анализ иммуногенности *in silico*.

[0242] Вкратце, последовательности scFv мышинового Эталона 1 анализировали с гуманизированными scFv с помощью программного обеспечения для прогнозирования презентации МНС I и МНС II человека, основанного на различных базах данных прогнозирования IEDB, SMN-Align, NN-Align.

[0243] **Таблица 1. Иммуногенность антител к ADGRE2**

scFv	Содержит SEQ ID NO:	Иммуногенность		
		МНС I	МНС II	МНС I + МНС II
A	22	533	645	1178
B	20	686	876	1562
E	15 и 16	500	685	1185
K	19	647	995	1642
M	17 и 18	628	844	1472
N	21	643	941	1584
Эталон 1		886	1183	2069

[0244] Как показано в Таблице 2, иммуногенность антитела характеризовали на основании связывания МНС I или МНС II или связывания как с МНС I, так и с МНС II. В целом данные прогнозируют низкую иммуногенность для всех протестированных гуманизированных антител.

Пример 4. Панель анализа скрининга нецелевого связывания

[0245] Этот пример иллюстрирует специфичность scFv к ADGRE2 в анализе нецелевого связывания.

[0246] Вкратце, гуманизированные варианты scFv тестировали на нецелевое связывание. Три типовых клон scFv к ADGRE2 были подвергнуты «анализу с сокращением» для скрининга связывания более чем 3000 рецепторов человека. В анализе с сокращением чем выше связывание, тем выше вероятность реального взаимодействия. Как правило, совпадения с пометкой «V. слабые» вряд ли будут реальными взаимодействиями.

[0247] Результаты показали, что все протестированные клоны не показали какого-либо нецелевого связывания. Таким образом, было обнаружено, что эти клоны

высокоспецифичны в отношении ADGRE2.

Пример 5. Секвенирование клонов антитела к ADGRE2.

[0248] Антитела к ADGRE2 секвенировали, и последовательности CDR показаны в Таблице 3 (последовательности CDR тяжелой цепи) и Таблице 4 (последовательности CDR легкой цепи). Эти анализы подтвердили последовательности CDR гуманизированных антител.

[0249] Таблица 3. Последовательности CDR тяжелой цепи

Клон	Зародышевая линия	CDR1	CDR2	CDR3
К	IGHV1-46*01	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1)	VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2)	ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3)
В	IGHV1-2*02	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1)	VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2)	ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3)
Н	IGHV1-46*01	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1)	VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2)	ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3)
А	IGHV1-46*01	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1)	VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2)	ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3)

[0250] Таблица 4. Последовательности CDR легкой цепи

Клон №	Зародышевая линия	CDR1	CDR2	CDR3
А	IGKV3D-20*01	SSVSY (SEQ ID NO: 4)	DTS (SEQ ID NO: 5)	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6)

В	IGKV3D- 20*01	SSVSY (SEQ ID NO: 4)	DTS (SEQ ID NO: 5)	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6)
N	IGKV3D- 20*01	SSVSY (SEQ ID NO: 4)	DTS (SEQ ID NO: 5)	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6)
К	IGKV3- 11*01	SSVSY (SEQ ID NO: 4)	DTS (SEQ ID NO: 5)	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6)

Другие варианты осуществления

[0251] Хотя в данном документе описано несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, настоящее описание и примеры могут быть изменены для предоставления других способов и композиций данного изобретения. Поэтому следует понимать, что объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения в дополнение к конкретным вариантам осуществления, которые были представлены в качестве примера. Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTA VYYCARGFTA YGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 7), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRL LIYDTSK L ASGIPDRF S GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTA VYYCARGFTA YGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 9), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERV T MSCSASSSVSYMHWYQQK SGLSPKRWIYDTSK L ASGVPD RFSGSGSGTDYTF TISRMEPEDFA TYYCQQWSSNPLTFGGG T KLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTA VYYCARGFTA YGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 11), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERV T MSCSASSSVSYMHWYQQK SGLSPKRWIYDTSK L ASGVPD RFSGSGSGTDYTF TISRMEPEDFA TYYCQQWSSNPLTFGGG T KLEIK (SEQ ID NO: 12);
или

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSK LASGVPA RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSK LASGV PDR FSGSGSGTDYFTFTIRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16);

(f) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKL SCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRRWIYDTSK LASGV PD RFSGSGSGTDYFTFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 18);
или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLVQSGAEVAKPGASVKL SCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG

DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

2. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 7), и

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGAPRLIYDTSKLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 9), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 11), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12);

или

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTIRRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16);

(f) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRRWIYDTSKLASGVDP

RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18);

или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYFTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHYQQKSGQSPKRWIYDTSKSLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

3. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, содержащие:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность VYPGDGD (SEQ ID NO: 2), HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3); и

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6);

4. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к ADGRE2, или его фрагмент, выбраны из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fd'-фрагмента, Fd-фрагмента, изолированных CDR или их наборов; одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), слитого полипептид-Fc, однодоменного антитела, антитела верблюдовых; маскированного антитела, малого модульного иммунофармацевтического средства («SMIPs™»), одноцепочечного антитела, тандемного диатела, VHH, антикалина, нанотела, минитела, BiTE, белка с анкириновыми повторами,

DARPIN, авимера, DART, ТКР-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела; аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирина и KALBITOR.

5. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой моноклональное антитело или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

6. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой антитело, содержащее константную область IgG.

7. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

8. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п. 7, отличающиеся тем, что scFv содержит сигнальную последовательность, переменную последовательность тяжелой цепи, GS-линкер и переменную последовательность легкой цепи.

9. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 8, отличающиеся тем, что scFv содержит последовательность, по меньшей мере на около 80% идентичную:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLGASGVPARFSGSGGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY

PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
GQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQQKPGAPRLIYDTSKLAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

10. Гуманизированное антитело к ADGRE2, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 8, отличающиеся тем, что scFV содержит последовательность:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYW GQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM HWYQQKPLAPRLLIYDTSKSLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS NPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

11. Гуманизированное антитело к ADGRE2 по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что константа диссоциации (K_D) составляет менее около 10^{-8} М K_D , менее около 10^{-9} М K_D , менее около 10^{-10} М K_D , менее около 10^{-11} М K_D , менее около 10^{-12} М K_D или менее около 10^{-13} М K_D .

12. Гуманизированное антитело к ADGRE2 по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что EC50 составляет около 1-100 нМ.

13. Гуманизированное антитело к ADGRE2 по п. 12, отличающееся тем, что EC50 составляет около 10 - 95 нМ.

14. Гуманизированное антитело к ADGRE2 по п. 12, отличающееся тем, что EC50 составляет около 25 - 75 нМ.

15. Способ лечения рака, включающий введение гуманизированного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов.

16. Способ по п. 17, отличающийся тем, что рак выбран из лейкоза, лимфомы или миеломы.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, причем гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент антитела содержат:

(а) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 7), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPKGLAPRLLIYDTSKLASGIPDRF SGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 9), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 11), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

варибельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTFTIRLRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(f) варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 17), и

варибельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18);
или

(g) варибельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 30), и

варибельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 31).

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, отличающаяся тем, что гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент антитела содержат:

(a) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 7), и

переменную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGAPRLLIYDTSKLSASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 9), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLSASGVPD
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 11), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLSASGVPD
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT

LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(h) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASASSSVSYMHYQKPKGLSPKRWIYDTSKLASGVPDR
FSGSGSGTDYFTIRLRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(i) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFKQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHYQKPKGLAPRRWIYDTSKLASGVPD
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18);
или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную

последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHYQYQKSGQSPKRWIYDTSKSLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

19. Фармацевтическая композиция по п. 17 или п. 18, отличающаяся тем, что гуманизованное антитело к ADGRE2 или его фрагмент антитела содержат:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2), HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3); и

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6);

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 17-19, отличающаяся тем, что гуманизованное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент, выбрано из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fd'-фрагмента, Fd-фрагмента, изолированных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слитого полипептид-Fc, однодоменного антитела, антитела верблюдовых; маскированного антитела, малого модульного иммунофармацевтического средства («SMIPs™»), одноцепочечного антитела, tandemного антитела, VHH, антикалина, нанотела, минитела, BiTE, белка с анкириновыми повторами, DARPIN, авимера, DART, ТКР-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела, аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирина и KALBITOR.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 17-20, отличающаяся тем, что антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой моноклональное антитело или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, отличающаяся тем, что гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело, содержащее константную область IgG.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 17-22, отличающаяся тем, что гуманизованное антитело к ADGRE2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

24. Фармацевтическая композиция по п. 23, отличающаяся тем, что scFv содержит сигнальную последовательность, переменную последовательность тяжелой цепи, GS-линкер и переменную последовательность легкой цепи.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, по меньшей мере на около 80% идентичную:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPERVTMSCSASSVSYMHW
YQQKSGQSPKRWIYDTSKLSGVPARFSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPERVTMSCSASSVSYMHW
YQQKSGLSPKRWIYDTSKLSGVPDRFSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPERVTMSCSASSVSYMHW
YQQKSGLSPKRWIYDTSKLSGVPDRFSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG

GQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQQKPLAPRLLIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

26. Фармацевтическая композиция по п. 25, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPERVTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPERVTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPERVTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
GQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQQKPLAPRLLIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

27. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 7-18.

28. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по п. 27.

29. Выделенная клетка, содержащая вектор по п. 28.

30. Способ лечения рака, включающий введение гуманизированного антитела к ADGRE2 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, причем гуманизированное антитело к ADGRE2 содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTA VYYCARGFTA YGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 7), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRLLIYDTSK LASGIPDRF SGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTA VYYCARGFTA YGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 9), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSK LASGVDP RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTA VYYCARGFTA YGMDYWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 11), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSK LASGVDP

RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR FSGSGSGTDYFTIRRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(f) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична

EIVLTQSPATLSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRRWIYDTSKLASGVDP RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18);

или

(g) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSED TAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 30), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% идентична EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHYQYQKSGQSPKRWIYDTSKLSASGVPA RFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 31).

31. Способ лечения рака по п. 30, отличающийся тем, что гуманизованное антитело к ADGRE2 содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность QVQLQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSED TAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 7), и

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую аминокислотную последовательность EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQYQKPG LAPRLIYDTSKLSASGIPDRF SSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 8);

(b) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность QVQLQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDD TAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 9), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHYQYQKSGLSPKRWIYDTSKLSASGVPD RFSGSGSGTDYFTFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10);

(c) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 11), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную
последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVDP
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 12);

(d) вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую
аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAVYPGD
GDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVVSS (SEQ ID NO: 13), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную
последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 14);

(e) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую
аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
LTVVSS (SEQ ID NO: 15), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную
последовательность

QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASSSVSYMHWYQQKPGLSPKRWIYDTSKLASGVDPDR
FSGSGSGTDYFTIRRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16); или

(f) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую
аминокислотную последовательность

QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 17), и

вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную

последовательность

EIVLTQSPATLSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRRWIYDTSK LASGVPD
RFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18);

или

(g) переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую
аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVYPGDG
DTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSED TAVYYCARGFTAYGMDYWGQGT
TVVSS (SEQ ID NO: 30), и

переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную
последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSK LASGVPA
RFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 31).

32. Способ лечения рака по п. 30 или п. 31, отличающийся тем, что гуманизованное
антитело к ADGRE2 или его фрагмент антитела содержат:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую
аминокислотную последовательность GYTFTNYW (SEQ ID NO: 1), HCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность VYPGDGDT (SEQ ID NO: 2), HCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность ARGFTAYGMDY (SEQ ID NO: 3); и

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, содержащую
аминокислотную последовательность SSVSY (SEQ ID NO: 4), LCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность DTS (SEQ ID NO: 5), и LCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 6);

33. Способ лечения рака по любому из пп. 30-32, отличающийся тем, что
гуманизованное антитело к ADGRE2, или его антигенсвязывающий фрагмент,
представляет собой моноклональное антитело или одноцепочечный переменный
фрагмент (scFv).

34. Способ лечения рака по любому из пп. 30-33, отличающийся тем, что гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой антитело, содержащее константную область IgG.

35. Способ лечения рака по любому из пп. 30-34, отличающийся тем, что гуманизированное антитело к ADGRE2 или его фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

36. Способ лечения рака по п. 35, отличающийся тем, что scFv содержит лидерную последовательность, вариабельную последовательность тяжелой цепи, GS-линкер и вариабельную последовательность легкой цепи.

37. Способ лечения рака по п. 36, отличающийся тем, что scFv содержит последовательность, по меньшей мере на около 80% идентичную:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTSCSASSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTLTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSYM

HWYQQKPLAPRLLIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

38. Способ лечения рака по п. 37, отличающийся тем, что scFv содержит последовательность:

(a) QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGQSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19);

(b) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20);

(c) QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVY
PGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW
YQKSGLSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSN
PLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21); или

(d) QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAV
YPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWG
GQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYM
HWYQQKPLAPRLLIYDTSKLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSS
NPLTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22).

39. Способ лечения рака по любому из пп. 30-38, отличающийся тем, что рак выбран из лейкоза, лимфомы или миеломы.

40. Способ лечения рака по любому из пп. 30-39, отличающийся тем, что лечение включает введение одного или нескольких дополнительных агентов.

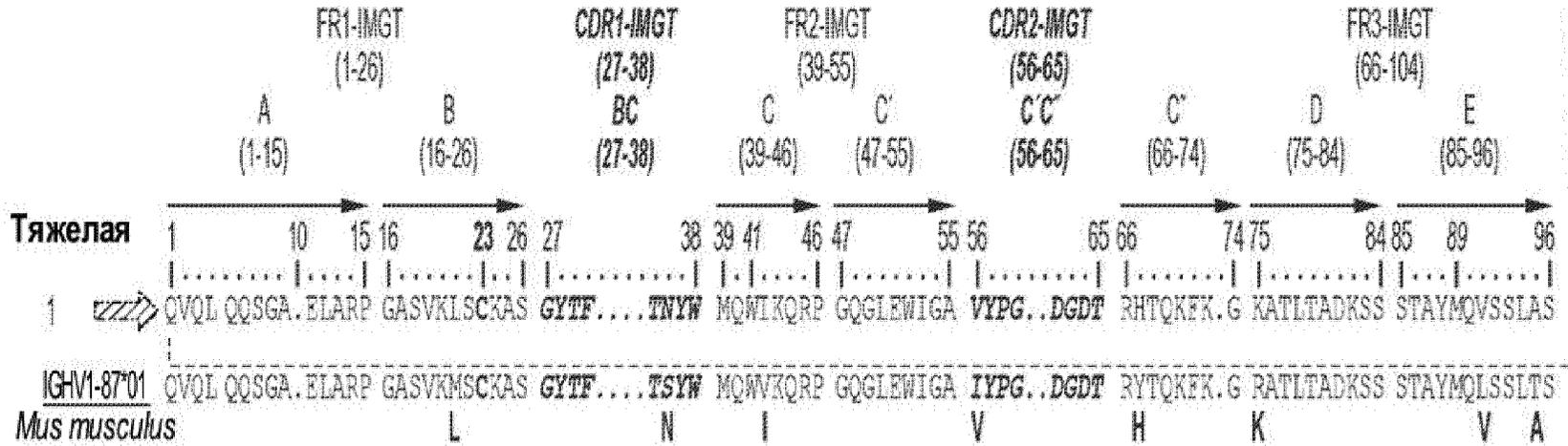
41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что один или несколько дополнительных агентов выбраны из антитела, химиотерапевтического средства или лучевой терапии.

		Кол-во измененных остатков от эталонной посл. мыши	Кол-во остатков, отличных от зародышевой линии или матр. консенсусной послед.
IGHV1-46*01	Зародышевая линия – низкий риск	9	17
	Зародышевая линия – LM-риск	15	11
	Зародышевая линия – LMH-риск	18	7
	Зародышевый трансплантат	26	0
IGHV1-3*01	Зародышевая линия, низкий риск	9	15
	Зародышевая линия, LM-риск	16	8
IGHV1-2*01	Зародышевая линия, низкий риск	11	12
	Зародышевая линия, LM-риск	17	6

ФИГ. 1

		Кол-во измененных остатков от эталонной посл. мышцы	Кол-во остатков, отличных от зародышевой линии или матр. консенсусной послед.
IGKV3D-20*01	Зародышевая линия – низкий риск	14	12
	Зародышевая линия – LM-риск	18	8
IGKV3-11*01	Зародышевая линия, низкий риск	13	12
	Зародышевая линия, LM-риск	17	8
IGKV6D-41-2	Зародышевая линия, низкий риск	11	5
	Зародышевая линия, LM-риск	14	2

ФИГ. 2

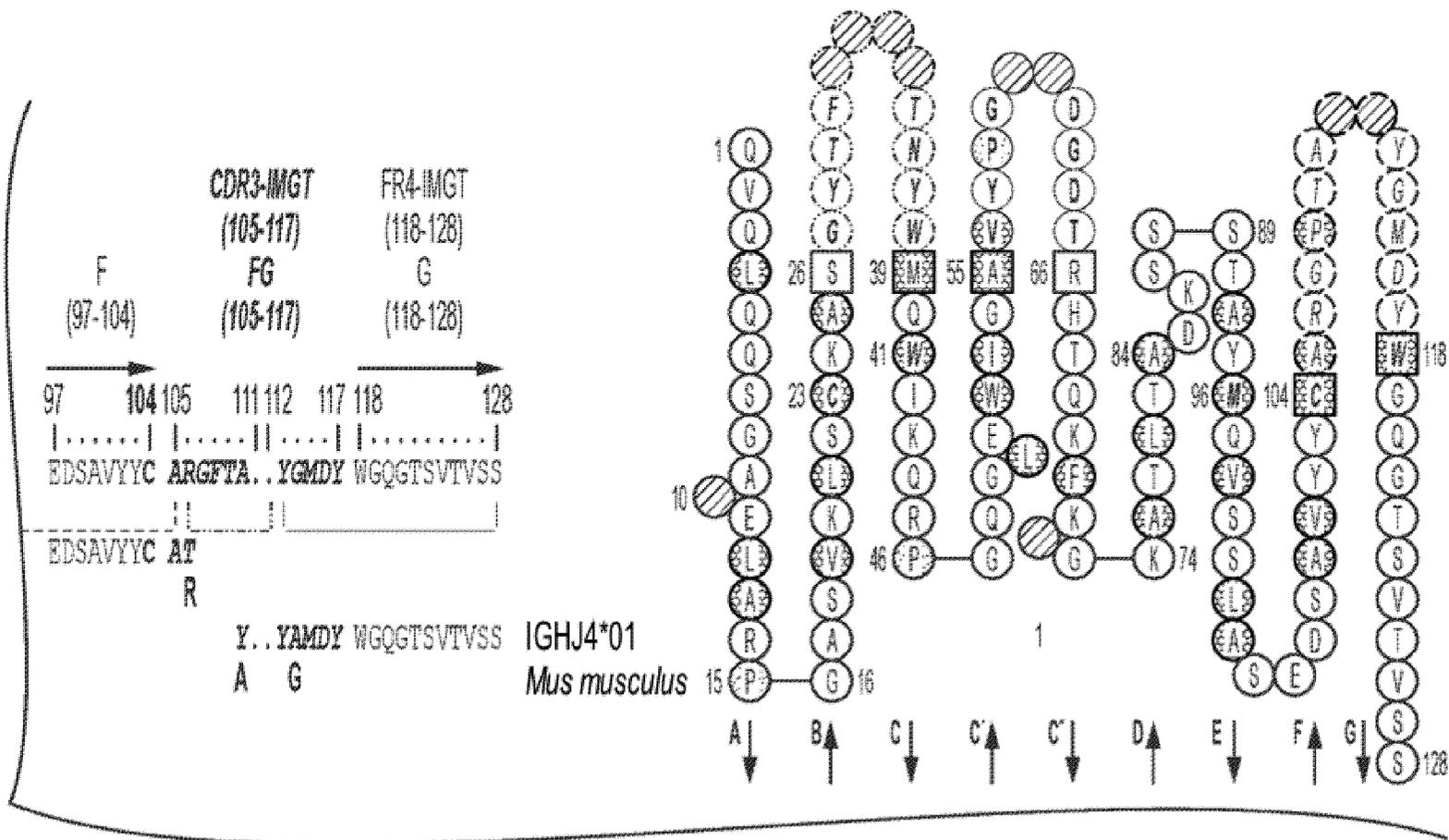


HA
ФИГ. 3-2

HA
ФИГ. 3-3

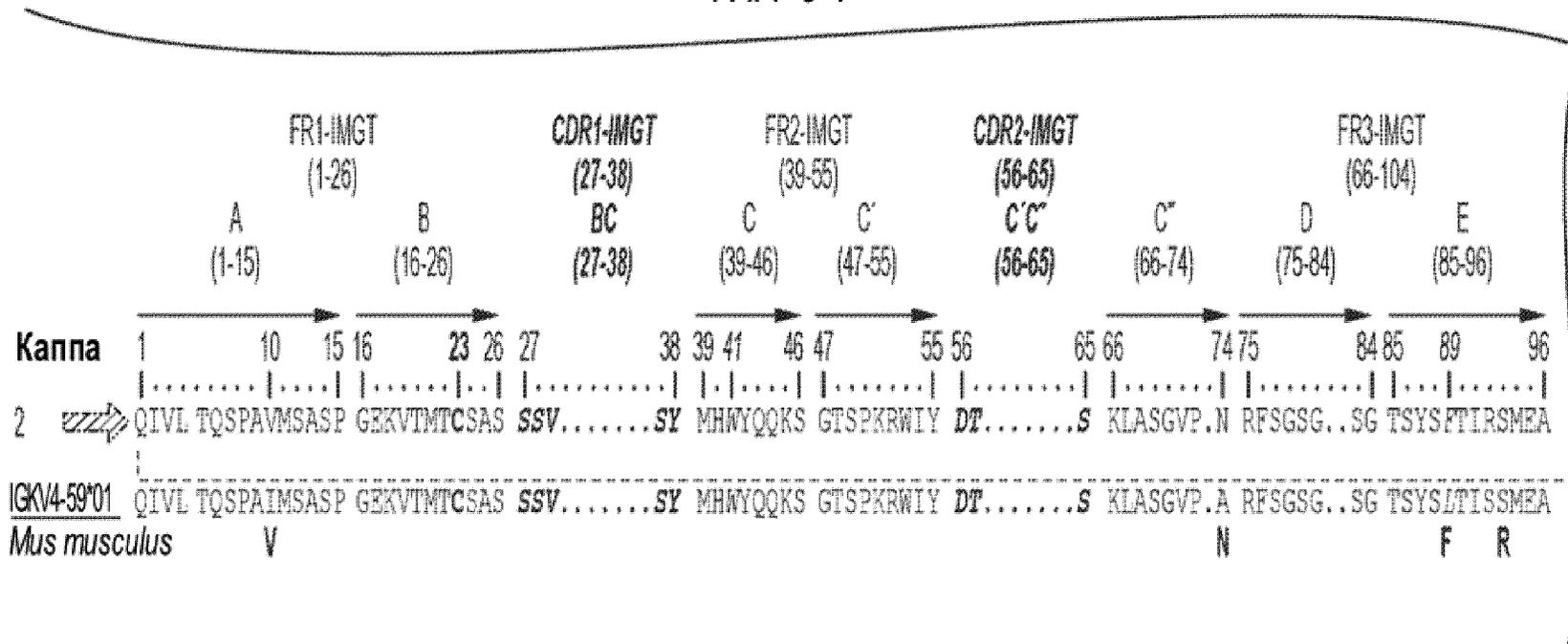
ФИГ. 3-1

от ФИГ. 3-1



на
 ФИГ. 3-4
 ФИГ. 3-2

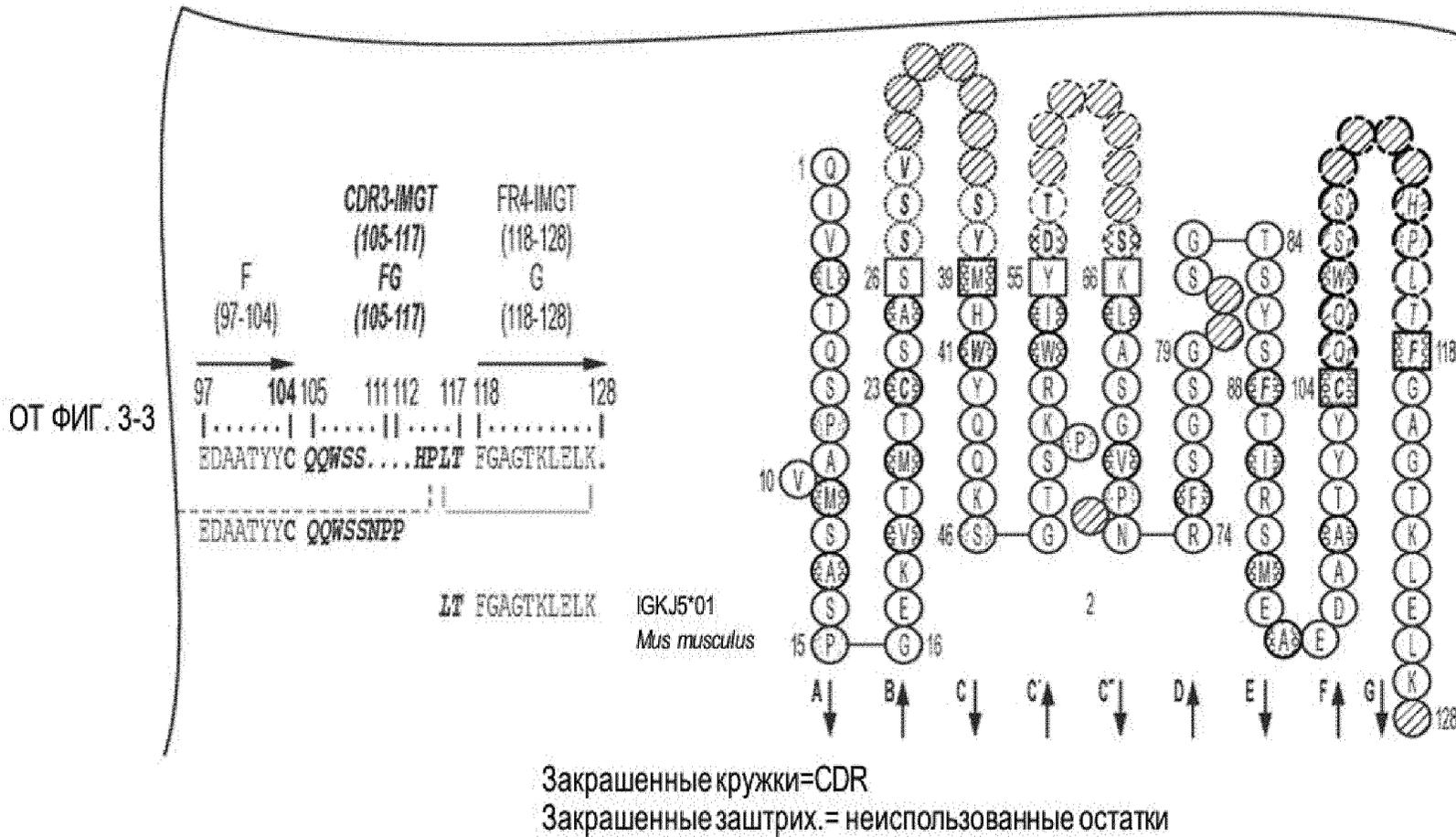
OT
ФИГ. 3-1



HA
ФИГ. 3-4

ФИГ. 3-3

ОТ ФИГ. 3-2



ФИГ. 3-4