

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392966** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

(51) Int. Cl. *E21B 33/05* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.13

(54) **АНТИ-CD24 КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/671,193**

(32) **2018.05.14**

(33) **US**

(62) **202092306; 2019.05.13**

(71) Заявитель:

**ОнкоСи4, ИНК.; ЧИЛДРЕН'С
РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ,
ЧИЛДРЕН'С НЕШНЛ МЕДИКАЛ
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:

**Лю Ян, Чжэн Пань, Флорес Ронда,
Чоу Хун-Янь, Сюэ Чжихун, Е Пэйин,
Девенпорт Мартин (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) В настоящем документе представлены анти-CD24 антитела, которые избирательно связывают человеческий CD24, экспрессируемый в раковых клетках, но не человеческий CD24, экспрессируемый в незлокачественных клетках, а также применение таких антител в терапии рака.

A1

202392966

202392966

A1

АНТИ-CD24 КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее раскрытие относится к анти-CD24 антителам, которые избирательно связывают человеческий CD24, экспрессируемый в раковых клетках, но не человеческий CD24, экспрессируемый в нераковых клетках. Раскрытие также относится к применению таких антител в лечении рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] CD24 представляет собой небольшой сильногликозилированный муцин-подобный белок клеточной поверхности, связанный с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI). CD24 экспрессируется на более высоких уровнях на гемопоэтических клетках, включая В-клетки, Т-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки и макрофаги, а также негемопоэтических клетках, включая нервные клетки, ганглиозные клетки, клетки эпителия, кератиноциты, мышечные клетки, клетки поджелудочной железы и эпителиальные стволовые клетки. В целом, CD24 имеет тенденцию экспрессироваться на более высоких уровнях в клетках-предшественниках и метаболически активных клетках и в меньшей степени в терминально дифференцированных клетках. Функция CD24 в большинстве типов клеток неясна, но сообщалось о различных иммунологических функциях CD24.

[0003] Хотя CD24 обнаружен во многих нормальных тканях и типах клеток, CD24 сверхэкспрессируется почти в 70 % случаев рака человека. Высокие уровни экспрессии CD24, детектируемые иммуногистохимическим методом, были обнаружены при эпителиальном раке яичников (83 %), раке молочной железы (85 %), немелкоклеточном раке легкого (45 %), раке простаты (48 %) и раке поджелудочной железы (72 %). CD24 - один из белков, наиболее сильно экспрессируемых в раковых клетках. Экспрессия CD24 повышается во время онкогенеза, что предполагает его роль в прогрессировании опухоли и метастазировании. Сверхэкспрессия CD24 при раке также была идентифицирована как маркер, указывающий на плохой прогноз и более агрессивное течение болезни для больных раком. При раке молочной железы экспрессия CD24 значительно выше при инвазивной карциноме, чем при доброкачественных или предраковых поражениях. При немелкоклеточном раке легкого экспрессия CD24 была идентифицирована как независимый маркер общей выживаемости пациента. Кроме того, при плоскоклеточном раке пищевода сверхэкспрессия CD24 свидетельствует о метастазировании опухоли в лимфатические узлы, высокой степени злокачественности опухоли, а также о сокращении времени выживания. Подобные наблюдения были обнаружены при многих других формах рака, включая рак

толстой кишки, гепатоцеллюлярную карциному, глиому, рак яичников и рак простаты. Хотя CD24 широко использовался в качестве маркера прогноза рака, он не использовался в качестве неоантигена, который может быть потенциальной мишенью для лечения рака, из-за его экспрессии на нормальных типах клеток и потенциальной токсичности.

[0004] Зрелый CD24 представляет собой небольшой высокогликозилированный сиалогликопротеин из 31 аминокислоты с 16 потенциальными сайтами O-гликозилирования и 2 предполагаемыми сайтами N-гликозилирования. Гликозилирование - одна из самых сложных посттрансляционных модификаций белков. Известно, что во многих раковых клетках происходит переключение с нормального пути гликозилирования, что приводит к изменению экспрессии гликанов и приводит к гипергликозилированию или гипогликозилированию многих клеточных белков. Измененные паттерны гликозилирования, обнаруженные в раковых клетках, являются результатом многих способствующих факторов, включая нарушение регуляции на уровне транскрипции, нарушение регуляции белков-шаперонов во время гликозилирования и изменение активности гликозидазы и гликотрансферазы. Связанные с опухолью изменения гликанов включают более длинное или более короткое разветвление N-гликанов, более высокую или более низкую плотность O-гликанов, образование усеченных версий нормальных аналогов (Tn, sTn и T-антигены) и образование необычных форм концевых структур с сиаловой кислотой и фукозой (эпитопы sLea и sLex).

[0005] Соответственно, в данной области техники существует потребность в улучшенных способах выявления и лечения рака, в частности в способах и композициях, способных отличать раковые клетки от незлокачественных.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем документе предложено моноклональное анти-CD24 антитело, связывание которого с CD24 блокируется гликозилированием, присутствующим в нормальных клетках, но не в раковых клетках. Антитело, ввиду этого, может связывать экранируемый гликаном эпитоп, который не экранирован на раковых клетках, но экранирован на незлокачественных клетках. Антитело может связывать пептид, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48.

[0007] В другом аспекте моноклональное антитело может связывать раковые клетки с минимальной реактивностью или без реактивности с клетками доброкачественной опухоли.

[0008] В другом аспекте моноклональное антитело может связывать опухолевые клетки с минимальной реактивностью или без реактивности с неопухолевыми клетками.

[0009] В другом аспекте моноклональное антитело может связывать циркулирующие раковые клетки с минимальной реактивностью или без реактивности с гемопозитическими клетками.

[0010] В другом аспекте моноклональное антитело не может связывать CD24 на клетках, лишенных специфических для рака паттернов гликозилирования, но может связывать CD24 на клетках с раковыми паттернами гликозилирования.

[0011] В другом аспекте композиция, которая может быть фармацевтической композицией, содержит моноклональное антитело или один или несколько его антигенсвязывающих фрагментов.

[0012] В другом аспекте композиция используется для уничтожения раковых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

[0013] В другом аспекте композиция используется для уничтожения раковых клеток посредством антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

[0014] В другом аспекте композиция используется для уничтожения раковых клеток посредством комбинации ADCC и ADCP.

[0015] В другом аспекте композиция содержит Т-клетку с химерным рецептором антигена, которая может быть использована для придания Т-клеткам специфичности к раковым клеткам.

[0016] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело 3B6.

[0017] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1 и 2.

[0018] В другом аспекте композиция содержит моноклональные антитела, полученные в результате созревания аффинности моноклонального антитела 3B6.

[0019] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, выбранную из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 3-10.

[0020] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее легкую цепь, выбранную из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 11-16.

[0021] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело PP6373, полученное в результате созревания аффинности моноклонального антитела 3B6.

[0022] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее последовательности, указанные в SEQ ID NO: 6 и 16.

[0023] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, полученное путем гуманизации моноклонального антитела PP6373.

[0024] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, выбранную из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 29-32.

[0025] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее легкую цепь, выбранную из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 33-36.

[0026] В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит моноклональное антитело H2L3, полученное путем гуманизации моноклонального антитела PP6373.

[0027] В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит моноклональное антитело H3L3, полученное путем гуманизации моноклонального антитела PP6373.

[0028] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее переменную последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35.

[0029] В другом аспекте композиция содержит моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33.

[0030] В другом аспекте композиция содержит одноцепочечное моноклональное антитело, содержащее последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17.

[0031] В другом аспекте композиция содержит биспецифическое антитело, содержащее первый домен антитела, включающий анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй домен антитела, включающий второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Биспецифическое антитело можно использовать для образования мостика между раковыми и иммунными эффекторными Т-клетками у пациента, нуждающегося в лечении или профилактике рака.

[0032] В другом аспекте второй домен антитела обладает специфичностью связывания, отличной от специфичности первого домена антитела.

[0033] В другом аспекте второй домен антитела привлекает иммунные эффекторные Т-клетки к раковым клеткам.

[0034] В другом аспекте второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3.

[0035] В другом аспекте второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает α -цепь TCR, β -цепь TCR, γ -цепь TCR или δ -цепь TCR.

[0036] В другом аспекте первый домен антитела включает антитело, содержащее последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, а второй домен антитела содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

[0037] В другом аспекте первый домен антитела включает антитело, содержащее любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 23-27 и 37-41.

[0038] В другом аспекте композиция, содержащая биспецифическое антитело, может использоваться для лечения раковых клеток за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

[0039] В другом аспекте композиция содержит биспецифическое антитело с повышенной активностью ADCC.

[0040] В другом аспекте композиция, содержащая биспецифическое антитело, используется для лечения раковых клеток за счет антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

[0041] В другом аспекте композиция, содержащая биспецифическое антитело, обладает повышенной активностью ADCP.

[0042] В другом аспекте композиция содержит химерный рецептор антигена для использования в иммунотерапии, причем указанный рецептор включает одноцепочечное антитело, содержащее любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1-36.

[0043] В другом аспекте химерный рецептор антигена используется в иммунотерапии, причем указанный рецептор включает одноцепочечное антитело, содержащее последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0044] В другом аспекте фармацевтическая композиция используется вместе со вторым противораковым лекарственным средством.

[0045] В настоящем документе предложен способ лечения рака у пациента, который в этом нуждается, включающий введение пациенту одного или нескольких из антител, биспецифических антител, химерных рецепторов антигена или композиций, описанных в настоящем документе, причем рак представляет собой рак легкого, рак печени, рак головного мозга, рак шейки матки, рак яичника, рак почки, рак яичка, рак простаты или нейроblastому. Рак может связываться с композицией анти-CD24 антитела, описанной в данном документе.

[0046] Кроме того, в настоящем документе предлагается способ диагностики злокачественной ткани или метастатического поражения с использованием композиции анти-CD24 антитела. Композиция анти-CD24 антитела может связывать злокачественную ткань или метастатическое поражение на уровне выше пороговой величины, что может указывать на злокачественную ткань или метастатическое поражение.

[0047] В настоящем документе также раскрыт способ идентификации циркулирующих раковых клеток с использованием композиции анти-CD24 антитела. Композиция анти-CD24 антитела может связывать циркулирующие раковые клетки на уровне выше пороговой величины, что может указывать на циркулирующие раковые клетки. Кроме того, в настоящем документе предусмотрено применение описанной здесь композиции в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, описанного в данном документе.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0048] **Фиг. 1.** Столбчатая диаграмма результатов ELISA (иммуоферментный анализ), показывающая, что связывание моноклонального анти-CD24 антитела 3В6 затруднено присутствием гликана, тогда как связывание коммерчески доступного моноклонального анти-CD24 антитела ML5 - нет. 3В6 прочно связывает CD24, лишенный модификаций N-гликаном и сиаловой кислотой (N-SA-CD24), и CD24, лишенный модификаций N-гликаном, сиаловой кислотой и O-гликаном (N-SA-O-CD24), но связывает очень слабо как CD24, лишенный модификаций N-гликаном (N-CD24), так и полностью модифицированный (модификации N-гликаном + сиаловой кислотой + O-гликаном) CD24. CD24GST представляет собой отрицательный контроль, слитый белок CD24-GST.

[0049] **Фиг. 2А-В.** Анализы связывания показывают, что 3В6 связывает клеточные линии нейробластомы и медуллобластомы. **Фиг. 2А.** Нормализованные графики аффинности моноклональных анти-CD24 антител ML5, 3В6 и SN3 и контрольного антитела, протестированных против 6 линий клеток нейробластомы, IMR32, SK-N-SH, SH-SY5Y, SK-N-BE(2), SK-N-AS и SK-N-BE(2)C. Хотя 3В6 имеет некоторую аффинность ко всем линиям клеток нейробластомы, кроме SK-N-AS, аффинность 3В6 была значительно ниже по сравнению с коммерчески доступными анти-CD24 антителами ML5 (BD Bioscience Cat#555426) и SN3 (Thermo Fisher Cat#MA5-11833). **Фиг. 2В.** Флуоресцентное изображение результатов обработки 4 медуллобластом с помощью 3В6. 3В6 связало 3 из 4 опухолей.

[0050] **Фиг. 3.** График конкурентного ELISA, сравнивающего способность вариантов 3В6 блокировать связывание 3В6 со слитым белком CD24-GST. PP6226 имеет ту же переменную область, что и 3В6.

[0051] **Фиг. 4.** График конкурентного ELISA, сравнивающего варианты 3В6 по их способности блокировать связывание 3В6 со слитым белком CD24-GST. PP6226 имеет ту же переменную область, что и 3В6.

[0052] Фиг. 5. График конкурентного ELISA, сравнивающего варианты 3B6 по их способности блокировать связывание 3B6 со слитым белком CD24-GST. PP6226 имеет ту же переменную область, что и 3B6.

[0053] Фиг. 6. Столбчатая диаграмма результатов ELISA, показывающая относительную аффинность химерных анти-CD24 антител с созревшей аффинностью к CD24, экспрессируемому клетками CHO (яичника китайского хомячка). Двенадцать клонов показали повышенную аффинность и различную специфичность в отношении полностью гликозилированного CD24, N-CD24, SA-CD24 и N-SA-CD24 по сравнению с 3B6 (PP6226).

[0054] Фиг. 7. Анализ титрования различных химерных анти-CD24 антител с созревшей аффинностью, протестированных против линии клеток рака легкого NCI-H727 (левая панель) и линии клеток нейробластомы IMR32 (правая панель). Максимальная протестированная концентрация антител составляла 5 мкг/мл с коэффициентом титрования $2\times$ до минимальной концентрации 0,01 мкг/мл. Также показан неокрашенный (0 мкг/мл) отрицательный контроль.

[0055] Фиг. 8. Количественное сравнение связывания между различными гликоформами CD24 и анти-CD24 антителами: исходный PP6229 против PP6373 с созревшей аффинностью. CD24 с удаленным Fc (кристаллизующийся фрагмент) наносили на планшет для ELISA и затем обрабатывали либо буфером (CD24), либо NanA (SA-), либо NanA+N-гликаназой (SA-N-) перед добавлением заданных доз PP6226 (левая панель) или PP6373 (правая панель). Максимальная испытанная концентрация составляла 7812,50 нг/мл с коэффициентом титрования $5\times$ до минимальной концентрации 0,02 нг/мл.

[0056] Фиг. 9. Картирование сайта связывания 3B6 с помощью анализа ингибирования пептидов. Из пяти протестированных перекрывающихся пептидов CD24 только один (пептид 4) содержит антигенный эпитоп.

[0057] Фиг. 10. Картирование сайта связывания PP6373 с помощью анализа ингибирования пептидов. Из пяти протестированных перекрывающихся пептидов CD24 только один (SNSGLAPNT (SEQ ID NO: 46)) содержит антигенный эпитоп.

[0058] Фиг. 11. Картирование эпитопа PP6373 с усеченными пептидами из последовательности антигенного эпитопа пептида 4. Данные показывают, что оптимальный эпитоп содержится в последовательности SNSGLAPN (SEQ ID NO: 48).

[0059] Фиг. 12. График, показывающий, что PP6373 снижает рост опухоли *in vivo* на мышинной модели. Голые мыши с пальпируемым ксенотрансплантатом рака легкого получали

либо контрольный человеческий IgG, либо PP6373 в двух временных точках, указанных стрелками, после чего рост опухолей еженедельно измеряли.

[0060] Фиг. 13. График, показывающий индуцированную PP6373 клеточную цитотоксичность (ADCC) против линии раковых клеток человека H727. Клетки H727 совместно инкубировали с эффекторными клетками PBL с PP6373 и человеческим IgG FC при 5 мкг/мл, индуцировавшими ADCC.

[0061] Фиг. 14. График, показывающий, что PP6373 без фукозилирования ядра (d6873) индуцирует более высокую ADCC против линии раковых клеток человека H727, чем PP6373. Клетки H727 совместно инкубировали с эффекторными клетками PBL с d6373, PP6373 и человеческим FC IgG при 5 мкг/мл, индуцировавшими ADCC.

[0062] Фиг. 15. Графики проточной цитометрии, показывающие, что комбинация PP6373-впадина и ОКТЗ-выступ показывает более высокую биспецифичность, чем PP6373-выступ и ОКТЗ-впадина. Клетки Jurkat окрашивали супернатантами тканевых культур клеток 293Т, трансфицированных PP6373, ОКТЗ, PP6373-выступ и ОКТЗ-впадина или PP6373-впадина и ОКТЗ-выступ, с последующей инкубацией с биотинилированным белком SA-N-CD24. Сигнал PE-стрептавидин (фикоэритрин-стрептавидин) измеряли с помощью проточной цитометрии. Было проведено три независимых эксперимента.

[0063] Фиг. 16. Графики проточной цитометрии, показывающие, что PP6373-ОКТЗ индуцирует более высокую биспецифическую активность, чем ОКТЗ-PP6373. Клетки Jurkat окрашивали супернатантами тканевых культур клеток 293Т, трансфицированных пустой плазмидой (отрицательный контроль), PP6373-ОКТЗ или ОКТЗ-PP6373, с последующей инкубацией с биотинилированным белком SA-N-CD24. Сигнал PE-стрептавидин измеряли с помощью проточной цитометрии. Было проведено три независимых эксперимента.

[0064] Фиг. 17. График проточной цитометрии, показывающий, что биспецифическое антитело PP6373-ОКТЗ обладает противоопухолевой активностью. Клетки рака легких H727 и активированные человеческие Т-клетки инкубировали в соотношении 1:5 с супернатантами тканевых культур необработанных клеток 293Т или трансфицировали пустой плазмидой (нетрансфицированные), PP6373, ОКТЗ, PP6373-ОКТЗ в течение 12 часов. Цитокины (IFN γ , TNF, IL10, IL6, IL4 и IL2) в средах тканевых культур измеряли с помощью проточной цитометрии. Было проведено три независимых эксперимента.

[0065] Фиг. 18. График проточной цитометрии, показывающий, что биспецифическое антитело PP6373-ОКТЗ индуцировало цитотоксичность опухолевых клеток Т-клетками. Клетки рака легких H727 и активированные человеческие Т-клетки инкубировали в

соотношении 1:5 с супернатантами тканевых культур необработанных клеток 293Т или трансфицированных пустой плазмидой (нетрансфицированные), PP6373, ОКТ3, PP6373-ОКТ3 в течение 12 часов. Клетки рака легких и человеческие Т-клетки собирали и окрашивали античеловеческим CD45 и реагентом Aqua Live/Dead. Количество опухолевых клеток было нанесено на график как дважды негативное по анти-CD45 и Aqua. Было проведено три независимых эксперимента.

[0066] Фиг. 19. Анализ высокой биспецифической активности, индуцированной FIT-Ig с помощью проточной цитометрии. Клетки Jurkat окрашивали отрицательным контролем (нетрансфицированный супернатант 293Т) или FIT-Ig с последующей инкубацией с биотинилированным белком SA-N-CD24. Сигнал PE-стептавидин измеряли с помощью проточной цитометрии. Было проведено три независимых эксперимента.

[0067] Фиг. 20. Анализ с помощью проточной цитометрии показывает, что FIT-Ig имеет более высокую противоопухолевую активность, чем PP6373-ОКТ3 и ОКТ3-PP6373. Клетки рака легкого H727 и активированные Т-клетки человека инкубировали в соотношении 1:5 с отрицательным контролем (нетрансфицированный супернатант 293Т), PP6373-ОКТ3, ОКТ3-PP6373 или FIT-Ig в течение 12 часов. Цитокины (IFN γ , TNF, IL10, IL6, IL4 и IL2) в средах тканевых культур измеряли с помощью проточной цитометрии. Было проведено три независимых эксперимента.

[0068] Фиг. 21. Анализ с помощью проточной цитометрии показывает, что FIT-Ig индуцирует цитотоксичность опухолевых клеток Т-клетками. Клетки рака легкого H727 и активированные Т-клетки человека инкубировали в соотношении 1:5 с отрицательным контролем (нетрансфицированный супернатант 293Т), PP6373-ОКТ3, ОКТ3-PP6373 или FIT-Ig в течение 12 часов. Клетки рака легких и человеческие Т-клетки собирали и окрашивали античеловеческим CD45 и реагентом Aqua Live/Dead. Количество опухолевых клеток было нанесено на график как дважды негативное по анти-CD45 и Aqua. Было проведено три независимых эксперимента.

[0069] Фиг. 22. Анализ с помощью проточной цитометрии показывает, что FIT-Ig имеет более высокую термическую стабильность, чем PP6373-ОКТ3 и ОКТ3-PP6373. Все биспецифические антитела PP6373-ОКТ3, ОКТ3-PP6373 и FIT-Ig инкубировали при указанной температуре в течение 20 минут, а супернатанты после центрифугирования при 14000g в течение 5 минут использовали для окрашивания клеток Jurkat. Затем биотинилированный белок SA-N-CD24 инкубировали с клетками Jurkat, и сигнал PE-стептавидин измеряли с помощью проточной цитометрии.

[0070] **Фиг. 23.** Схема конструкции CarT, содержащей анти-CD24-scFv.

[0071] **Фиг. 24.** График цитотоксичности, индуцированной CD24 CART, для линии клеток рака легкого A549.

[0072] **Фиг. 25.** График активации CART линией опухолевых клеток, о чем свидетельствует продуцирование IFN γ .

[0073] **Фиг. 26.** Столбчатая диаграмма противоопухолевой активности CD24 CART против различных типов опухолей. Соотношение E/T для представленных данных равно 5.

[0074] **Фиг. 27.** Ленточная диаграмма трехмерного структурного выравнивания химерного PP6373 (FR: белый, CDR: светло-серый) и huVHv1VLv1 (FR: серый, CDR: темно-серый).

[0075] **Фиг. 28.** График относительной эффективности различных пар антител по экспрессии и связыванию CD24-GST.

[0076] **Фиг. 29.** График связывания H2L3 и H3L3 с линиями раковых клеток человека NCI-H727 (вверху) и IMR32 (внизу). Показанные данные представляют собой среднюю интенсивность флуоресценции при использовании широкого диапазона антител.

[0077] **Фиг. 30.** Графики гибели клеток показывают, что при низкой концентрации HL33 более эффективен, чем PP6373, в ADCC. В качестве мишени использовали линию клеток рака легкого A549, а в качестве эффекторов использовали PBL человека. Используемая доза антител составляла 3 мкг/мл (верхняя панель) или 9 мкг/мл (нижняя панель).

[0078] **Фиг. 31.** Графики гибели клеток показывают, что H3L3 придает сильную активность ADCC по отношению к множеству линий опухолевых клеток, включая линии клеток рака легкого A549 и NCI-H727 и линию клеток нейробластомы IMR-32. Человеческие PBMC (моноклеарные клетки периферической крови) использовали в качестве эффекторных клеток.

[0079] **Фиг. 32.** Графики гибели клеток показывают, что H3L3 придает сильную активность ADCC множеству линий опухолевых клеток, включая линии клеток рака легкого A549 и NCI-H727 и линию клеток нейробластомы IMR-32. NK-клетки (естественные киллеры), очищенные из PBMC человека, используются в качестве эффекторных клеток.

[0080] **Фиг. 33.** Анализ с помощью проточной цитометрии показывает, что антитела, распознающие экранируемый гликаном эпитоп, не распознают B-клетки, эритроциты и плохо взаимодействуют с нейтрофилами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0081] Нацеливание на эпитопы, экспрессируемые раком, является широко применяемым подходом к лечению рака. Однако многие такие эпитопы не являются хорошими мишенями

для лекарств, потому что они также экспрессируются в нормальных тканях, что может привести к проблемам токсичности. Идеальный опухолевый специфический антиген (TSA) должен иметь высокую экспрессию в опухоли, но минимальную экспрессию или отсутствие экспрессии в важных органах хозяина. Атрибуты менее идеальных, но в равной степени работоспособных TSA — это те, которые экспрессируются, но по-разному модифицируются в нормальных и раковых тканях, так называемые опухолевые антигены (TAA). Примерами хорошо охарактеризованных опухолевых антигенов являются MAGE-A3, MUC-1 и NY-ESO 1.

[0082] Выявление новых TSA и TAA является ограничивающим фактором в разработке новых или более эффективных средств лечения рака, особенно тех видов рака, для которых в настоящее время не существует опухолевых антигенов. CD24 является хорошей мишенью для рака по следующим причинам: он чрезмерно экспрессируется более чем в 70 % всех раковых заболеваний человека и дифференциально гликозилирован при раке, он, по-видимому, является онкогеном и связан с плохим прогнозом при различных раковых заболеваниях и значительно более короткой продолжительностью выживаемости пациентов, и он является маркером раковых стволовых клеток, которые могут вызвать рецидив и метастазирование, давая начало новым опухолям. Авторы изобретения обнаружили анти-CD24 антитела, связывание которых с CD24 блокируется гликозилированием, которое происходит в нормальных клетках, но не в раковых. В результате антитела связываются с клетками раковых линий и раковыми тканями, но с минимальной реактивностью по отношению к множеству нормальных тканей и гемопоэтических клеток.

[0083] В настоящем документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Антитело может представлять собой моноклональное антитело, человеческое антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. Антитело может быть моноспецифическим, биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может иммуноспецифично связывать CD24, и, в частности, человеческий CD24, предпочтительно экспрессируемый на поверхности живой клетки в эндогенной или трансфицированной концентрации. Антигенсвязывающий фрагмент может связывать CD24. Антитело может быть помечено детектируемой меткой или может включать конъюгированный токсин, лекарственное средство, рецептор, фермент или лиганд рецептора.

[0084] В дополнение к прямому нацеливанию на опухоль иммунная система обладает способностью распознавать и устранять рак в экспериментальных модельных системах и у

пациентов. В результате иммунотерапия рака становится одной из самых многообещающих областей терапии рака. Активная иммунотерапия рака включает агенты, которые усиливают естественные иммунные ответы (включая антитела против PD-1, PD-L1 или CTLA-4); биспецифические молекулы, такие как антитела, которые образуют мостик между раковыми и иммунными эффекторными Т-клетками; или адаптивный перенос клеток (АСТ) с использованием *ex vivo* стимулированных лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), активированных естественных киллеров (NK) или генно-инженерных Т-клеток (Т-клетки, модифицированные химерными рецепторами антигена (CAR) и Т-клеточными рецепторами (TCR)). Многие из этих технологий требуют наличия компонента нацеливания на опухоль для специфичности и эффективности.

1. Определения

[0085] Используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не должна интерпретироваться ограничительно. Используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также обозначают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Слово «около» («примерно», «приблизительно») в сочетании с числовым значением обозначает разумное приближение к этому значению. В некоторых случаях «около» может быть истолковано как находящееся в пределах 10 % от конкретного значения, с которым оно употреблено.

Например, фраза «около 100» может охватывать любое значение от 90 до 110.

[0086] При перечислении числовых диапазонов в данном документе явно полагается рассмотрение каждого промежуточного числа внутри диапазона с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона 6-9 числа 7 и 8 полагаются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 - явным образом полагаются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

[0087] «Лечение» или «лечить» применительно к защите животного от болезни означает предотвращение, супрессию, репрессию или полное устранение болезни. Предотвращение заболевания включает введение композиции согласно раскрытию животному до начала заболевания. Супрессия заболевания включает введение композиции согласно раскрытию животному после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Репрессия заболевания включает введение композиции по раскрытию животному после клинического проявления заболевания.

[0088] Используемый здесь термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая обладает сайтом распознавания антигена «вариабельной

области». Термин «вариабельная область» предназначен для отличия такого домена иммуноглобулина от доменов, которые широко распространены среди антител (таких как домен Fc антитела). Вариабельная область включает «гипервариабельную область», остатки которой отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки «области, определяющей комплементарность» или «CDR» (то есть, как правило, остатки приблизительно в позициях 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельной области легкой цепи и остатки приблизительно в позициях 27-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельной области тяжелой цепи) и/или остатках «гипервариабельной петли» (т. е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельной области легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельной области тяжелой цепи). Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой те остатки вариабельной области, которые отличаются от остатков гипервариабельной области, как определено здесь. Термин антитело включает моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, антитела семейства верблюдовых, одноцепочечные антитела, дисульфидно-связанные Fv (sdFv), интратела и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id и анти-анти-Id антитела к антителам по изобретению). В частности, такие антитела включают молекулы иммуноглобулинов любого типа (например IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса.

[0089] Используемый здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одной или нескольким частям антитела, которые содержат CDR антитела и, необязательно, каркасные остатки, которые составляют сайт распознавания антигена «вариабельной области» антитела и проявляют способность к иммуноспецифическому связыванию антигена. Такие фрагменты включают Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный фрагмент (ScFv) и их мутанты, встречающиеся в природе варианты и слитые белки, содержащие сайт распознавания антигена «вариабельной области» антитела и гетерологичный белок (например, токсин, сайт распознавания антигена для другого антигена, фермент, рецептор или лиганд рецептора и т. д.). Используемый здесь термин «фрагмент» относится к пептиду или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, состоящую по меньшей мере из 5 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 смежных аминокислотных

остатков, по меньшей мере 40 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 смежных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 смежных аминокислотных остатков.

[0090] Человеческие, химерные или гуманизированные антитела особенно предпочтительны для использования *in vivo* у людей, однако мышинные антитела или антитела других видов могут быть успешно использованы для многих применений (например, анализы обнаружения *in vitro* или *in situ*, применение в острый период *in vivo* и т. д.).

[0091] «Химерное антитело» представляет собой молекулу, в которой разные части антитела происходят из разных молекул иммуноглобулина, такую как антитела, имеющие переменную область, полученную из нечеловеческого антитела, и константную область иммуноглобулина человека. Химерные антитела, содержащие одну или несколько CDR из нечеловеческих видов и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека, могут быть получены с использованием множества методик, известных в данной области, включая, например, трансплантацию CDR (EP 239,400; Международная публикация № WO 91/09967; и патенты США №№ 5,225,539, 5,530,101 и 5,585,089; содержание каждого из этих документов полностью включено в настоящий документ), венирование (*veneering*) или перекладку переменного домена (*resurfacing*) (EP 592,106; EP 519,596, содержание каждого из этих документов включено в настоящий документ путем ссылки) и перестановки цепей (*chain shuffling*) (патент США № 5,565,332, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0092] Используемый здесь термин «гуманизированное антитело» относится к иммуноглобулину, содержащему каркасную область человека и одну или несколько CDR из нечеловеческого (обычно мышинового или крысиного) иммуноглобулина. Иммуноглобулин нечеловеческого происхождения, из которого берутся CDR, называется «донором», а иммуноглобулин человека, из которого берется каркас, называется «акцептором».

Постоянные области не обязательно должны присутствовать, но если они есть, они должны быть по существу идентичны константным областям человеческого иммуноглобулина, то

есть идентичны по меньшей мере примерно на 85-90 %, предпочтительно примерно на 95% или более. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим частям последовательностей природного иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело — это антитело, включающее иммуноглобулин с гуманизированной легкой цепью и гуманизированной тяжелой цепью. Например, гуманизированное антитело не будет включать типичное химерное антитело, потому что, например, вся переменная область химерного антитела является нечеловеческой. Донорское антитело может называться «гуманизированным» в процессе «гуманизации», поскольку ожидается, что полученное гуманизированное антитело будет связываться с тем же антигеном, что и донорское антитело, из которого взяты CDR. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентные антитела), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области из нечеловеческого вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающую способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации осуществляются для дальнейшего улучшения характеристик антител. В общем, гуманизированное антитело будет включать по существу всю последовательность по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все гипервариабельные области соответствуют таковым иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или практически все FR являются последовательностями человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также может включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило иммуноглобулина человека, который иммуноспецифически связывается с полипептидом FcγRIIIb, который был изменен путем введения замен, делеций или добавлений аминокислотных остатков (т. е. мутаций).

2. Композиции анти-CD24 антител

[0093] В данном документе описывается анти-CD24 антитело, которое может специфически нацеливаться на специфичную для рака гликоформу CD24. Анти-CD24 антитело можно использовать для разработки средств лечения рака, включая, но не ограничиваясь ими: конъюгаты антитело-лекарственное средство, терапевтические антитела с усилением ADCC,

биспецифические антитела, CAR-T-терапии и TCR-терапии. В частности, анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с экранируемым гликаном эпитопом, который не экранирован на раковых клетках, но экранирован на незлокачественных клетках. В частности, анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с пептидом CD24, содержащим аминокислотную последовательность SNSGLAPN (SEQ ID NO: 48).

[0094] Анти-CD24 антитело может представлять собой 3B6, которое может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть версией 3B6 с созревшей аффинностью и может включать переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 3-10, и переменную область легкой цепи, содержащую любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 11-16. Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой PP6373, которое может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16. Для терапевтического применения у людей анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть гуманизированной версией PP6373 и может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 29-32, и переменную область легкой цепи, содержащую любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 33-36. В частности, гуманизированное анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой H2L3, которое может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35; или может представлять собой H3L3, которое может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35.

3. Композиции конъюгата антитело-лекарственное средство

[0095] Нацеленное на опухоль антитело можно использовать для предотвращения или ограничения роста опухолей, непосредственно влияя на биологию опухоли. Например, гуманизированное моноклональное анти-VEGF антитело (бевацизумаб; Авастин) блокирует

рост опухолей, предотвращая VEGF-индуцированную васкуляризацию опухоли. Другие нацеленные на опухоль антитела используются для подавления роста опухолевых клеток или уничтожения раковых клеток посредством модификации самого антитела. Например, нацеленные на опухоль иммуноконъюгаты состоят из антитела и эффекторного фрагмента, связанных вместе ковалентными перекрестными связями или генетическим слиянием. Эффекторный фрагмент может быть цитотоксическим лекарственным средством (конъюгат антитело-лекарственное средство), белковым токсином (иммунотоксин) или радионуклидом (радиоиммуноконъюгат). Примером конъюгата антитело-лекарственное средство является брентуксимаб ведотин (ADCETRIS®, Seattle Genetics), который состоит из химерного моноклонального антитела брентуксимаб (сAC10, которое нацелено на белок клеточной мембраны CD30), связанного с тремя-пятью единицами антимиотического агента монометил ауристатин Е (ММАЕ, что отражено выражением «ведотин» в названии препарата).

[0096] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть включено в конъюгаты антитело-лекарственное средство, иммунотоксины или радиоиммуноконъюгаты. Нацеливающий анти-CD24 компонент таких композиций может обеспечивать специфическую доставку конъюгата к раковым клеткам и тканям, ограничивая при этом воздействие на нормальные клетки и ткани и, таким образом, предотвращая нецелевую токсичность.

4. Композиции ADCC-антител

[0097] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция антитела, содержащая одно из вышеперечисленных, могут быть использованы для стимуляции гибели раковых клеток посредством по меньшей мере одного из следующих механизмов: антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). ADCC - это механизм иммунной защиты, посредством которого определенный набор иммунных клеток (эффекторных клеток) организма активно взаимодействует с клеткой-мишенью (например, патогеном) и лизирует ее. ADCC был идентифицирован как важный клеточно-опосредованный врожденный иммунный ответ, функционирует как первая линия защиты организма от патогенов и действует для ограничения и сдерживания инфекций. Процесс ADCC рассчитан на уничтожение покрытой антителом клетки-мишени посредством нефагоцитарного процесса и характеризуется либо направленным высвобождением цитотоксических вакуолей, либо экспрессией молекул, индуцирующих гибель клеток. ADCC обычно инициируется, когда специфические антитела

(в основном классы IgG) хозяина распознают и связывают антигены мембранной поверхности клеток-мишеней и одновременно взаимодействуют с рецепторами Fc (FcR) на поверхности эффекторных клеток. Наиболее распространенными эффекторными клетками, которые опосредуют ADCC, являются естественные клетки-киллеры (NK), хотя моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и дендритные клетки также способны опосредовать ответ ADCC. Хотя ADCC является довольно быстрым ответом, эффективность варьируется в зависимости от нескольких параметров, таких как плотность антигена на поверхности клеток-мишеней и аффинность взаимодействия антиген-антитело, а также характеристики фрагментов Fc, которые определяют взаимодействия антител с различными членами семейства рецепторов Fc.

[0098] Связывание антитела со специфическими рецепторами клеточной поверхности на клетках-мишенях - процесс, называемый опсонизацией, - является ключевым событием процесса ADCC. Процесс опсонизации привлекает фагоциты к клетке-мишени и может инициировать фагоцитоз. Связывание Fc-области антитела с FcR на фагоцитах также способствует образованию C3b, продукта расщепления компонента 3 комплемента, который является важным белком, который инициирует поглощение опсонизированной антителом клетки-мишени. Фагоцитоз, опосредованный антителами, также часто называют антителозависимым клеточно-опосредованным фагоцитозом (ADCP). Однако в случае ADCC для уничтожения патогена не требуется, чтобы он был фагоцитирован. Как отмечалось выше, FcR на поверхности цитотоксических эффекторных клеток является ключом к индукции ADCC. У людей наиболее важными классами FcR, способными вызывать ADCC, являются FcγRI (CD64), FcγRIIa и FcγRIIc (CD32), а также FcγRIIIa (CD16). Впрочем, рецептор FcγRIIb подавляет ответ ADCC. Таким образом, баланс между активирующим и ингибирующим сигналами от FcγRs является важным фактором, определяющим величину ответа ADCC. После распознавания мишени специализированные внутриклеточные вакуоли (также называемые секреторными лизосомами) высвобождаются цитотоксическими эффекторными клетками в кальций-зависимом поляризованном экзоцитотическом процессе. Перфорин, цитолизин и гранзим В являются ключевыми компонентами, которые высвобождаются из вакуолей. Перфорин проникает и формирует поры в мембране клетки-мишени. Для этого процесса требуется кальций. Гранзим В вызывает фрагментацию ДНК целевой клетки. Примером терапевтического антитела, которое работает с помощью ADCC, является трастузумаб (Герцептин, Genentech). Трастузумаб нацелен на HER2, который экспрессируется на аномально высоких уровнях при большом количестве видов рака

молочной железы, часто называемых HER2-положительным раком молочной железы, и подавляет рост HER2-положительного рака молочной железы, индуцируя ADCC у хозяина.

[0099] Антитела, используемые для индукции ADCC, обычно требуют некоторой модификации, чтобы усилить их активность ADCC. Для этого существует ряд технологий, которые обычно включают конструирование антитела так, чтобы олигосахариды в Fc-области антитела не содержали фукозных сахарных единиц, что улучшает связывание с рецептором FcγIIIa. Афукозилированные антитела проявляют повышенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Например, технология Potelligent® компании Biowa использует линию клеток CHO, нокаутированную по гену FUT8, для производства 100 % афукозилированных антител. FUT8 - единственный ген, кодирующий α-1,6-фукозилтрансферазу, который катализирует перенос фукозы от ГДФ-фукозы к GlcNAc через связь α-1,6 олигосахарида сложного типа. Probiogen разработал линию CHO, которая предназначена для получения более низких уровней фукозилированных гликанов на mAb, хотя и не за счет нокаута FUT. Система Probiogen вводит бактериальный фермент, который перенаправляет путь синтеза фукозы de-novo к сахару-нуклеотиду, который не может быть метаболизирован клеткой. В качестве альтернативного подхода у Seattle Genetics есть проприетарная система подпитки, которая производит более низкие уровни фукозилированных гликанов на mAb, продуцируемых в клеточных линиях CHO (и, возможно, других). Компания Xenolog разработала технологию XmAb Fc домена, предназначенную для улучшения устранения иммунной системой опухолевых и других патологических клеток. Этот домен Fc имеет две замены аминокислот, что приводит к увеличению аффинности к FcγRIIIa в 40 раз. Он также увеличивает аффинность к FcγRIIIa с возможностью привлечения других эффекторных клеток, таких как макрофаги, которые играют роль в иммунитете, поглощая и переваривая чужеродный материал.

[0100] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть включены в состав антител, уничтожающих рак посредством ADCC. Анти-CD24 нацеливающий компонент таких композиций может обеспечивать специфическую нацеленную доставку к раковым клеткам для ADCC-опосредованного разрушения при сохранении нормальных клеток и тканей. Активность ADCC анти-CD24 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть усилена одной или несколькими модификациями, описанными в данном документе.

5. Композиции биспецифических антител

[0101] В настоящем документе дополнительно предложено биспецифическое антитело, которое содержит первый домен антитела, содержащий первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Первый домен антитела может содержать описанное здесь анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с другими иммуностимулирующими молекулами. В конкретном варианте осуществления второй домен антитела включает анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом случае биспецифическое антитело может специфически нацеливаться на опухолевые клетки, экспрессирующие ракоспецифичную гликоформу CD24, одновременно связывая CD3 на цитотоксических Т-клетках, тем самым привлекая Т-клетки к месту опухоли, посредством чего Т-клетки будут проникать в опухоль и вызывать цитотоксичность в опухоли. Другие примеры антител-партнеров для использования в биспецифическом антителе с целью привлечения цитотоксических Т-клеток или других эффекторных клеток к месту опухоли известны в данной области.

[0102] Второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может нацеливаться на комплементарный противоопухолевый путь или механизм. Второй домен антитела может включать антитело для иммунотерапии рака или его антигенсвязывающий фрагмент, который усиливает естественные иммунные ответы. Примеры таких антител для иммунотерапии рака включают анти-PD-1, анти-B7-H1, анти-B7-H3, анти-B7-H4, анти-LIGHT, анти-LAG3, анти-TIM3, анти-TIM4, анти-CD40, анти-OX40, анти-GITR, анти-BTLA, анти-CD27, анти-ICOS или анти-4-1BB антитела. Такие антитела можно использовать для лечения рака. Второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связывать α -цепь TCR, β -цепь TCR, γ -цепь TCR или δ -цепь TCR.

[0103] Биспецифическое антитело может содержать последовательности, указанные в SEQ ID NO: 17 и 18, или любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 23-27 и 37-41.

[0104] В данной области известно много различных технологий биспецифических антител. Для большинства из них требуется, чтобы антитела двух компонентов были в одноцепочечном формате, чтобы две части могли экспрессироваться в единой конструкции. Предпочтительный метод заключается в экспрессии антител в виде одноцепочечного переменного фрагмента (scFv). Неограничивающие примеры технологий биспецифических антител включают ViTE (что означает Vi-specific T-cell Engager, "биспецифическое средство

привлечения Т-клеток"), DART (что означает Dual-Affinity Re-Targeting, "перенацеливание с двойной аффинностью"), иммуноглобулин с тандемом Fab (FIT-Ig) и типа "выступы-вогпадины". Такие биспецифические антитела, содержащие анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в особенности рассматриваются в данном документе.

6. CAR-T терапевтические композиции

[0105] Терапия на основе Т-клеток с химерным рецептором антигена (CAR), или CAR-T-терапия, представляет собой тип клеточного лечения, при котором Т-клетки больного раком генетически модифицированы *ex vivo* с возможностью экспрессии белка CAR, чтобы они могли атаковать раковые клетки. В частности, Т-клетки получают из крови пациента, которая, в частности, может быть собственной кровью пациента (аутологичной), и трансфицируют генной конструкцией, которая экспрессирует рекомбинантный CAR-рецептор. Затем в лаборатории выращивают большое количество CAR-T-клеток и вводят обратно пациенту, где они могут нацеливаться и уничтожать раковые клетки пациента. Т-клетки также могут быть аллогенными от подходящего донора или от универсальной или «готовой» линии Т-клеток, в которой один или несколько из локусов гена TCR и локусов HLA класса I аллогенных Т-клеток нарушены и полученные Т-клетки не способны распознавать аллогенные антигены.

[0106] Белковые конструкции CAR имеют модульные структуры, обычно содержащие следующие основные компоненты: полученный из антитела внеклеточный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), присоединенный к шарнирному/спейсерному пептиду и трансмембранному домену, который дополнительно связан с внутриклеточными доменами передачи Т-клеточных сигналов Т-клеточного рецептора. ScFv является нацеливающим элементом и экспрессируется на поверхности CAR-T-клетки для придания антигенной специфичности. Спейсер соединяет внеклеточный нацеливающий элемент с трансмембранным доменом и влияет на функцию CAR и гибкость scFv. Трансмембранный домен пересекает клеточную мембрану, закрепляет CAR на поверхности клетки и соединяет внеклеточный домен с внутриклеточным сигнальным доменом, тем самым воздействуя на экспрессию CAR на клеточной поверхности. Костимулирующий домен происходит из внутриклеточных сигнальных доменов костимулирующих белков, таких как CD28 и 4-1BB, которые усиливают продукцию цитокинов. Дзета-домен CD3 происходит из внутриклеточной сигнальной части Т-клеточного рецептора, которая опосредует нисходящую передачу сигналов во время активации Т-клеток. Примеры CAR-T-терапевтических средств включают такие, которые нацелены на поверхностные антигены В-

клеток CD19 (такие как JCAR017 и JCAR014 [Juno Therapeutics]), CTL019 (тисагенлеклеуцел-Т (Kymriah™) [Novartis]) и КТЕ-С19 (аксикабтаген цилолейцел (Yescarta®) [Kite Pharma]) и CD22 (JCAR014 [Juno Therapeutics]). Другие примеры CAR-Т-терапевтических средств включают такие, которые нацелены на L1-CAM (JCAR023 [Juno Therapeutics]), ROR-1 (JCAR024 [Juno Therapeutics]) и MUC16 (JCAR020 [Juno Therapeutics]).

[0107] ScFv-часть CAR является критическим компонентом, который обеспечивает специфичность для раковых клеток, предотвращая при этом активность против нормальных клеток, которая связана с нецелевой токсичностью. Следовательно, scFv-часть обычно происходит из части антитела, которая распознает целевой белок, специфически экспрессируемый на раковых клетках, но гораздо реже или, в идеале, совсем не экспрессируется на других клетках и тканях. Соответственно, scFv-фрагмент, полученный из любого из описанных здесь анти-CD24 антител, может быть использован в качестве нацеливающего на рак компонента рекомбинантного белка CAR. В частности, белок scFv может содержать последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0108] CAR Т-клетки продемонстрировали впечатляющие эффекты против гематологических опухолей, таких как острый лимфобластный лейкоз (ALL), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, миелоидный лейкоз взрослых (AML), диффузная большая В-клеточная лимфома (DLBCL), неходжкинская лимфома (NHL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), первичная средостенная В-клеточная лимфома (PMBCL), лимфома клеток мантийной зоны (MCL) и множественная миелома (MM). Однако на сегодняшний день CAR-Т-терапия продемонстрировала лишь ограниченный эффект против солидных опухолей. Из-за характерного паттерна экспрессии CD24 в опухолях и нормальных тканях данные, полученные с использованием CD24 CAR-Т, продемонстрировали, что типы рака, на которые можно воздействовать, включают, не ограничиваясь указанным, опухоли головного мозга, рак головы и шеи, саркому, рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак яичка, рак простаты, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени или гематологические злокачественные новообразования.

7. TCR-терапевтические композиции

[0109] Подобно CAR-Т-терапии, терапия с использованием генетически модифицированных Т-клеточных рецепторов (TCR) представляет собой тип клеточного лечения, при котором Т-клетки больного раком генетически модифицированы *ex vivo* для экспрессии модифицированного TCR с целью улучшения способности Т-клеточных рецепторов распознавать и атаковать специфические антигенные клеточные антигены, когда клетки

снова вводят пациенту. Однако, в отличие от CAR T-клеток, которые распознают белки, экспрессируемые на поверхности, Т-клеточная иммунотерапия с использованием генно-модифицированных TCR была нацелена в большей степени на солидные опухоли. TCR могут распознавать опухолеспецифические белки внутри клеток. Когда опухолеспецифические белки разбиваются на фрагменты, они презентуются на поверхности клетки с другим белком, называемым главным комплексом гистосовместимости, или MHC. TCR рассчитаны на распознавание комбинации опухолеспецифического белкового фрагмента/MHC. Примеры мишеней для Т-клеток, модифицированных TCR, включают мишени, нацеленные на MAGE-A3, такие как KITE-718 (Kite Pharma), опухолевый антиген Вильмса 1 (WT-1), такой как JTCR016 (Juno Therapeutics) и NY-ESO 1.

[0110] TCR представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц, TCR α и TCR β . Каждая субъединица содержит константную область, которая находится рядом с Т-клеточной мембраной и закоривает рецептор в клеточной мембране, а также гипервариабельную область, которая участвует в распознавании антигена. Соответственно, scFv-фрагмент, полученный из любого из анти-CD24 антител, описанных в данном документе, может быть использован в качестве нацеливающего на рак компонента рекомбинантного белка TCR. В частности, белок scFv может содержать последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

8. Пептидные композиции

[0111] Описанное в данном документе анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связывать экранируемый гликаном эпитоп, который не экранирован на раковых клетках, но экранирован на незлокачественных клетках. В частности, анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связывать пептид CD24, содержащий аминокислотную последовательность SNSGLAPN (SEQ ID NO: 48). Соответственно, пептиды, содержащие последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, могут быть использованы для нейтрализации анти-CD24 антител, которые связываются с эпитопами, содержащими ядро последовательности, указанной в SEQ ID NO: 48. Это может быть использовано в анализах на основе антител к лекарствам для обнаружения нейтрализующих антител. Пептиды, содержащие последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, можно использовать для ингибирования потенциальных неблагоприятных эффектов, связанных с антителами, которые связываются с эпитопами, составляющими ядро последовательности, указанной в SEQ ID NO: 48. Пептид может быть модифицирован для повышения стабильности для использования *in vivo* с помощью методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь указанным, использование D-аминокислот, замену O на S в

одной или нескольких пептидных связях, добавление последовательности слияния для улучшения растворимости или периода полужизни (например, слияние с альбумином). В еще одном варианте осуществления молекула, содержащая последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, может быть использована в качестве вакцины для лечения и профилактики рака.

9. Способы лечения

[0112] Композиции анти-CD24 антител или клеточные терапевтические средства, включающие такие композиции антител, описанные в данном документе, могут использоваться для лечения или предотвращения рака или другого аномального пролиферативного заболевания. В настоящем документе предлагается способ такого применения у пациента, нуждающегося в этом, который может включать введение пациенту анти-CD24 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, содержащей вышеуказанное. Такие молекулы и фармацевтические композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики рака или другого аномального пролиферативного заболевания. Используемый здесь термин «рак» относится к новообразованию или опухоли, возникающим в результате аномального неконтролируемого роста клеток. Используемый здесь термин "рак" явно включает лейкоз и лимфомы. Термин относится к заболеванию с участием клеток, которые могут метастазировать в отдаленные участки. Пациент может быть человеком.

[0113] Раком или другим аномальным пролиферативным заболеванием может быть (но не ограничиваясь указанным) одно или несколько из следующих: карцинома, включая карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, печени, легких, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи; включая плоскоклеточный рак; гемопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, включая лейкоз, острый лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркетта; гемопоэтические опухоли миелоидного происхождения, включая острые и хронические миелогенные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тетратокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксенодерму, кератоактантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному. Также предполагается, что

раковые заболевания, вызванные aberrациями апоптоза, также можно лечить способами и композициями по настоящему изобретению. Такие виды рака могут включать, но не ограничиваясь указанным, фолликулярные лимфомы, карциномы с мутациями p53, гормонозависимые опухоли молочной железы, простаты и яичников, а также предраковые поражения, такие как семейный аденоматозный полипоз и миелодиспластические синдромы. В конкретных вариантах реализации злокачественные или диспролиферативные изменения (такие как метаплазии и дисплазии) или гиперпролиферативные расстройства лечат или предотвращают способами и композициями по настоящему изобретению в яичниках, мочевом пузыре, молочной железе, толстой кишке, легких, коже, поджелудочной железе или матке. Раком также может быть саркома, меланома или лейкемия.

[0114] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в комбинации с одним или несколькими другими видами противоопухолевой терапии, включая, но не ограничиваясь, современные стандартные и экспериментальные химиотерапии, гормональные терапии, биологические методы лечения, иммунотерапии, лучевые терапии или хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах реализации анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в сочетании с терапевтически или профилактически эффективным количеством одного или нескольких агентов, терапевтических антител или других агентов, известных специалистам в данной области для лечения и/или профилактики рака, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания или интоксикации. Такие агенты включают, например, любые из обсуждаемых выше модификаторов биологического ответа, цитотоксины, антиметаболиты, алкилирующие агенты, антибиотики или антимиотические агенты, а также иммунотерапевтические средства.

[0115] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в комбинации с одним или несколькими противоопухолевыми иммунотерапевтическими средствами. Противоопухолевые иммунотерапевтические средства могут включать молекулы, которые нарушают или усиливают альтернативные иммуномодулирующие пути (такие как TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, B7-H1, PD-1, B7-H3, B7-H4, LIGHT, VTLA, ICOS, CD27 или LAG3) или модулируют активность эффекторных молекул, таких как цитокины (например, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, GF-beta, IFNg, Flt3, BLys) и хемокины (например, CCL21), с целью усиления иммуномодулирующих эффектов. Конкретные варианты реализации включают биспецифическое антитело, содержащее анти-CD24 антитело или его связывающий фрагмент и анти-PD-1 (пембролизумаб (Keytruda®) или

ниволумаб (Opdivo®)), анти-B7-H1 (атезолизумаб (Tecentriq®) или дурвалумаб), анти-B7-H3, анти-B7-H4, анти-LIGHT, анти-LAG3, анти-TIM3, анти-TIM4, анти-CD40, анти-OX40, анти-GITR, анти-BTLA, анти-CD27, анти-ICOS или анти-4-1BB. В еще одном варианте осуществления анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в комбинации с молекулами, которые активируют различные стадии или аспекты иммунного ответа, чтобы достичь более широкого иммунного ответа. В более предпочтительном варианте осуществления анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно комбинировать с анти-PD-1 или анти-4-1BB антителами без усиления аутоиммунных побочных эффектов.

10. Получение

[0116] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить с использованием эукариотической системы экспрессии. Система экспрессии может включать экспрессию с вектора в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO). Система также может представлять собой вирусный вектор, такой как дефектный по репликации ретровирусный вектор, который можно использовать для инфицирования эукариотических клеток. Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также можно продуцировать в стабильной клеточной линии, которая экспрессирует антитело с вектора или части вектора, интегрированной в клеточный геном. Стабильная клеточная линия может экспрессировать антитело с интегрированного ретровирусного вектора, дефектного по репликации. Система экспрессии может представлять собой GPExTM.

[0117] Анти-CD24 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно очистить, используя, например, хроматографические методы, такие как аффинная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, DEAE-ионообмен, гель-фильтрация и хроматография на гидроксипатите. В некоторых вариантах реализации слитые белки могут быть сконструированы так, чтобы они содержали дополнительный домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая позволяет полипептидам захватываться аффинной матрицей. Например, описанные в данном документе антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулинового домена, могут быть выделены из супернатанта клеточной культуры или цитоплазматического экстракта с использованием колонки с протеином А. Кроме того, для облегчения очистки полипептида можно использовать метку, такую как с-тус, гемагглютинин, полигистидин или Flag™ (Kodak). Такие метки могут быть вставлены в любом месте полипептида, включая

карбокисильный или аминный конец. Другие слияния, которые могут быть полезны, включают ферменты, которые помогают в обнаружении полипептида, такие как щелочная фосфатаза. Иммуноаффинная хроматография также может использоваться для очистки полипептидов.

[0118] Вакцины

[0119] В настоящем документе предложен способ лечения рака или обеспечения профилактики рака, описанного в настоящем документе, у пациента. С помощью этого метода можно вакцинировать пациента от рака. Способ может включать введение композиции, содержащей последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, пациенту, нуждающемуся в этом. Композицию также можно вводить пациенту, нуждающемуся в лечении побочных эффектов, связанных с терапией, включающей использование анти-CD24 антитела или клеток, экспрессирующих рецепторы, связывающие CD24. Композиция также может быть использована при производстве лекарственного средства для лечения рака или обеспечения профилактики рака.

11. Фармацевтические композиции

[0120] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество любого из описанных выше анти-CD24 антител, клеточных терапевтических средств или пептидных композиций и физиологически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтическая композиция может содержать профилактически или терапевтически эффективное количество анти-CD24 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и фармацевтически приемлемый носитель.

[0121] В конкретном варианте осуществления термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полный и неполный), вспомогательному веществу или несущей среде, с которыми вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. д. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическая композиция вводится внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества

включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, вода, этанол и т. д. Фармацевтическая композиция, если желательно, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или рН-буферов. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п.

[0122] Как правило, ингредиенты фармацевтической композиции могут поставляться либо отдельно, либо в смеси в единичной дозированной лекарственной форме, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если фармацевтическую композицию следует вводить путем инфузии, ее можно отпускать с бутылкой для инфузии, содержащей стерильную воду или физиологический раствор фармацевтического качества. Когда фармацевтическая композиция вводится путем инъекции, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

[0123] Фармацевтическая композиция может быть получена в нейтральной или солевой формах. Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваясь указанным, соли, образованные с такими анионами, как происходящие из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т. д., и соли, образованные с такими катионами, как происходящие из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т. д.

12. Способы введения

[0124] Способы введения составов и их фармацевтических композиций включают, но не ограничиваясь указанным, парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное (например, интраназальный и пероральный пути). В конкретном варианте осуществления композиция вводится внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композицию можно вводить любым удобным путем, например инфузией или болюсной инъекцией, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой и кишки и т. д.) и можно вводить совместно с одним или несколькими другими биологически активными веществами. Введение может быть системным или местным.

ПРИМЕРЫ

[0125] Раскрытие изобретения имеет множество аспектов, проиллюстрированных следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕР 1

Синтез моноклональных антител к гипогликозилированному CD24

[0126] Сверхэкспрессия NEU1 и CD24 в опухолях предполагает нарушение регуляции гликозидазы. Нарушение регуляции гликозидазы предполагает, что CD24, подобно MUC1, может быть гипогликозилирован в опухолях. Связывание антитела, 3B6, с CD24 затрудняется гликанами сиаловой кислоты (Фиг. 1). По сравнению с коммерчески доступным анти-CD24 антителом, ML5 (BD bioscience), 3B6 прочно связывает N-SA-CD24 и N-SA-O-CD24, но всего лишь слабо N-CD24 или полностью гликозилированный CD24, как обнаружено с помощью ELISA. Это свидетельствовало о том, что эпитопы, которые связывает 3B6, действительно являются белковым остовом, и что связыванию 3B6 препятствует гликозилирование эпитопа.

[0127] Результаты сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и иммунофлуоресцентного (IFA) окрашивания показывают, что 3B6 связывает множество линий раковых клеток, включая нейробластому и медуллобластому (Фиг. 2A-B). 3B6 связывает клеточные линии нейробластомы IMR32, SK-N-SH, SH-SY5Y, SK-N-BE(2) и SK-N-BE(2)C, но не SK-N-AS (Фиг. 2A). 3B6 также связывает 3 из 4 опухолей медуллобластомы, полученных от пациентов, по оценке IFA окрашивания (Фиг. 2B). Эти данные указывают на то, что 3B6 способен связывать линии раковых клеток и опухолей.

ПРИМЕР 2

Созревание аффинности

[0128] Аффинность связывания 3B6 с CD24 была значительно ниже по сравнению с коммерческими антителами ML5 (BD Bioscience) и SN3 (Thermo Fisher). Для увеличения аффинности и специфичности связывания 3B6 с его антигеном проводили созревание аффинности 3B6. Сначала клонировали тяжелую (IgH) и легкую (IgL) цепи антитела 3B6 и идентифицировали последовательность варибельной области Ig следующим образом:

[0129] 3B6 IgH (SEQ ID NO: 1, CDR выделены подчеркнутым и полужирным шрифтом)
 EVKFEESGGGLVQPGGSIKLSAAS**GVTFSEAW**MDWVRQSPEKGLEWVAE**I**
RDKTKNYVTYYAESVKGRFTISRDDSKSRVYLQMNNLRTEDTGIYYCT**GA**
MDYWGQGTSVTVSS

[0130] 3B6 IgL (SEQ ID NO: 2, CDR выделены подчеркнутым и полужирным шрифтом)

DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSOSLLYSNGKTYLNWLQQRPGQSPKRLI
YQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLKISRVEAEDLGIYYCLOGTSYPWTFGG
GTKLEIK

[0131] Фрагменты VH и VL исходного антитела 3B6 были преобразованы в формат scFv и клонированы в вектор фагового дисплея. ScFv моновалентно отображался на фаге, что позволяло отобрать клоны фага с более высокой аффинностью. Чтобы проверить уровень отображения scFv, scFv был слит с тегом обнаружения Flag-6xHis. ELISA на фаге выполняли для проверки связывания родительского антитела с антигеном в формате фагового дисплея. Сигнал связывания от фагового супернатанта был значительным, и проект перешел к созданию библиотеки.

[0132] Было проведено три раунда отбора и скрининга. Снижение концентраций антигена CD24-GST и биотинилированного CD24-GST использовали при скрининге для отбора клонов с более высоким связыванием. Отобрали 48 клонов из каждой библиотеки мутагенеза CDR, культивировали, проанализировали на связывание и секвенировали. После подтверждения последовательностей клонов scFv с созревшей аффинностью, scFv клонов с созревшей аффинностью переформатировали в полноразмерные гены антител и временно экспрессировали в клетках млекопитающих. Все антитела с созревшей аффинностью получали в мелких сериях 0,01 л. Исходное антитело также было наработано для прямого сравнения. Плазмиды для указанных тяжелых и легких цепей (Таблица 1) трансфицировали в суспензионные клетки HEK293 с использованием сред с химически определенным составом в отсутствие сыворотки для получения антител. Через пять дней после трансфекции кондиционированные среды собирали и осветляли. Целые антитела в кондиционированной среде очищали с использованием среды MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare).

Таблица 1. Антитела, продуцируемые в клетках НЕК293 посредством временной трансфекции и очищенные с помощью IgG1

Родительское		С созревшей аффинностью, панель 1		С созревшей аффинностью, панель 2	
PP6226 - H4040+L4040	анти- CD24	PP6228 - H4041+L4040	P3050.H1.A4	PP6368 - H4069+L4069	P3050.ComF1.A11
		PP6230 - H4042+L4040	P3050.H2.A7	PP6369 - H4070+L4069	P3050.ComF1.H4
		PP6231 - H4043+L4040	P3050.H2.B11	PP6370 - H4071+L4069	P3050.ComF1.2F4
		PP6232 - H4040+L4041	P3050.L3.B9	P6371 - H4072+L4070	P3050.ComF1.2F5
		PP6233 - H4040+L4042	P3050.L3.C7	PP6372 - H4073+L4071	P3050.ComF1.C9
		PP6234 - H4040+L4043	P3050.L3.D8	PP6373 - H4069+L4071	P3050.ComF1.2H1
		PP6235 - H4041+L4042	P3050.H1.A4.L3.C7	PP6387 - H4071+L4071	P3050.ComF2.B1
		PP6236 - H4043+L4042	P3050.H2.B11.L3.C7	PP6388 - H4072+L4069	P3050.ComF2.A5

Таблица: Список временной трансфекции и очистки, проведенной для получения IgG. H40xx означает конструкцию тяжелой цепи, а L40xx - конструкцию легкой цепи. P3050.xx обозначает исходный клон, полученный в результате пэннинга фага. Все IgG хорошо экспрессировались. Номера PP представляют собой серийные коды, используемые для различения продуцируемых белков.

[0133] Очищенные антитела с созревшей аффинностью и исходное антитело оценивали на их аффинность к антигену с помощью конкурентного ELISA. Антитело PP6226 (родительские переменные области 3B6) наносили на планшеты в концентрации 2 мкг/мл. Антитела с созревшей аффинностью сначала инкубировали с CD24-GST, затем инкубировали на планшете с последующей инкубацией антител для вторичной детекции. Как показано на Фиг. 3-5, получено 16 антител с различной способностью конкурировать со своими родительскими

клонами. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей этих антител представляют собой SEQ ID NO: 3-10 (тяжелые цепи) и SEQ ID NO: 11-16 (легкие цепи).

[0134] Чтобы определить, имеют ли клоны с созревшей аффинностью более сильное связывание с CD24, и регулируются ли взаимодействия гликаном, была произведена обработка CD24 либо N-гликаназой (N-CD24), либо сиалидазой NanA (SA-CD24), либо обоими ферментами (N-SA-CD24). 16 клонов, описанных на Фиг. 3-5, были протестированы с помощью ELISA. Как показано на Фиг. 6, несмотря на значительную аффинность к CD24-GST, PP6231 и PP6230 не могут связываться с CD24, экспрессируемым клетками млекопитающих, независимо от гликозилирования. С другой стороны, большинство других клонов сохраняли преимущественное связывание с CD24, которые обрабатывались сиалидазой и/или N-гликаназой. Тем не менее, поскольку относительное влияние сиалидазы и N-гликаназы на связывание антител значительно различается для разных клонов, каждый клон необходимо тестировать индивидуально, чтобы определить их чувствительность к гликановому экранированию.

[0135] Было выбрано 6 клонов с сильным связыванием SA-N-CD24, но которые проявляют минимальное связывание с CD24, и они были протестированы на связывание с двумя линиями раковых клеток, линией клеток рака легкого H727 и линией клеток нейробластомы IMR32. Как показано на Фиг. 7, несмотря на сходство их связывания с SA-N-CD24, 6 клонов показали значительно различающееся связывание с раковыми клетками. Важно отметить, что PP6373 демонстрирует значительно более сильное связывание с обеими протестированными линиями раковых клеток. Поэтому этот клон выбран для дальнейшего изучения.

Последовательность тяжелой цепи PP6373 указана в SEQ ID NO: 6, а последовательность легкой цепи указана в SEQ ID NO: 16. По сравнению с исходной последовательностью тяжелая цепь имеет три мутации в CDR2, тогда как легкая цепь имеет одну мутацию в CDR3 легкой цепи. Как показано на Фиг. 8, эти мутации не только увеличивают связывание с SA-N-CD24 почти в 100 раз, но также делают взаимодействие более строго регулируемым посредством десиаилирования. Также следует отметить, что PP6373 приобрел способность связываться с CD24 даже без дегликозилирования на уровне 1/1000 от уровня SA-N-CD24. Однако, поскольку известно, что клетки CHO имеют неполное гликозилирование, вполне вероятно, что связывание отражает более высокую чувствительность антитела к обнаружению минорной гликоформы в рекомбинантном CD24, полученном из клеток CHO.

ПРИМЕР 3

Антигенный эпитоп, распознаваемый 3В6 и PP6373

[0136] Чтобы определить антигенный эпитоп, распознаваемый 3B6, и клон PP6373 с созревшей аффинностью, были синтезированы перекрывающиеся пептиды, покрывающие зрелую аминокислотную последовательность CD24 (SEQ ID NO: 42), и предварительно инкубировали их с антителом 3B6 перед добавлением 3B6 на планшеты, предварительно покрытые белком N^o CD24 (CD24Fc, предварительно обработанный последовательно N-гликозидазой, NanA и O-гликозидазой). Как показано на Фиг. 9, из 5 протестированных пептидов (SEQ ID NO: 43-47) только пептид 4 (SEQ ID NO: 46) демонстрирует значительное блокирование взаимодействия 3B6-CD24, что позволяет предположить, что эпитоп, связывающий CD24, заключен в этой последовательности. Чтобы подтвердить, что PP6373 распознает один и тот же эпитоп, титровали пять пептидов в большом диапазоне доз. Как показано на Фиг. 10, только пептид 4 показал дозозависимое ингибирование связывания PP6373 с SA-N-CD24.

[0137] Чтобы определить минимальный сайт связывания PP6373, проводили усекание пептида 4 по одной аминокислоте за раз и сравнивали его ингибирование связывания PP6373 с SA-N-CD24. Как показано на Фиг. 11, в то время как делеция 3 аминокислот с C-конца устраняет ингибирование, делеция одной или двух аминокислот значительно улучшает ингибирование (левая панель). Кроме того, удаление любой аминокислоты с N-конца пептида 4 также устраняет ингибирование (правая панель). Эти данные идентифицируют SNSGLAPN (SEQ ID NO: 48) как оптимальный эпитоп, распознаваемый PP6373.

[0138] Произведенная идентификация антигенного эпитопа позволяет генерировать дополнительные антитела с аналогичными свойствами. В одном варианте осуществления можно генерировать новые антитела, используя синтетический пептид, содержащий последовательность SNSGLAPN (SEQ ID NO: 48). Пептид может быть связан с другим иммуногенным белком-носителем или использоваться вместе с адьювантами. В другом варианте осуществления пептид можно использовать для идентификации других анти-CD24 mAb, которые распознают тот же эпитоп, для генерации ракоспецифичных антител для диагностики и лечения рака. В еще одном варианте осуществления антигенный пептид можно использовать для нейтрализации или ингибирования потенциальных неблагоприятных эффектов, связанных с антителами, которые связываются с эпитопами, содержащими коровую последовательность SEQ ID NO: 48. Пептид может быть модифицирован для лучшей стабильности при применении *in vivo* с использованием способов известных в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, использование D-аминокислот, замену O на S в одной или нескольких пептидных связях, добавление последовательности слияния

для улучшения растворимости или периода полужизни (например, слияния альбумина). В еще одном варианте осуществления молекула, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, может быть использована в качестве вакцины для лечения и профилактики рака.

ПРИМЕР 4

Экспрессия антигенного эпитопа в нормальных тканях по сравнению со злокачественными

[0139] Чтобы определить, представлен ли эпитоп, распознаваемый РР6373, преимущественно в раковых тканях по сравнению с нормальными тканями, было проанализировано связывание тканей с помощью иммунофлуоресценции с использованием биотинилированного РР6373. Данные о нормальных тканях обобщены в Таблице 2, а данные о раковых тканях - в Таблице 3. Кроме того, было оценено связывание антитела с нормальным доброкачественным и злокачественным раком головного мозга. Данные представлены в Таблице 4.

Таблица 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание РР6373 показало минимальное связывание с нормальными тканями.

Орган	+/-	Паттерн окрашивания
Нормальный желудок	-	
Нормальная двенадцатиперстная кишка	-	
Нормальный тонкий кишечник	-	
Нормальная толстая кишка	-	
Нормальная околоушная слюнная железа	-	
Нормальная щитовидная железа	-	
Нормальная поджелудочная железа	+	Слабо - клеточная поверхность, внутриклеточное?
Нормальная простата	-	
Нормальная аорта	-	
Нормальное яичко	-	
Нормальный большой сальник	-	

Нормальная молочная железа	-	
Нормальный лимфатический узел	-	
Нормальная кожа	-	
Нормальный продолговатый мозг		
Нормальная селезенка	-	Мало положительных, клеточная поверхность?
Нормальная матка	-	
Нормальное влагалище	-	
Нормальный мочевой пузырь	-	
Нормальный нерв	-	

Таблица 3. Реактивность РР6373 к злокачественным тканям.

Орган	Процент	
	положительных	Паттерн окрашивания
Злокачественная толстая кишка	0/1	
Злокачественный пищевод	0/1	
Злокачественный желудок	0/2	
Злокачественный яичник	16/25	поверхность клетки
Злокачественные мягкие ткани	0/1	
Злокачественная почка	1/1	поверхность слабо
Злокачественная печень	14/19	поверхность клетки
Злокачественная молочная железа	12/20	поверхность клетки
Злокачественная кожа	1/1	поверхность клетки
Злокачественное яичко	1/1	внутриклеточное/клеточная поверхность
Злокачественное легкое	11/39	поверхность клетки

Таблица 4. Связывание РР6373 с нормальными доброкачественными и злокачественными опухолями головного мозга

Патология	поверхность клетки	внутри клетки	отрицательно
Астроциты	2/24 (8%)	17/24 (71%)	5/24 (21%)

Глиобластома	3/8 (38%)	2/8 (25%)	5/8 (37%)
Олигодендроглиома	4/8 (50%)	3/8 (38%)	1/8 (12%)
Эпендимома	5/8 (63%)	0/8 (0%)	3/8 (37%)
Медуллобластома	7/10 (70%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)
Доброкачественная менингиома	0/22 (0%)	15/22 (68%)	7/22 (32%)
Нормальная ткань ЦНС	0/16 (0%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)

[0140] Как показано в Таблице 2, за исключением поджелудочной железы и, возможно, селезенки, РР6373 не окрашивал нормальные ткани. Следует отметить, что большая часть окрашивания поджелудочной железы является внутриклеточной. В селезенке окрашивание клеток было редким. Напротив, как показано в Таблице 3, большинство протестированных видов рака демонстрируют сильное связывание с РР6373. Как показано в Таблице 4, в то время как нормальные ткани ЦНС лишены CD24, доброкачественная менингиома проявляет внутриклеточное окрашивание, но не проявляет окрашивание поверхности клетки. Важно отметить, что злокачественные опухоли головного мозга, включая астроцитому, глиобластому и олигодендроглиому, демонстрируют окрашивание клеточной поверхности в количестве 8-70%, кроме того, некоторые раковые ткани обнаруживают внутриклеточное окрашивание.

[0141] В одном из вариантов реализации РР6373 можно использовать для различения злокачественной опухоли мозга от нормальной или доброкачественной ткани мозга. В другом варианте реализации РР6367 можно использовать для идентификации раковых тканей в плотных органах, таких как печень, легкие, молочные железы и яичники.

ПРИМЕР 5

РР6373 замедляет рост рака легких *in vivo*

[0142] Чтобы проверить, может ли РР6373 замедлять рост опухоли *in vivo*, голых мышей заражали клеточной линией рака легких человека H727 подкожно. После того, как опухоль стала пальпироваться, мышам, несущим опухоль, сделали две инъекции РР6373 в дозе 5 мг/кг (14 и 21 день после инокуляции H727). Как показано на Фиг. 12, по сравнению с контролем IgG, опухоль, обработанная РР6373, росла значительно медленнее. Эти данные демонстрируют, что немодифицированный РР6373 способен проявлять противоопухолевую активность *in vivo*.

[0143] В соответствии с задержкой развития опухоли *in vivo*, исследования *in vitro* демонстрируют, что PP6367 опосредует сильную антителозависимую клеточную цитотоксичность, как показано на Фиг. 13.

[0144] Поскольку на ADCC влияет гликозилирование, особенно фукозилирование, был использован инжиниринг антител для получения PP6373 без фукозилирования ядра Fc (d6373). Как показано на Фиг. 14, фукозилирование увеличивает ADCC-активность PP6373.

[0145] Представленные данные показывают, что PP6373 можно использовать для лечения рака. В одном варианте осуществления PP6373 WT IgG1 можно использовать в качестве терапевтических антител против рака для введения больным раком. В другом варианте осуществления антитело может быть получено гликоинженерией либо химически, либо продуцировано в клеточной линии, лишенной фукозилтрансферазы.

ПРИМЕР 6

Биспецифические антитела на основе последовательности PP6373 и ОКТ3

[0146] Для применения анти-CD24 антитела были получены биспецифические антитела, которые связывают как CD24, так и CD3. В одном варианте осуществления анти-CD24 и анти-CD3 (ОКТ3) антитела превращают в одноцепочечные антитела с реактивностью к CD24 и CD3, соответственно, и связывают гибкой линкерной последовательностью GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 49). Последовательность одноцепочечного антитела PP6373 указана в SEQ ID NO: 17, а одноцепочечная последовательность ОКТ3 указана как SEQ ID NO: 18.

[0147] В одном варианте осуществления биспецифическое антитело создают с помощью технологии выступа и впадины, в которых два партнера биспецифической молекулы имеют комплементарные мутации в области Fc для создания выступа и впадин для облегчения образования биспецифических гетеродимеров. Последовательности вариантов выступов и впадин PP6373 и ОКТ3 перечислены в SEQ ID NO: 19-22. Чтобы оценить биспецифичность различных конфигураций выступов и впадин, был разработан анализ, состоящий из окрашивания клеток Jurkat продуктом котрансфекции различных продуктов, полученных с технологией выступа-впадины. Вкратце, клетки CD3+ Jurkat сначала окрашивали супернатантами тканевых культур из трансфицированных клеток 293Т. После смывания несвязавшихся антител клетки инкубировали с биотинилированным SA-N-CD24. Количество SA-N-CD24 на клетках Jurkat определяли с помощью PE-стрептавидина. Как показано на Фиг. 15, комбинация PP6373-впадина и ОКТ3-выступ дает наивысшее связывание CD24 с

клетками Jurkat, что указывает на то, что пара PP6373-впадина и ОКТ3-выступ является наиболее подходящей для стратегии "выступ-впадина".

[0148] В другом варианте осуществления биспецифическое антитело создают посредством tandemного повтора двух одноцепочечных связывающих мотивов. И в этот раз тоже сравнили активность двух конфигураций с разными связывающими мотивами в противоположных порядках, PP6373-ОКТ3 и ОКТ3-PP6373, как указано в SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно. Как показано на Фиг. 16, конструкция с одной цепью PP6373 на N-конце (PP6373-ОКТ3; SEQ ID NO: 23) показывает более высокую биспецифическую активность.

[0149] Чтобы определить, обладает ли биспецифическое антитело противоопухолевой активностью, совместно инкубировали линию клеток рака легкого H727 с Т-клетками, которые были активированы с помощью анти-CD3 и анти-CD28 в течение 2 дней. Сначала проверили, может ли раковая клетка специфично запускать выработку цитокинов. Как показано на Фиг. 17, значимые цитокины индуцируются биспецифическим антителом, но не ОКТ3-Fc PP6373-Fc. Что важнее, биспецифическое антитело не индуцирует продукцию цитокинов, если и Т-клетки, и опухолевые клетки не присутствуют вместе. Эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела запускают активацию Т-клеток, задействуя как Т-клетки, так и опухолевые клетки.

[0150] Одновременно с анализом высвобождения цитокинов также оценили цитотоксичность опухолевых клеток с помощью основанного на микрочастицах подсчета количества живых опухолевых клеток, меченных красителем, методом проточной цитометрии. Как показано на Фиг. 18, биспецифические антитела вызывают потерю опухолевых клеток, если и только если присутствуют Т-клетки.

[0151] В еще одном варианте биспецифическое антитело может быть получено с помощью технологии FIT-Ig. Вкратце, биспецифическое антитело образуется совместной экспрессией трех конструкций, кодирующих VL₆₃₇₃-CL-VH_{ОКТ3}-CH1-Fc (SEQ ID NO: 25), VH₆₃₇₃-CH1 (SEQ ID NO: 26) и VL_{ОКТ3}-CL (SEQ ID NO: 27), соответственно. Как показано на Фиг. 19, FIT-Ig-антитело показало хорошие активности биспецифического связывания как для ОКТ3, так и для SA-N-CD24. В дополнение к связыванию также было обнаружено, что это биспецифическое антитело вызывает значительный цитокиновый ответ (Фиг. 20) и цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам (Фиг. 21). Кроме того, это биспецифическое антитело (FIT-Ig) показало более высокую термостабильность по сравнению с предыдущими биспецифическими антителами PP6373-ОКТ3 и ОКТ3-PP6373 (Фиг. 22).

ПРИМЕР 7

Применение PP6373 в Т-клетках, модифицированных химерным рецептором антигена (CAR) (CAR-T), для лечения рака

[0152] Анти-CD24 антитела реагируют с широким спектром раковых клеток и могут быть использованы для получения химерного рецептора антигена, который придает противораковую активность Т-клеткам. В одном варианте осуществления одноцепочечная последовательность Fv PP6373 (SEQ ID NO: 28) или другое одноцепочечное анти-CD24 mAb (alphaCD24SC) вставляют в вектор CAR-T, известный в данной области, как показано на Фиг. 23. Конструкцию затем вставляют в генные векторы, известные в данной области, включая векторы, полученные из ретровируса, лентивируса, аденоассоциированного вируса или аденовирусных векторов.

[0153] Чтобы проверить активность CAR, PBMC от здорового донора были обогащены Т-клетками с использованием набора для выделения пан-Т-клеток человека (Miltenyl Biotec) (сутки 0). Пан-Т-клетки человека стимулировали с помощью анти-CD3 и анти-CD28 в течение 24 часов и культивировали с IL-2 в течение 2 суток. Активированные Т-клетки подвергали ложной обработке (контроль Т) или инфицировали лентивирусом, несущим CD24-CAR (Сутки 2). Для тестирования противоопухолевой активности CAR-T контрольные Т-клетки или CD24 CAR-T-клетки культивировали совместно с опухолевыми клетками, мечеными CellTrace Violet (Thermo Fisher), в течение ночи. Лизис опухолевых клеток измеряли окрашиванием Fixable Viability Dye eFluor™ 660 (eBioscience) и рассчитывали по формуле:

[0154] $\text{Лизис}\% = (\text{мертвые}\% - \text{автолиз}\%) / (1 - \text{автолиз}\%)$

[0155] Как показано на Фиг. 24, в широком диапазоне соотношения эффектор/мишень (E/T) CD24 CAR-T проявляет сильную цитотоксичность по сравнению с линией клеток рака легкого A549.

[0156] Чтобы проверить, активируется ли CAR-T раковыми клетками, инкубировали 4×10^4 CAR-T или контрольные Т-клетки с опухолевыми клетками A549 в течение ночи и измерили IFN γ в супернатантах. Как показано на Фиг. 25, CAR-T, но не контрольные Т-клетки, продуцировали IFN γ в ответ на стимуляцию опухолевыми клетками A549.

Поскольку CD24 широко экспрессируется среди множества типов рака. Как показано на Фиг. 26, CD24 CAR-T проявляет широкую цитотоксичность в отношении многих типов рака, включая рак легкого, рак молочной железы, рак простаты, рак шейки матки, нейробластому и глиому.

[0157] В совокупности, представленные данные демонстрируют, что CD24 CAR-T на основе раскрытого в данном документе антитела имеет большой потенциал в лечении рака. Типы рака, на которые можно воздействовать, включают, помимо прочего, опухоли головного мозга, рак головы и шеи, саркому, рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак яичка, рак простаты, рак поджелудочной железы, рак печени или гематологические злокачественные новообразования.

ПРИМЕР 8

Гуманизация PP6373 для лечения рака

[0158] Модель гомологии Fv PP6373 была построена с использованием структуры pdb 4PB0 в качестве модельной структуры. И VH, и VL имеют более 90 % гомологии с таковыми у 4PB0. При запросе базы данных человеческого Ig, последовательность V-области человеческой зародышевой линии IGHV3-73*01 и последовательность J-области IGJ4*01 были идентифицированы как подходящие структуры и использовались как человеческая акцепторная каркасная область для CDR-областей тяжелой цепи (Onс-1 VH). V-область человеческой зародышевой линии IGKV2-29*02 и последовательность J-области IGKJ4*01 применяли в качестве человеческого акцепторного каркаса для CDR-областей легкой цепи (Onс-1 VL). Были сконструированы четыре последовательности VH и четыре последовательности VL (SEQ ID NO: 29-36). Новые продукты улучшают показатели гуманизации с 73 % до более 83 % в VH и с 80 % до более 83 % в VL. Структурное выравнивание мышиного Fv PP6373 и Fv гуманизированной версии PP6373 (hu-VHv1VLv1; SEQ ID NO: 29 и 33) продемонстрировало высокую степень сходства (Фиг. 27).

[0159] Чтобы выбрать лучшую рабочую комбинацию HuVH и HuVL для связывания CD24, различные комбинации подвергали совместной трансфекции в клетки 293 в течение 72 часов. Затем проводили два ELISA с экспрессионной средой. ELISA 1: 96-луночный планшет покрывали очищенным козьим античеловеческим поликлональным IgG (GAH) и после блокирования добавляли экспрессионную среду или очищенные контрольные IgG, и использовали козье античеловеческое антитело IgG-HRP в качестве детектирующего антитела. ELISA 2: 96-луночный планшет покрывали белком CD24-GST и после блокирования добавляли экспрессионную среду или очищенные контрольные IgG, и в качестве детектирующего антитела использовали козий античеловеческий IgG-HRP. Если рассматривать связывание химерного антитела PP6373 как 100% в обоих ELISA, различные комбинации VH и VL, проявляющие разную степень связывания, будут сравниваться с таковыми химерного антитела и ранжироваться по относительному связыванию (кандидаты,

выбранные после предварительного скрининга, будут сравниваться еще раз после очистки). Данные первого раунда предварительного скрининга суммированы на Фиг. 28, и данные этого эксперимента свидетельствуют о том, что: а) L3 показал высокую связывающую способность на единицу белка, что сделало L3 кандидатом; и б) H1L3 (SEQ ID NO: 29 и 35), H2L3 (SEQ ID NO: 30 и 35), H3L3 (SEQ ID NO: 31 и 35) и H4L3 (SEQ ID NO: 32 и 35) - четыре кандидата гуманизации для PP6373.

[0160] Чтобы проверить, сохраняют ли антитела-кандидаты H2L3 и H3L3 свою способность связывать опухолевые клетки, биотинилировали гуманизированные антитела наряду с PP6373. Как показано на Фиг. 29, хотя PP6373 имел лучшее связывание с двумя протестированными раковыми клетками человека, как H2L3, так и H3L3 демонстрируют сильное связывание в наномолярном диапазоне IC50.

[0161] Проводили анализы ADCC с использованием либо PBL (Фиг. 30, Фиг. 31) или очищенных НК-клеток (Фиг. 32) из PBL в качестве эффекторов и клеток A549 в качестве клеток-мишеней. Удивительно, что хотя H2L3 и H3L3 хуже связываются с опухолевыми клетками (Фиг. 29), они являются более мощными эффекторами в ADCC при использовании низкой концентрации антител (Фиг. 30). Как и ожидалось, дефукозилированный PP6373 (d6373) более активен в ADCC (Фиг. 31, Фиг. 32).

[0162] В совокупности, представленные здесь данные продемонстрировали, что гуманизированные клоны PP6373 проявляют значительное связывание с раковыми клетками человека и неожиданно высокую активность ADCC. В одном варианте осуществления антитела можно использовать для лечения рака. В другом варианте гуманизированное антитело можно использовать в качестве ключевого компонента биспецифического антитела. Чтобы исследовать эту активность, создали две конструкции, содержащие H3 и L3, для получения биспецифических антител на основе технологии FIT-Ig. Последовательности гуманизированных FIT-Ig-антител перечислены в SEQ ID NO: 37 и 38 и используются вместе с SEQ ID NO: 27. Кроме того, также внесли некоторые мутации для оптимизации гуманизированных последовательностей FIT-Ig, и они были перечислены в SEQ ID NO: 39-41. В частности: все три последовательности содержат сигнальную последовательность на N-конце для очистки и синтеза белка; в SEQ ID NO: 39: мутация (замена D на A) была введена в область Fc для предотвращения ADCC; в SEQ ID NO: 27 есть один дополнительный остаток R между VLOKT3 и CL, появление которого было вызвано сайтом для рестриктазы во время конструирования, а в SEQ ID NO: 41 лишний остаток R был удален.

[0163] В еще одном варианте осуществления гуманизированные антитела можно использовать в качестве ключевого компонента CAR-T для терапии рака с применением способов, известных в данной области.

ПРИМЕР 9

Анти-CD24 антитела, связывающие экранируемые гликаном эпитопы, не связываются с нормальными клетками с высокой экспрессией CD24.

[0164] Ключевым требованием иммунотерапии на основе антител является минимальная реактивность в нормальных тканях. Поскольку CD24 обильно экспрессируется на гемопоэтических клетках, особенно гранулоцитах, В-клетках, части эритроцитов и части моноцитов, сравнили PP6373 и два его гуманизированных клона, H2L3 и H3L3, с обычными анти-CD24 mAb, ML5. Как показано на Фиг. 33, в то время как ML5 демонстрирует сильное связывание с клетками, которые обычно экспрессируют высокие уровни CD24, H2L3 и H3L3 не связываются с В-клетками и эритроцитами и плохо связываются с гранулоцитами. Этот результат демонстрирует минимальное связывание с другими типами клеток, такими как макрофаги, и с фракцией не-В-лимфоцитов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая анти-CD24 антитело, для применения при лечении рака, где:

- (a) антитело содержит (i) переменную область тяжелой цепи из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 30, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35; и
- (b) рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака щитовидной железы, рака кожи, гемопоэтической опухоли лимфоидного происхождения, гемопоэтической опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимального происхождения, саркомы, тетратокарциномы, опухоли центральной или периферической нервной системы, опухоли мезенхимального происхождения, пигментной ксанодермы, кератоакантомы, саркомы, фолликулярного рака щитовидной железы, тератокарциномы, фолликулярной лимфомы, карциномы с мутацией p53, предракового поражения, рака матки и саркомы.

2. Композиция по п. 1, где рак кожи представляет собой плоскоклеточный рак или меланому.

3. Композиция по п. 1, где гемопоэтическая опухоль лимфоидного происхождения представляет собой лейкоз, острый лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому или лимфому Беркетта.

4. Композиция по п. 1, где гемопоэтическая опухоль миелоидного происхождения представляет собой острый или хронический миелогенный лейкоз, или промиелоцитарный лейкоз.

5. Композиция по п. 1, где опухоль мезенхимального происхождения представляет собой фибросаркому или рабдомиосаркому.

6. Композиция по п. 1, где опухоль центральной и периферической нервной системы представляет собой астроцитому или шванному.

7. Композиция по п. 1, где опухоль мезенхимального происхождения представляет собой фибросаркому, рабдомиосаркому или остеосаркому.

8. Композиция по п. 1, где предраковое поражение представляет собой семейный аденоматозный полипоз или миелодиспластический синдром.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, где анти-CD24 антитело является одноцепочечным.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, где анти-CD24 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35.

11. Композиция по любому из пп. 1-9, где анти-CD24 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35.

12. Анти-CD24 антитело по любому из пп. 1-11, где анти-CD24 антитело дополнительно включает константную область (Fc) иммуноглобулина человека.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, где биспецифическое антитело содержит: (а) первый домен антитела, содержащий указанное анти-CD24 антитело, и (b) второй домен антитела, содержащий второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

14. Композиция по п. 13, где второй домен антитела привлекает иммунные эффекторные Т-клетки к раковым клеткам для иммунотерапии рака и/или связывает CD3, α -цепь TCR (Т-клеточный рецептор), β -цепь TCR, γ -цепь TCR или δ -цепь TCR.

15. Композиция по п. 14, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3.

16. Композиция по п. 15, где второй домен антитела содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

17. Композиция по любому из пп. 9-12, где химерный рецептор антигена содержит указанное одноцепочечное антитело.

18. Композиция по любому из пп. 1-12, где конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) содержит указанное анти-CD24 антитело, связанное с эффекторным

фрагментом, выбранным из группы, состоящей из цитотоксического лекарственного средства, белкового токсина и радионуклида.

19. Композиция по любому из пп. 1-18, дополнительно комбинированная со вторым противораковым средством.

20. Композиция по п. 19, где второе противораковое средство включает анти-PD-1 антитело, анти-CTLA-4 антитело или LAG3.

21. Применение композиции, содержащей анти-CD24 антитело, в производстве лекарственного средства для лечения рака, где:

- (a) антитело содержит (i) переменную область тяжелой цепи из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 30, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35; и
- (b) рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака щитовидной железы, рака кожи, гемопозитической опухоли лимфоидного происхождения, гемопозитической опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимального происхождения, саркомы, тератокарциномы, опухоли центральной или периферической нервной системы, опухоли мезенхимального происхождения, пигментной ксанодермы, кератоакантомы, саркомы, фолликулярного рака щитовидной железы, тератокарциномы, фолликулярной лимфомы, карциномы с мутацией p53, предракового поражения, рака матки и саркомы.

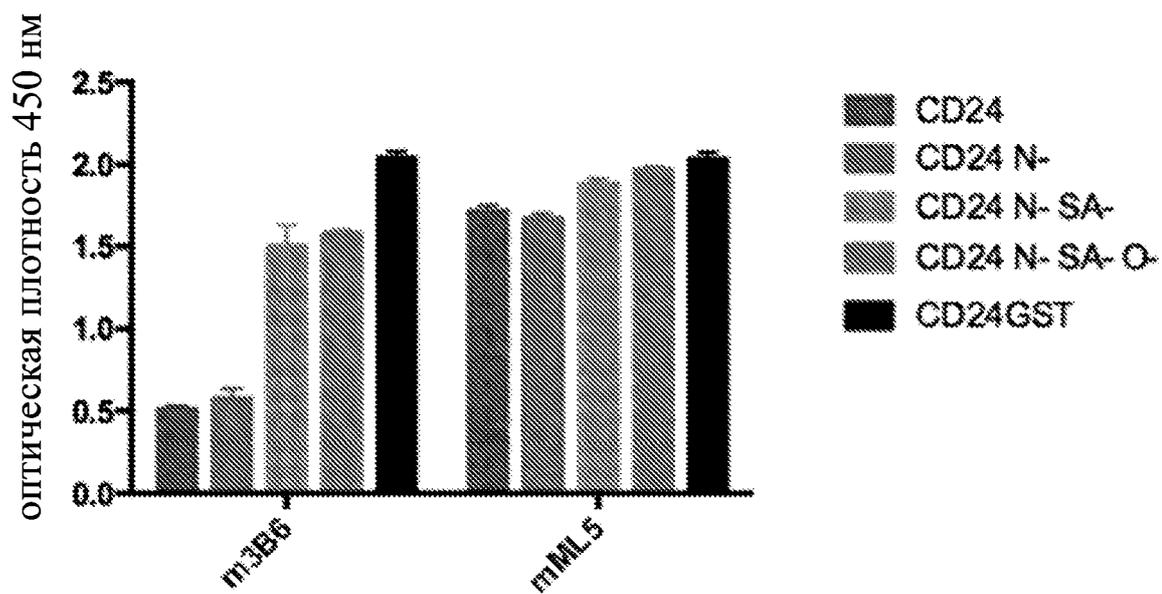
22. Применение по п. 21, где рак кожи представляет собой плоскоклеточный рак или меланому.

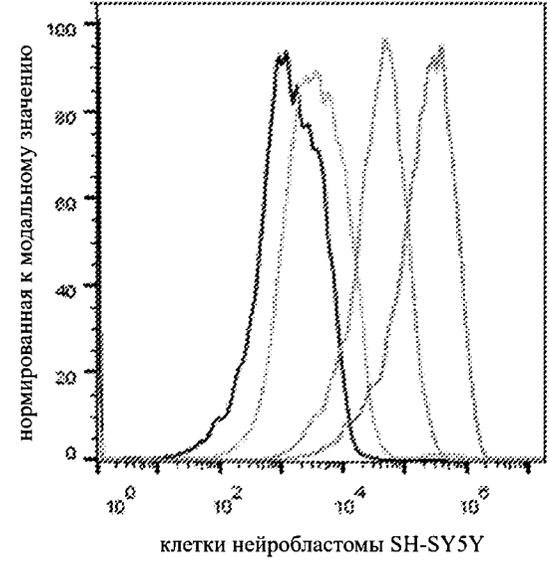
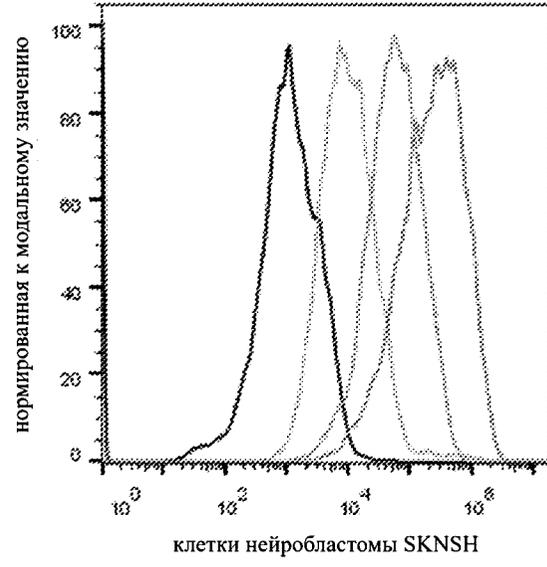
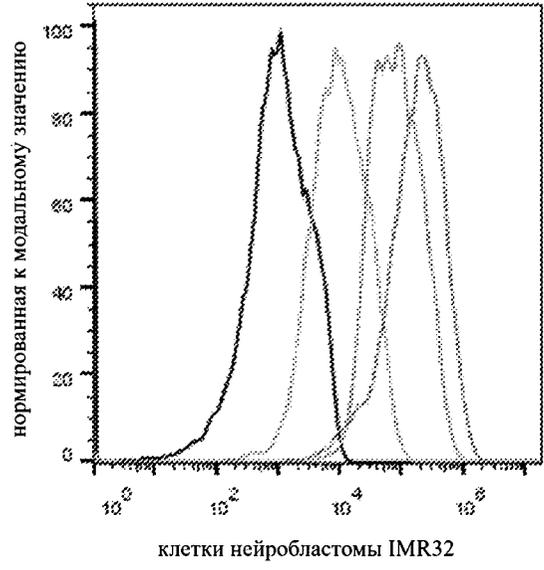
23. Применение по п. 21, где гемопозитическая опухоль лимфоидного происхождения представляет собой лейкоз, острый лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому или лимфому Беркетта.

24. Применение по п. 21, где гемопозитическая опухоль миелоидного происхождения представляет собой острый или хронический миелогенный лейкоз, или промиелоцитарный лейкоз.
25. Применение по п. 21, где опухоль мезенхимального происхождения представляет собой фибросаркому или рабдомиосаркому.
26. Применение по п. 21, где опухоль центральной и периферической нервной системы представляет собой астроцитому или шванному.
27. Применение по п. 21, где опухоль мезенхимального происхождения представляет собой фибросаркому, рабдомиосаркому или остеосаркому.
28. Применение по п. 21, где предраковое поражение представляет собой семейный аденоматозный полипоз или миелодиспластический синдром.
29. Применение по любому из пп. 21-28, где анти-CD24 антитело является одноцепочечным.
30. Применение по любому из пп. 21-29, где анти-CD24 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35.
31. Применение по любому из пп. 21-29, где анти-CD24 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35.
32. Применение по любому из пп. 21-31, где анти-CD24 антитело дополнительно включает константную область (Fc) иммуноглобулина человека.
33. Применение по любому из пп. 21-32, где биспецифическое антитело содержит: (а) первый домен антитела, содержащий указанное анти-CD24 антитело, и (b) второй домен антитела, содержащий второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
34. Применение по п. 33, где второй домен антитела привлекает иммунные эффекторные Т-клетки к раковым клеткам для иммунотерапии рака и/или связывает CD3, α -цепь TCR, β -цепь TCR, γ -цепь TCR или δ -цепь TCR.
35. Применение по п. 34, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3.

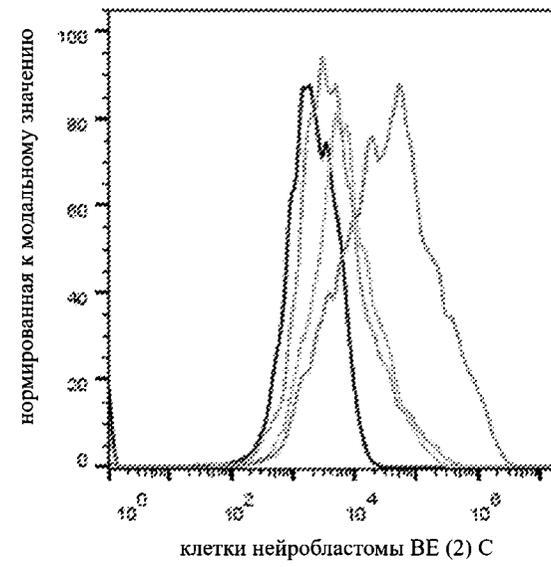
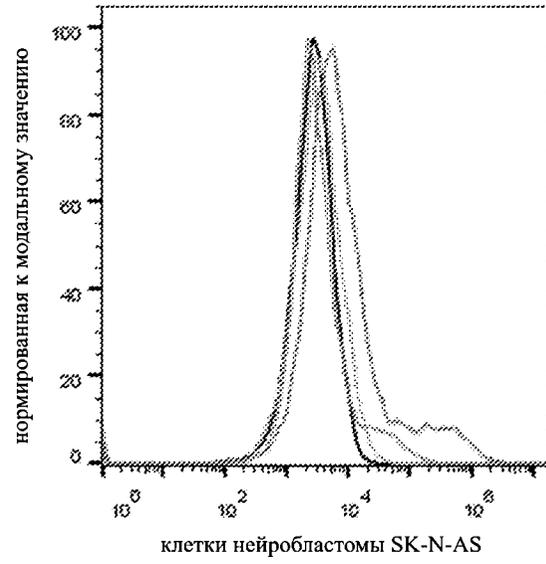
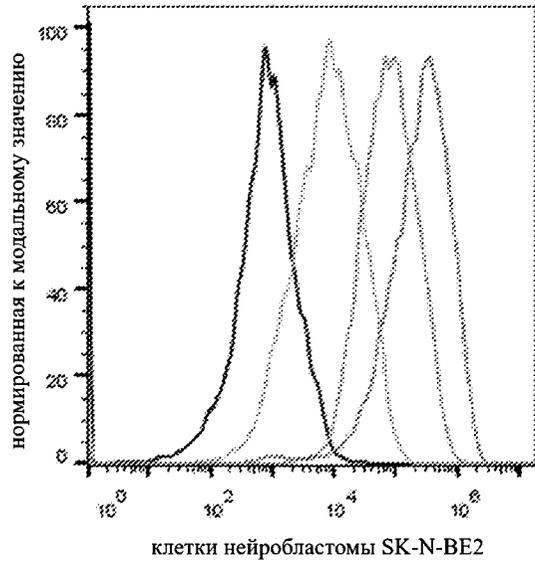
36. Применение по п. 35, где второй домен антитела содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.
37. Применение по любому из пп. 29-32, где химерный рецептор антигена содержит указанное одноцепочечное антитело.
38. Применение по любому из пп. 21-32, где конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) содержит указанное анти-CD24 антитело, связанное с эффекторным фрагментом, выбранным из группы, состоящей из цитотоксического лекарственного средства, белкового токсина и радионуклида.
39. Применение по любому из пп. 21-38, где лекарственное средство предназначено для комбинирования со вторым противораковым средством.
40. Применение по п. 39, где второе противораковое средство включает анти-PD-1 антитело, анти-CTLA-4 антитело или LAG3.

Фиг. 1





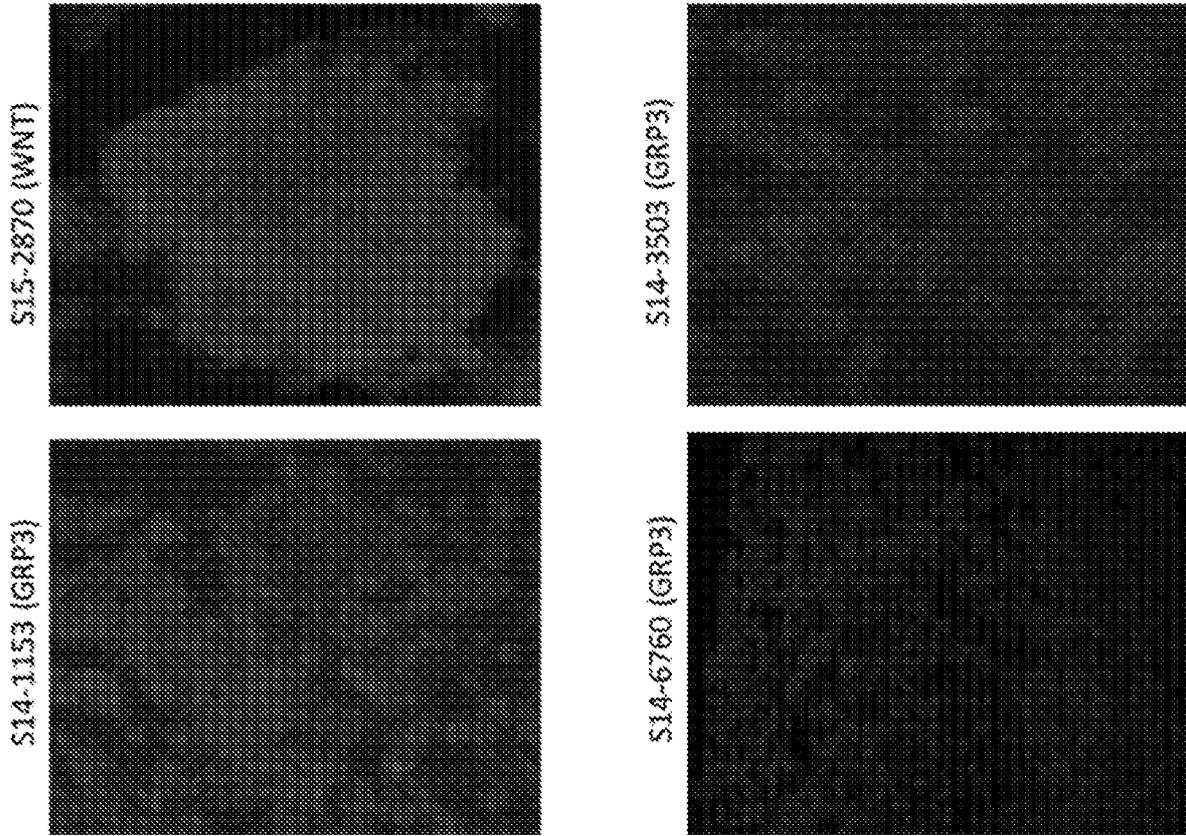
ML5
SN3
контроль



Фиг. 2А

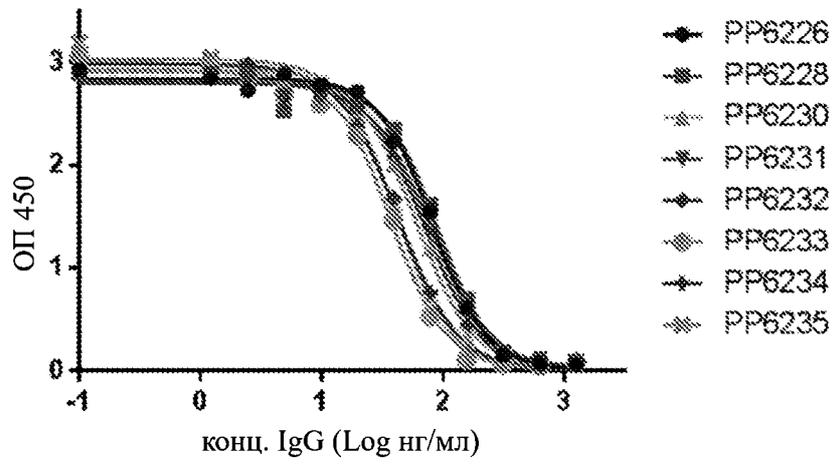
Фиг. 2В

386 DAPI



Фиг. 3

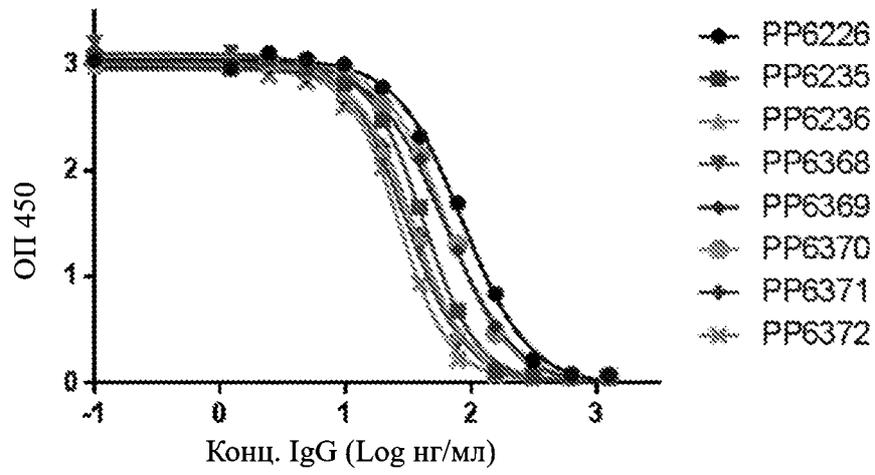
Конкурентный ELISA биотин-GST-CD24



	PP6226	PP6228	PP6230	PP6231	PP6232	PP6233	PP6234	PP6235
IC50 (нг/мл)	81.38	88.82	58.94	76.77	71.25	37.24	42.61	41.09

Фиг. 4

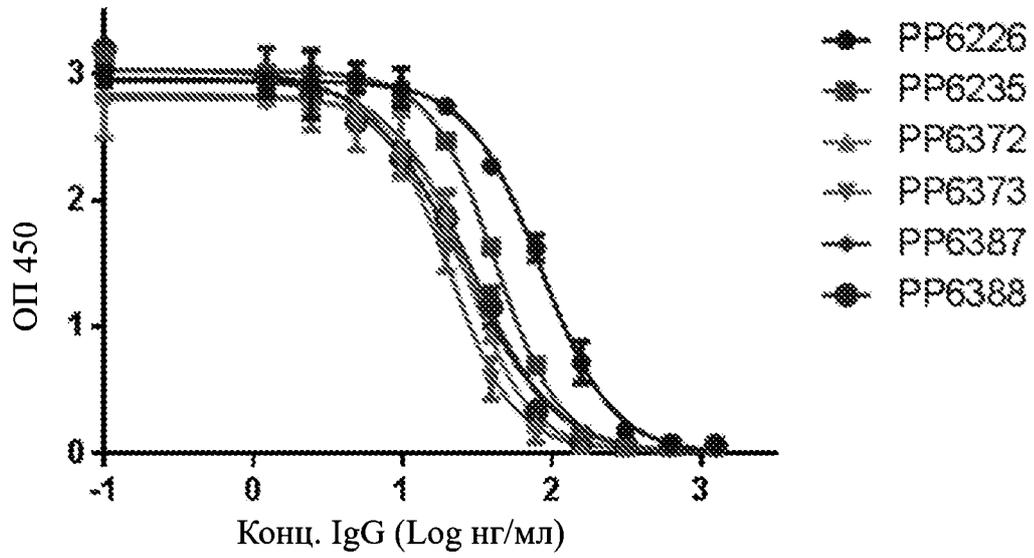
Конкурентный ELISA биотин-GST-CD24



	PP6226	PP6235	PP6236	PP6368	PP6369	PP6370	PP6371	PP6372
IC50 (нг/мл)	85.64	41.87	33.83	29.85	61.12	64.23	34.52	26.89

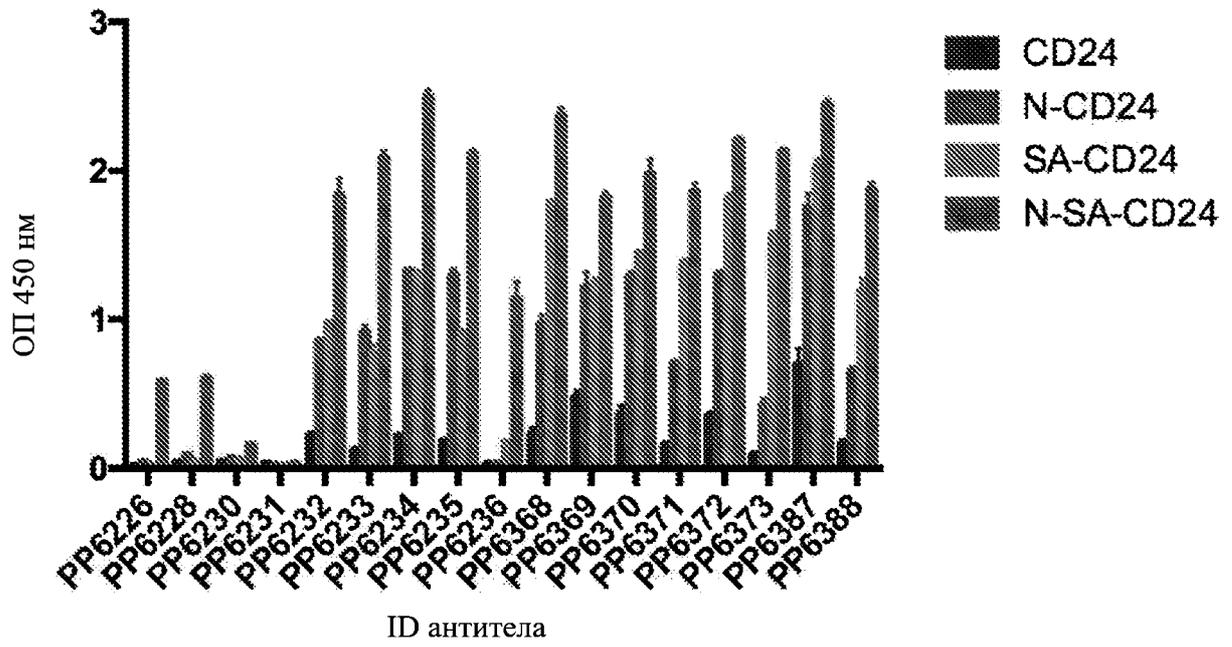
Фиг. 5

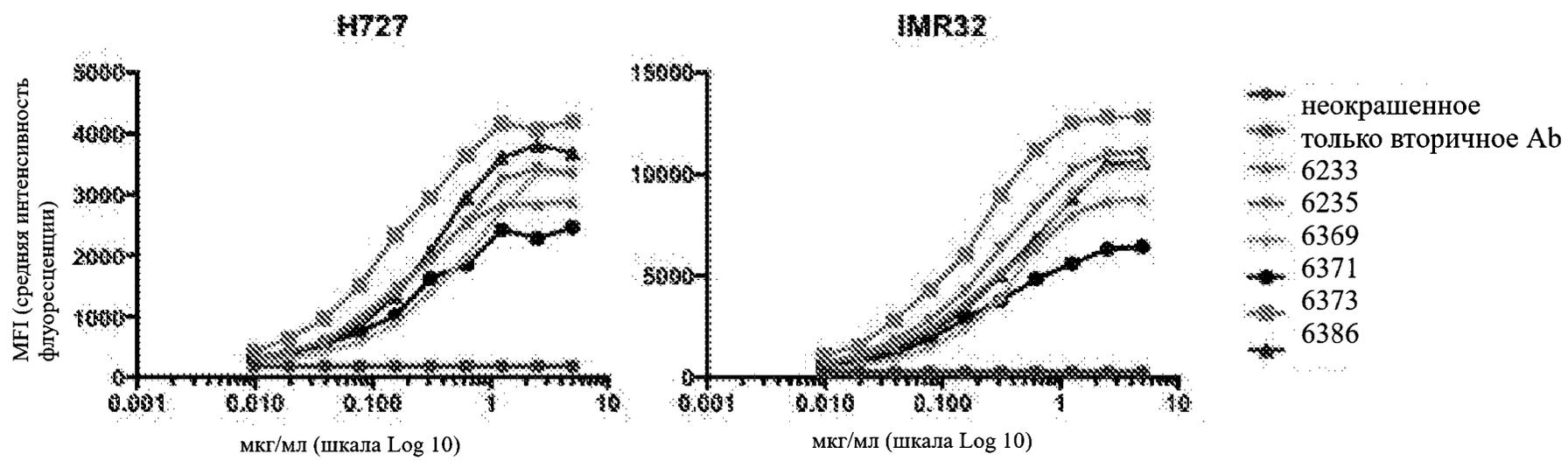
Конкурентный ELISA биотин-GST-CD24



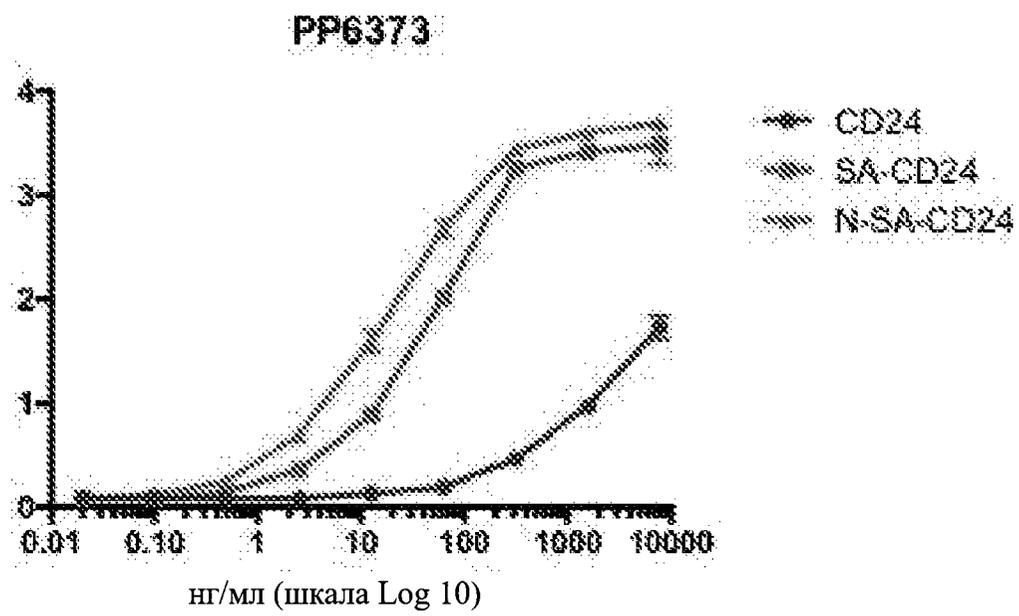
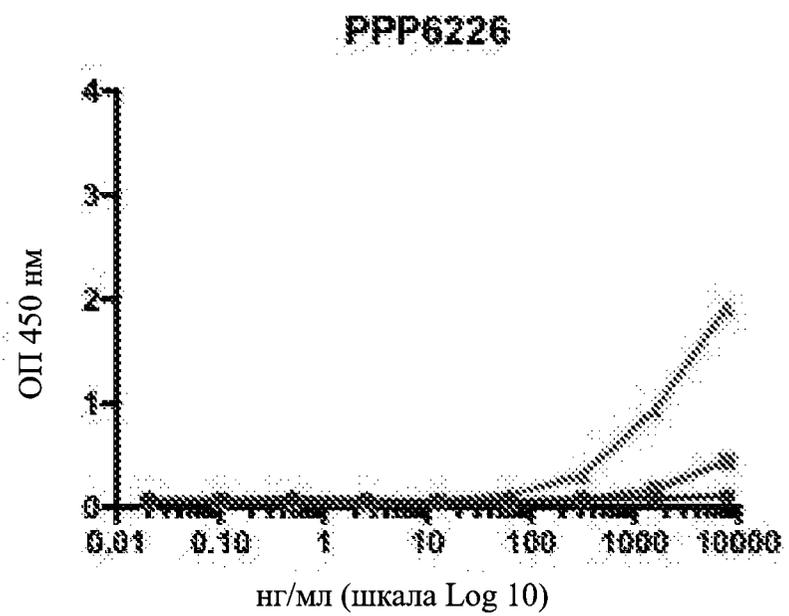
	PP6226	PP6235	PP6372	PP6373	PP6387	PP6388
IC50 (нГ/мл)	83.39	41.48	26.83	20.68	28.43	24.66

Фиг. 6





Фиг. 7



Фиг. 8

Фиг. 9

Картирование сайта связывания 3В6 посредством пептидного ингибирования

Аминокислотная

последовательность hCD24:

SETT TGTSSNSSQS TSNSGLAPNP TNATTK

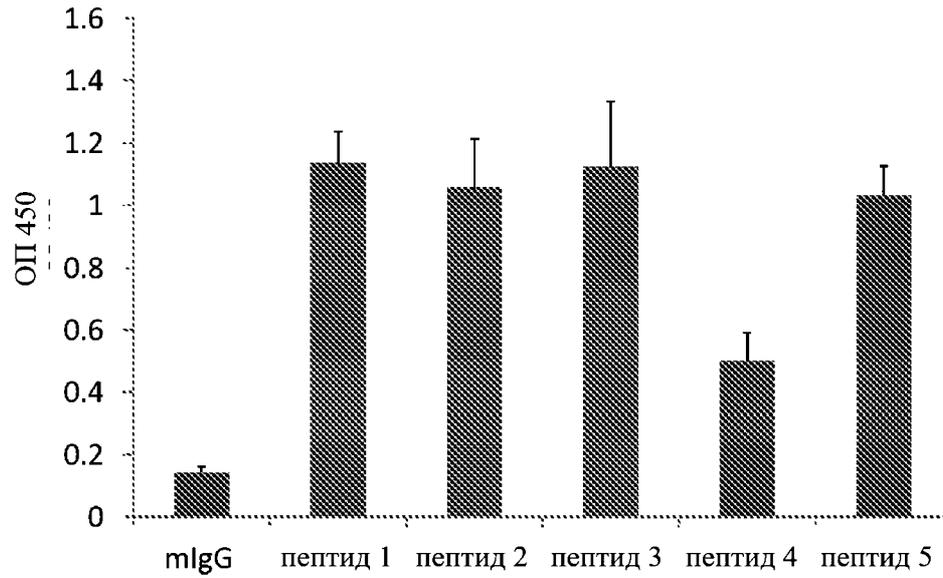
пептид 1: SETT TGTSSN

пептид 2: GTSSNSSQS T

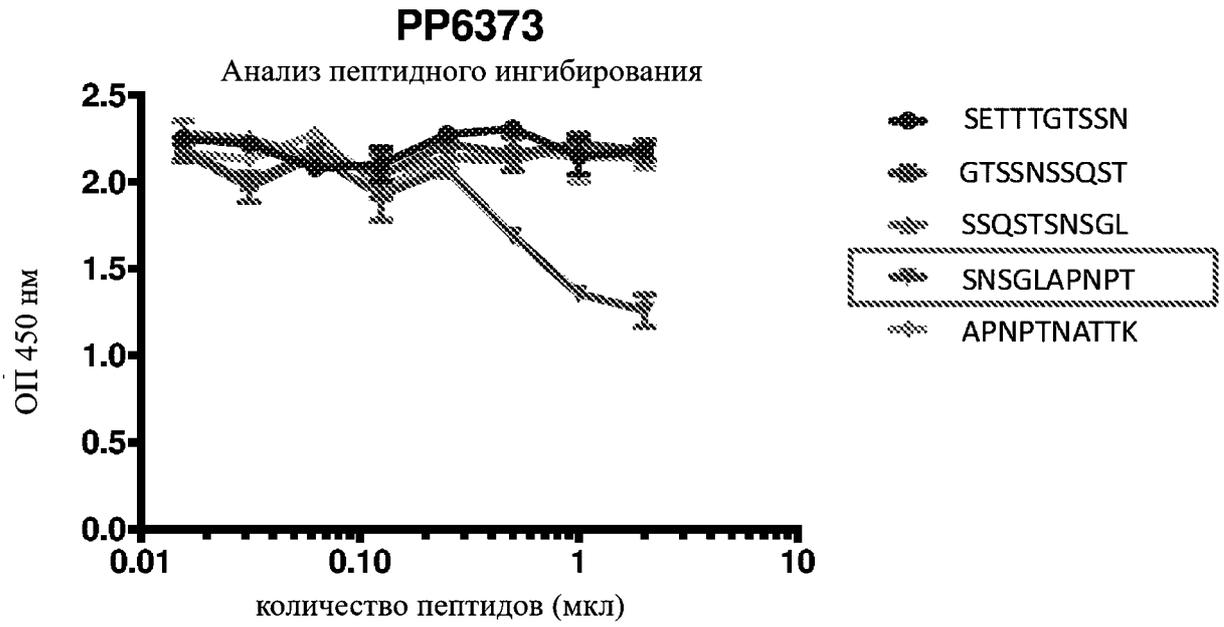
пептид 3: SSQS TSNSGL

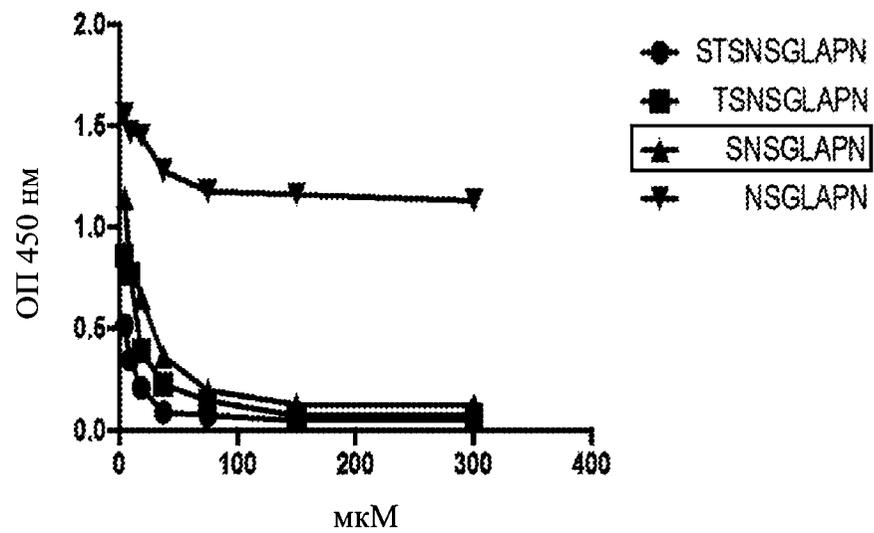
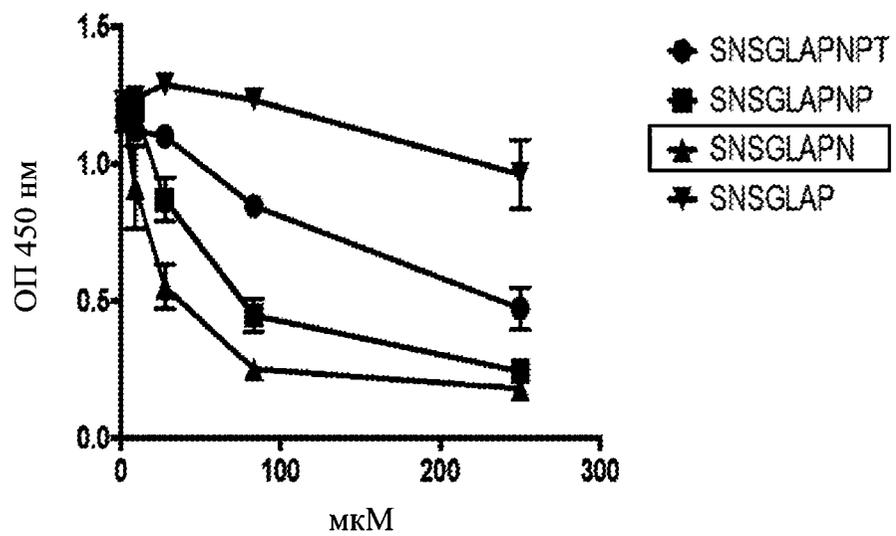
пептид 4: SNSGLAPNP T*

пептид 5: APNP TNATTK



Фиг. 10

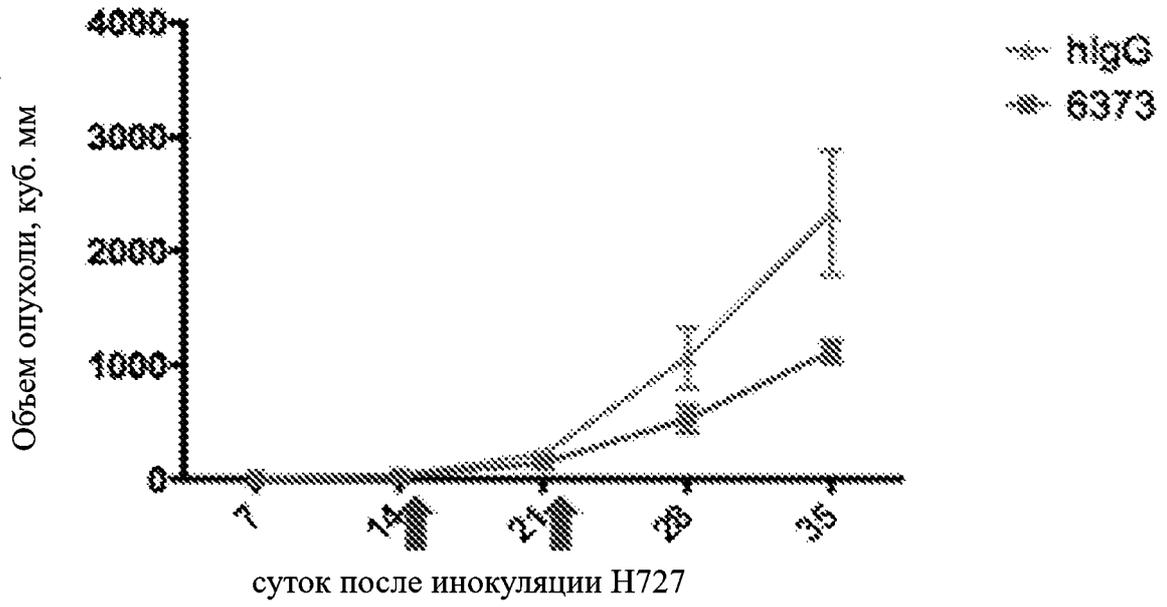




Фиг. 11

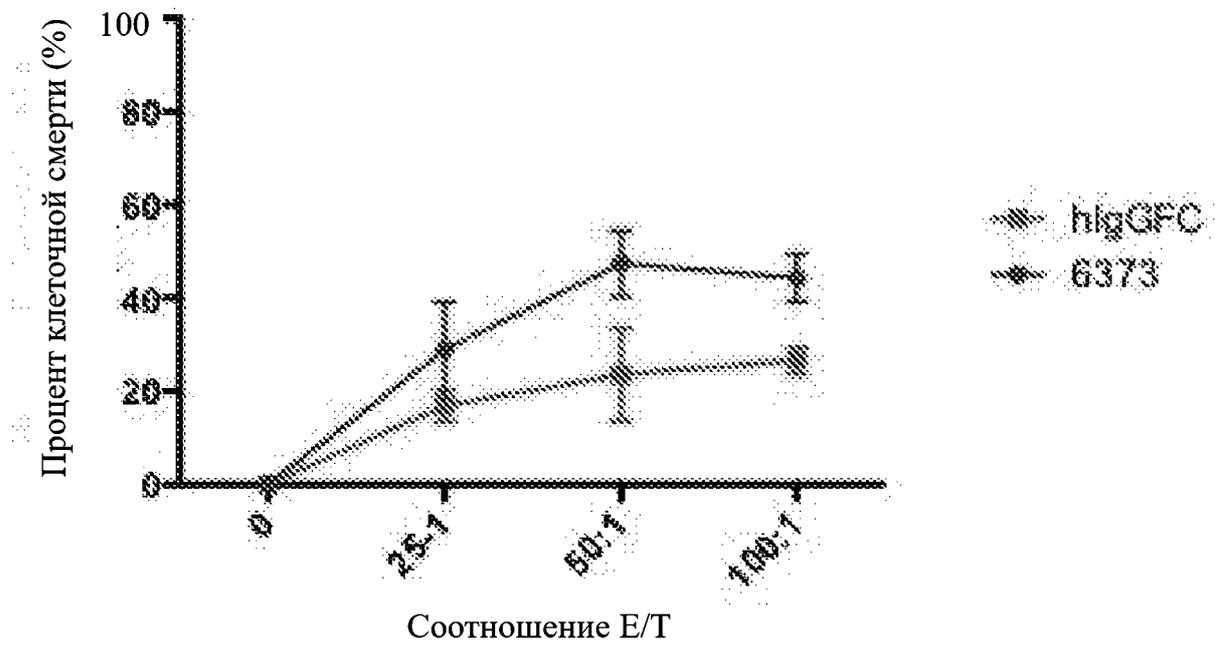
Фиг. 12

Голые мыши, инокулированные NCI-H727

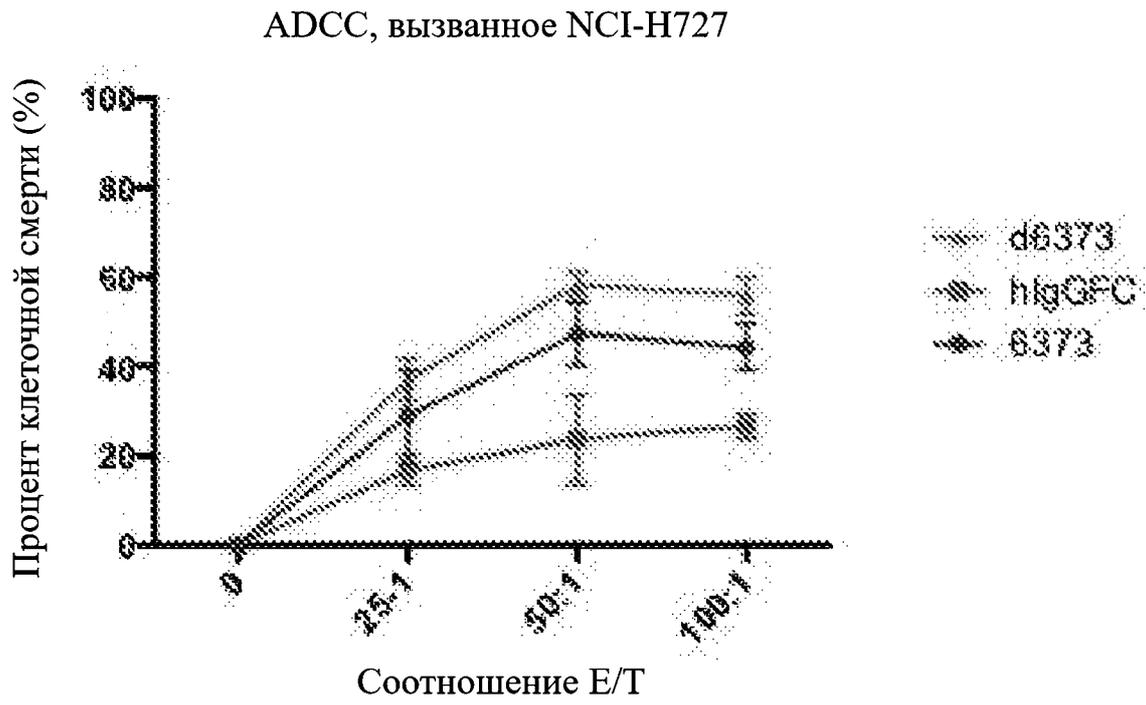


Фиг. 13

ADCC, вызванное NCI-H727



Фиг. 14

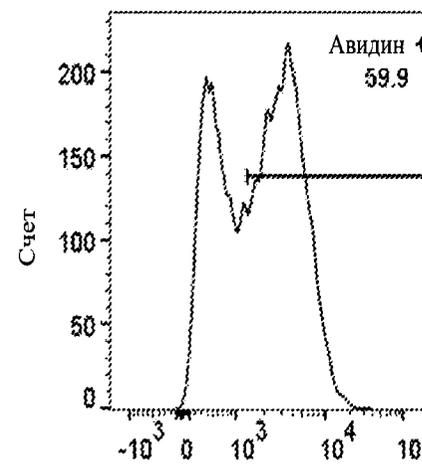
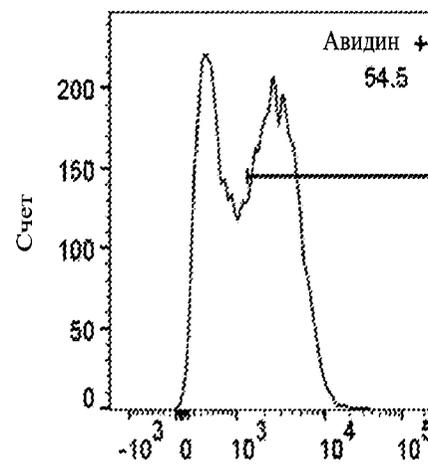
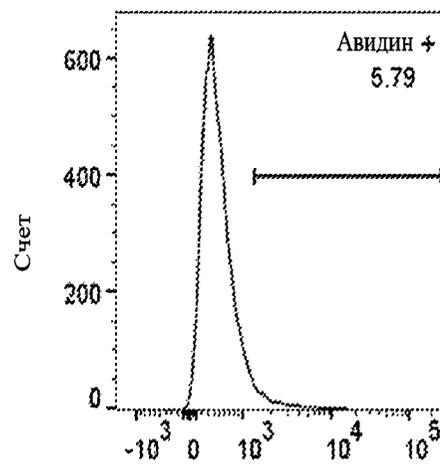
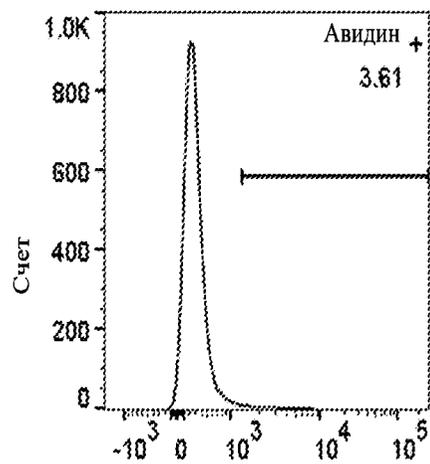


PP6373

ОКТ3

PP6373-выступ и ОКТ3-впадина

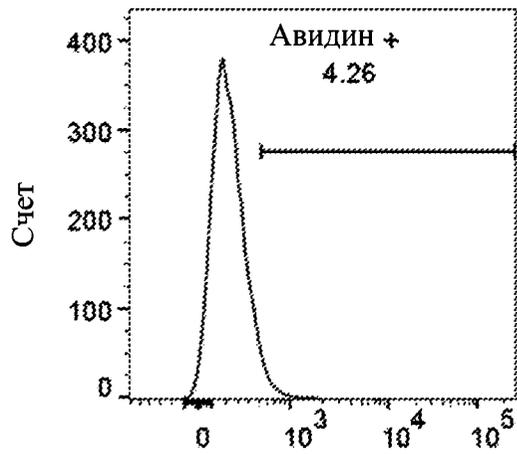
PP6373-впадина и ОКТ3-выступ



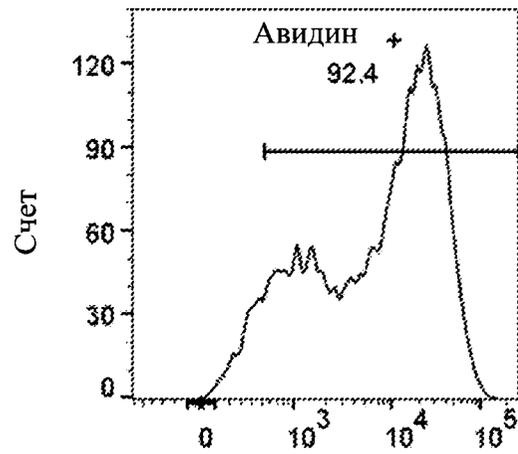
PE-стрептавидин

Фиг. 15

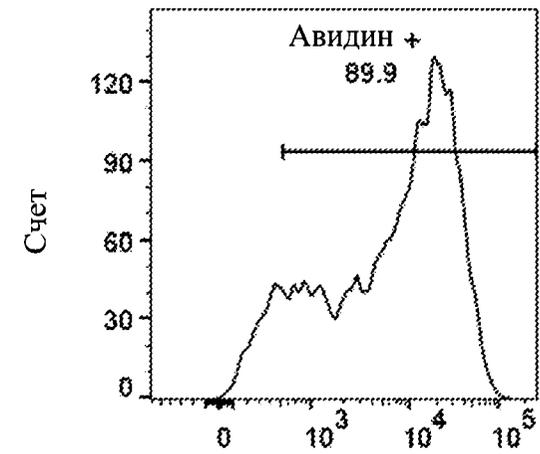
Отрицательный контроль



PP6373-ОКТ3

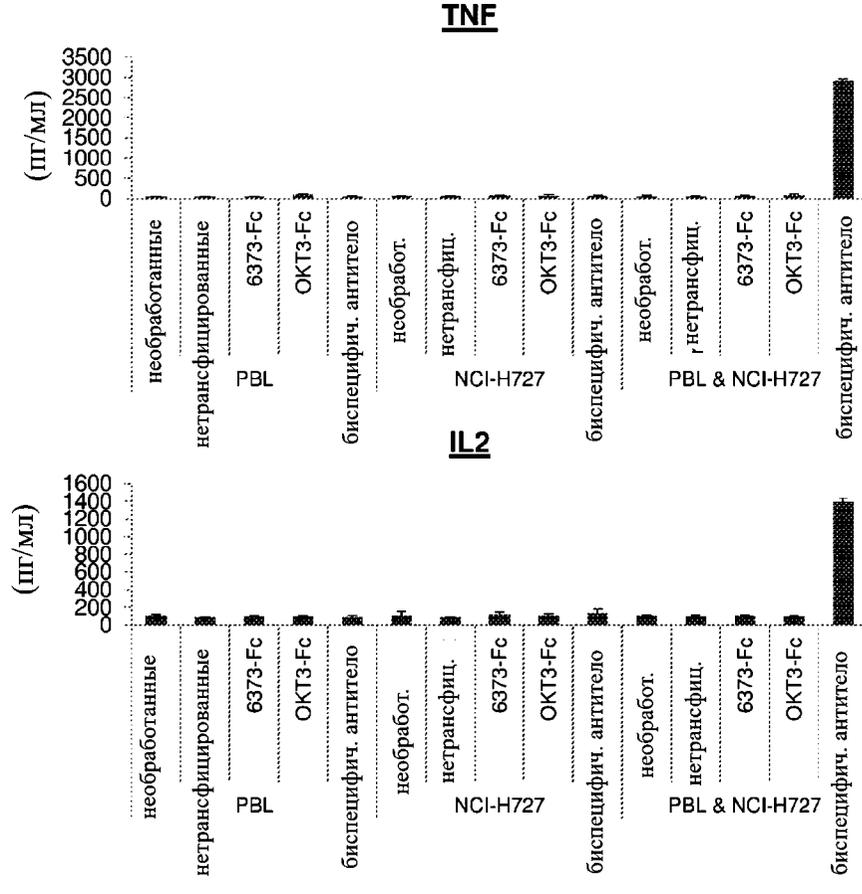
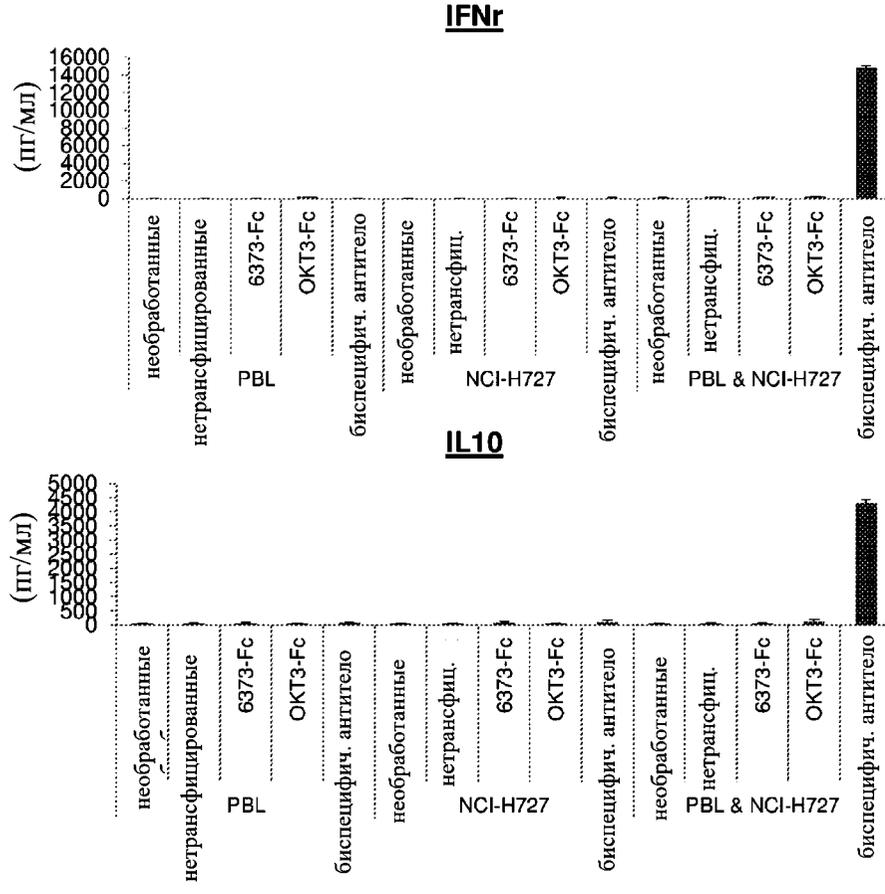


ОКТ3-PP6373

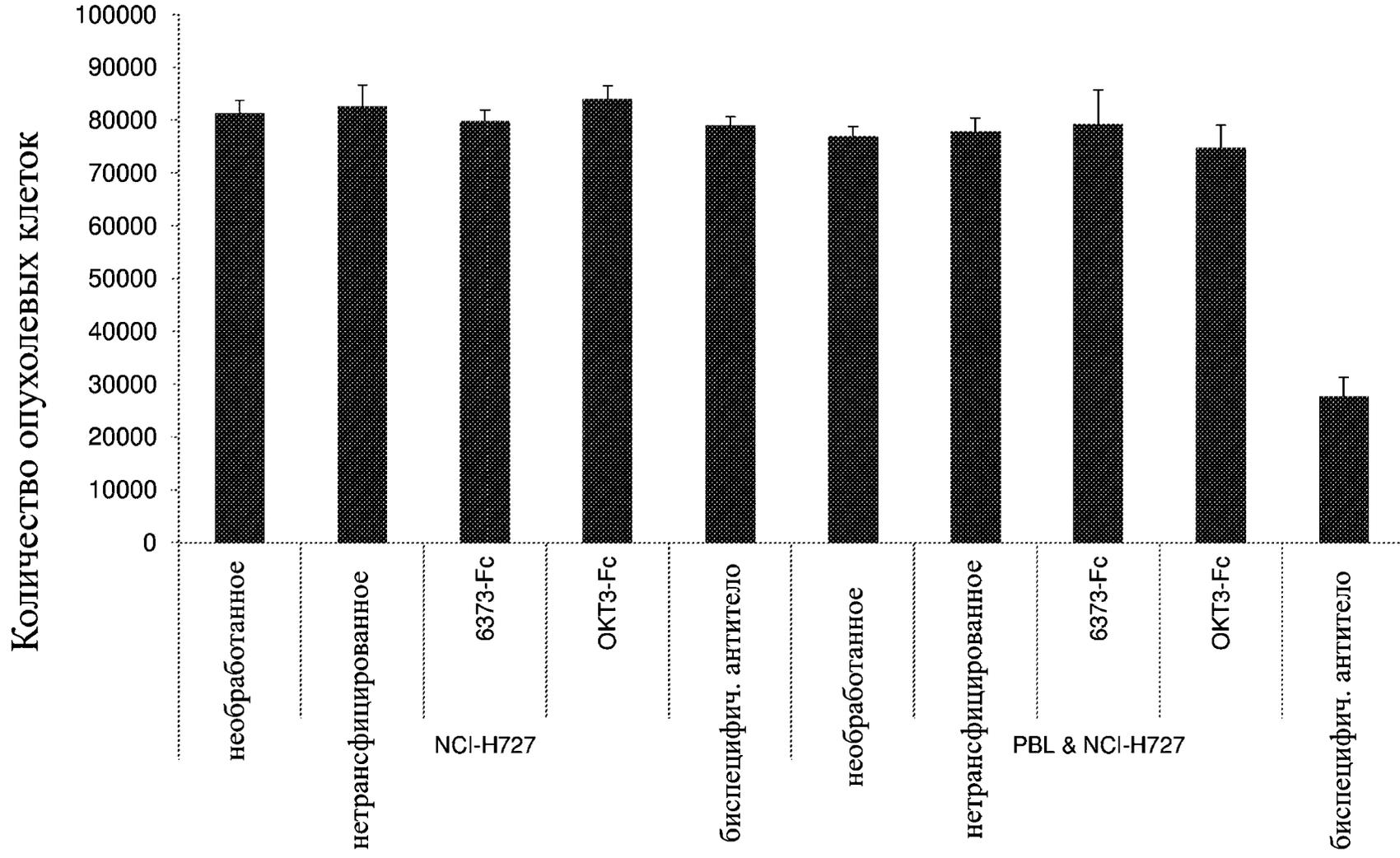


PE-стрептавидин

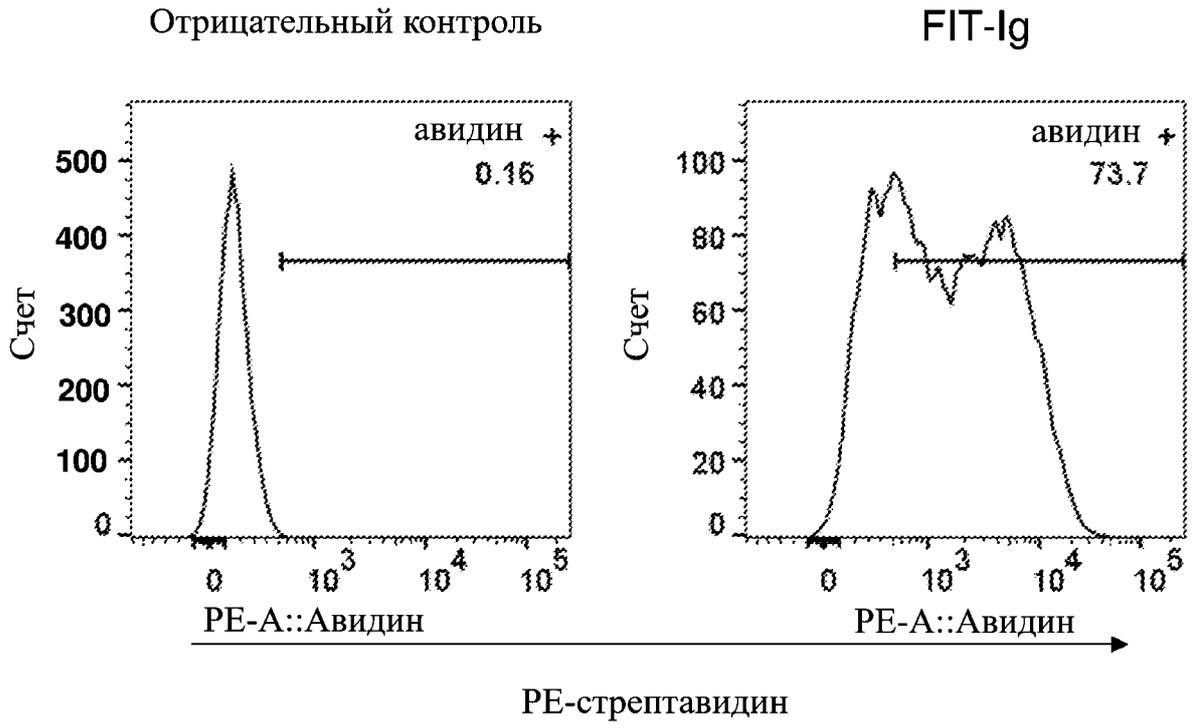
Фиг. 16

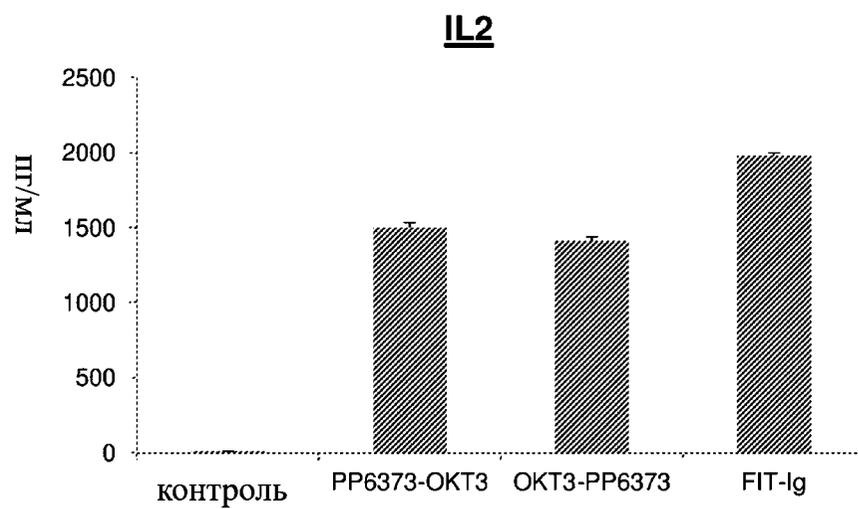
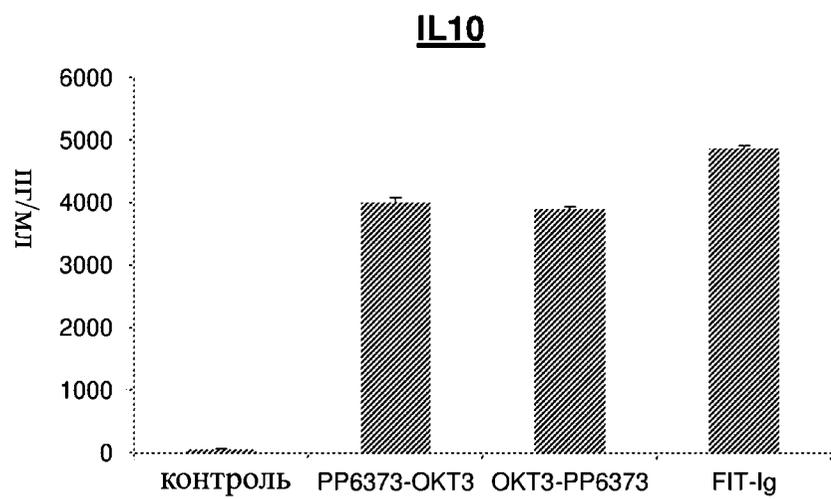
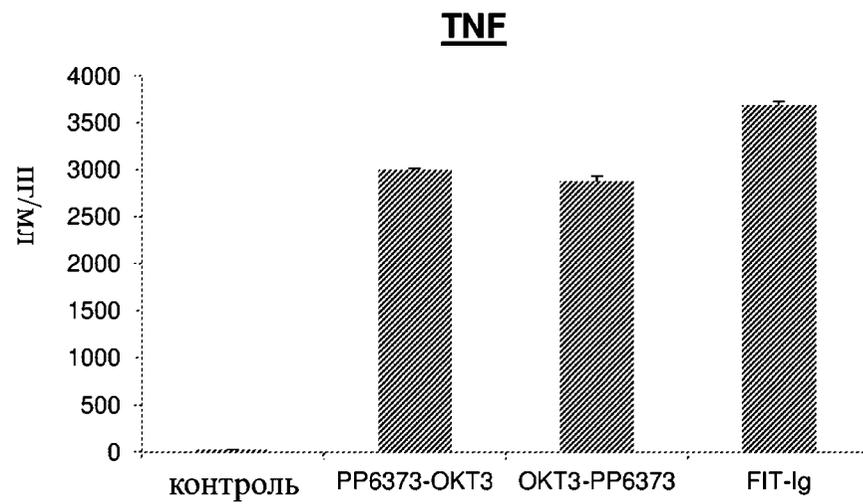
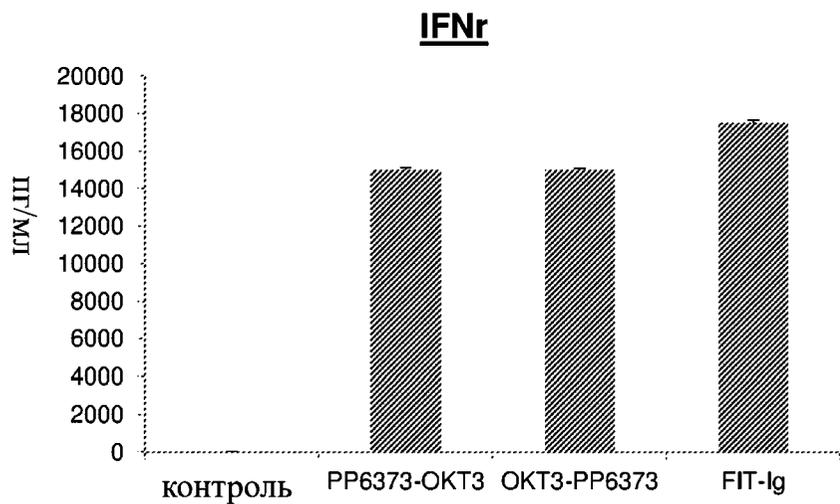


Фиг. 17

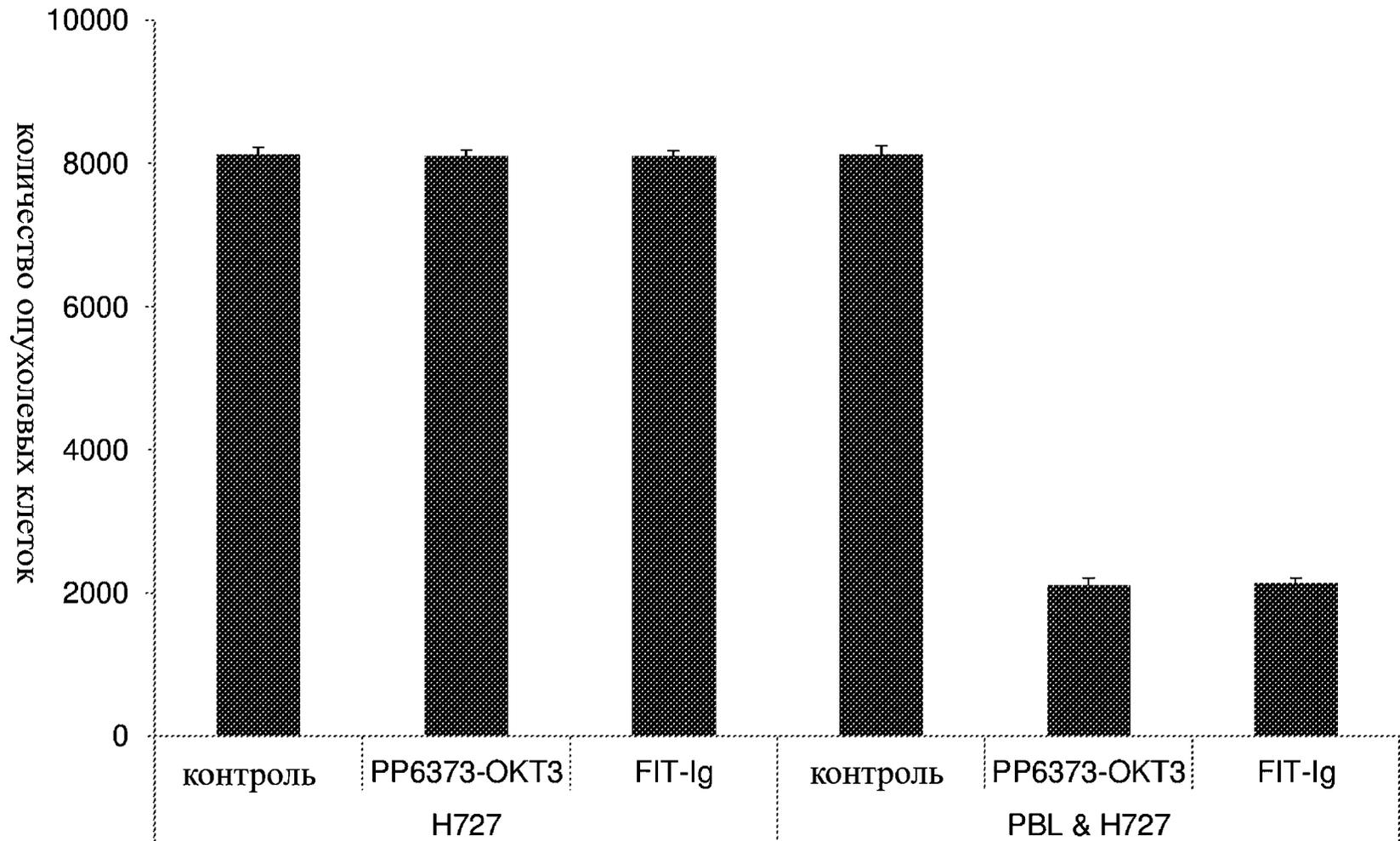


Фиг. 19

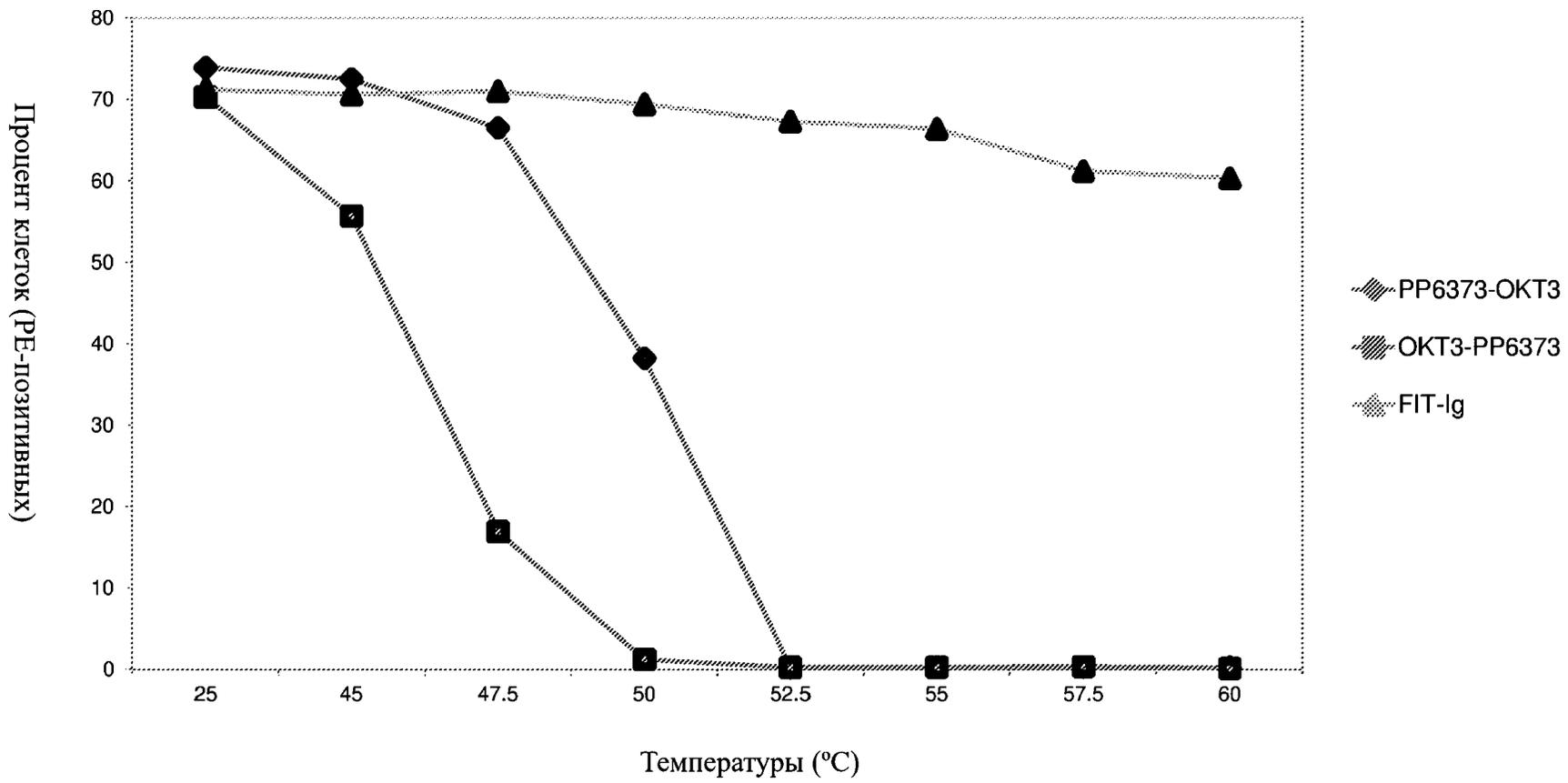




Фиг. 20



Фиг. 21

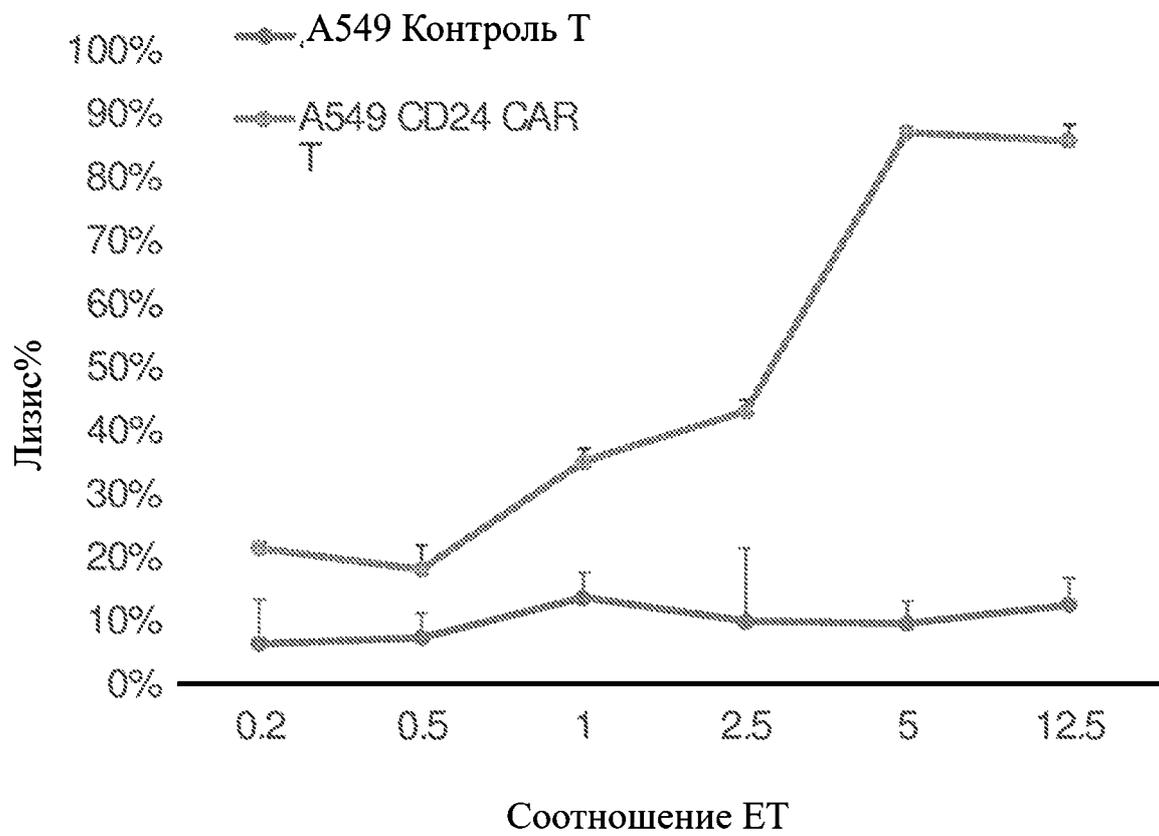


Фиг. 22

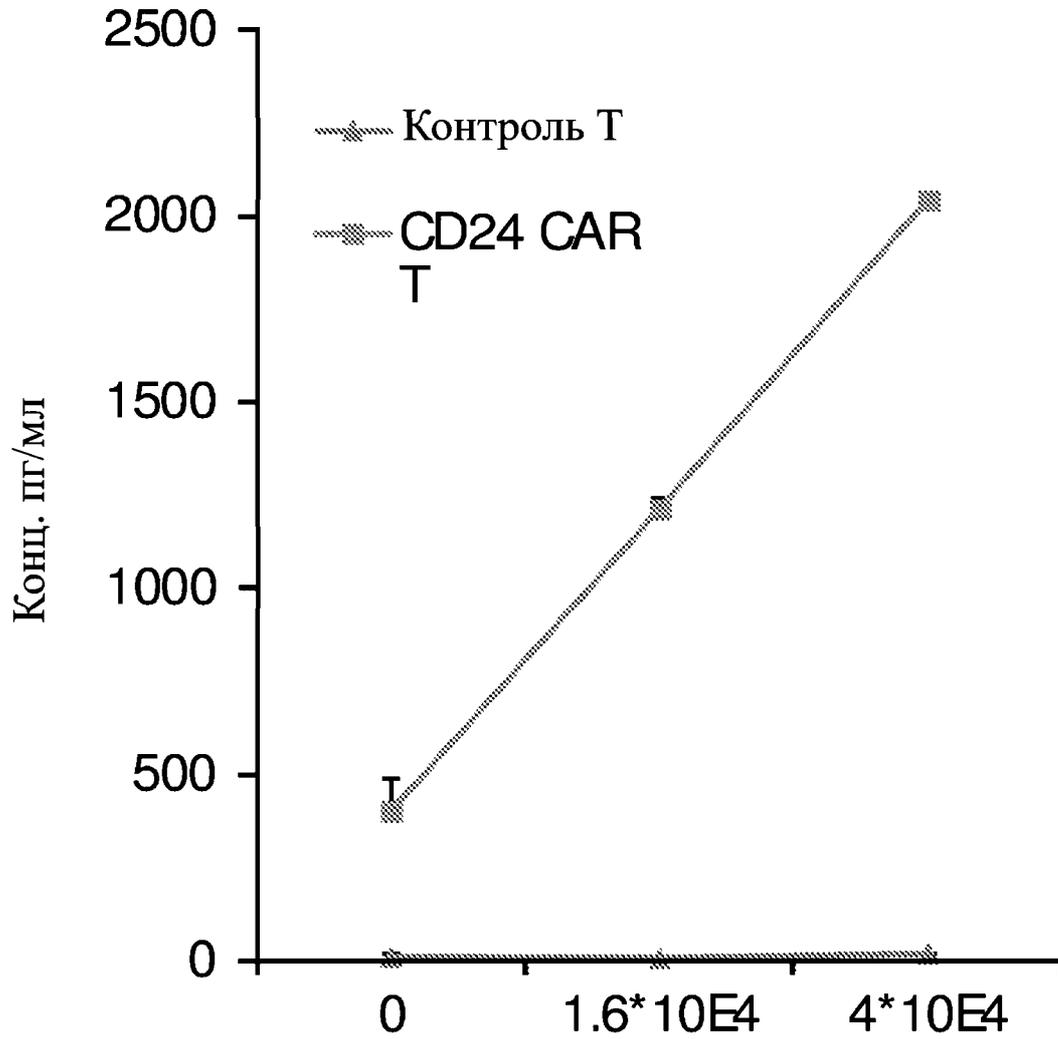
Фиг. 23



Уничтожение клеток A549 in vitro

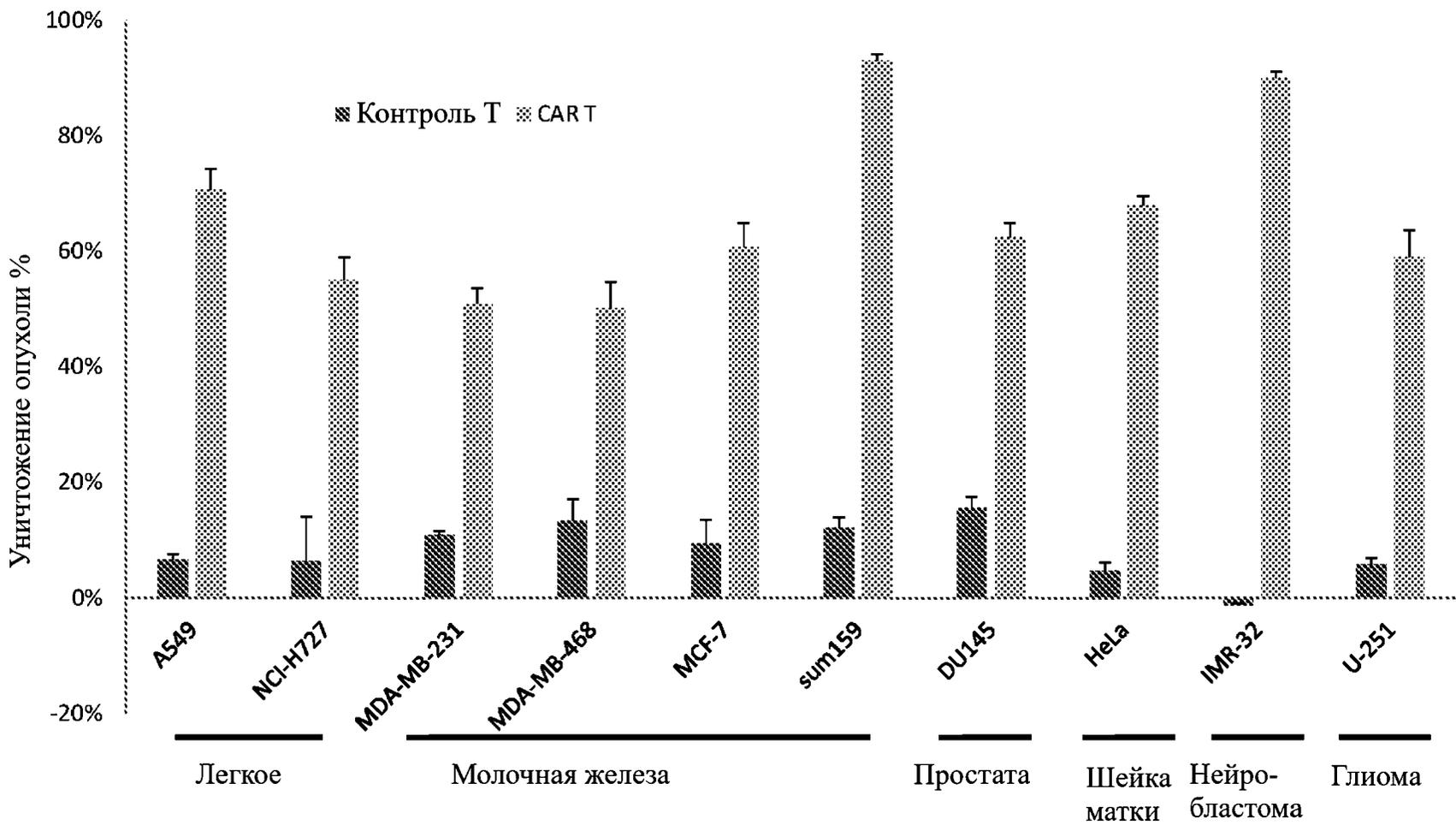


Фиг. 25

IFN γ 

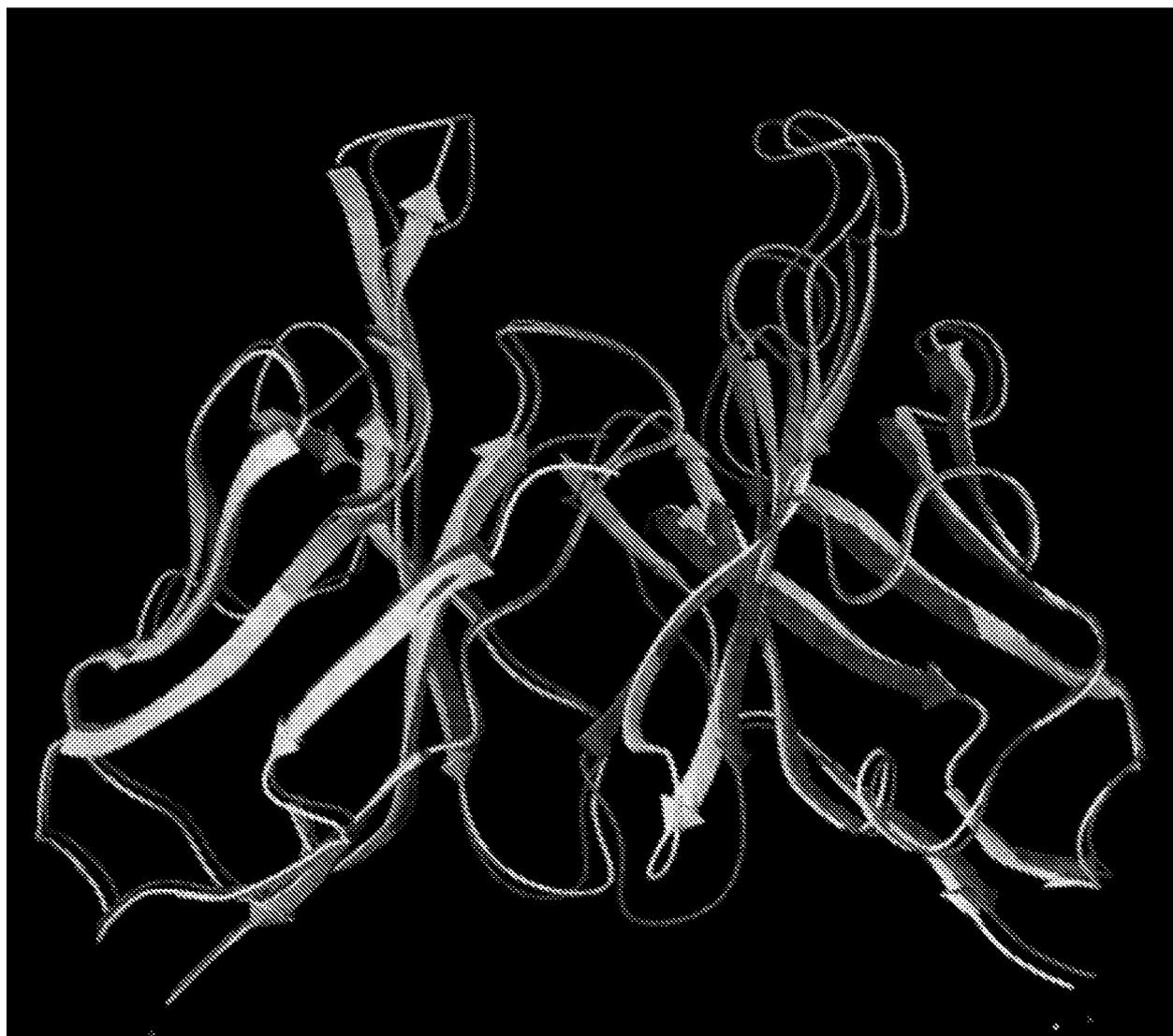
Количество
опухолевых клеток

T-клетка 4*10⁴



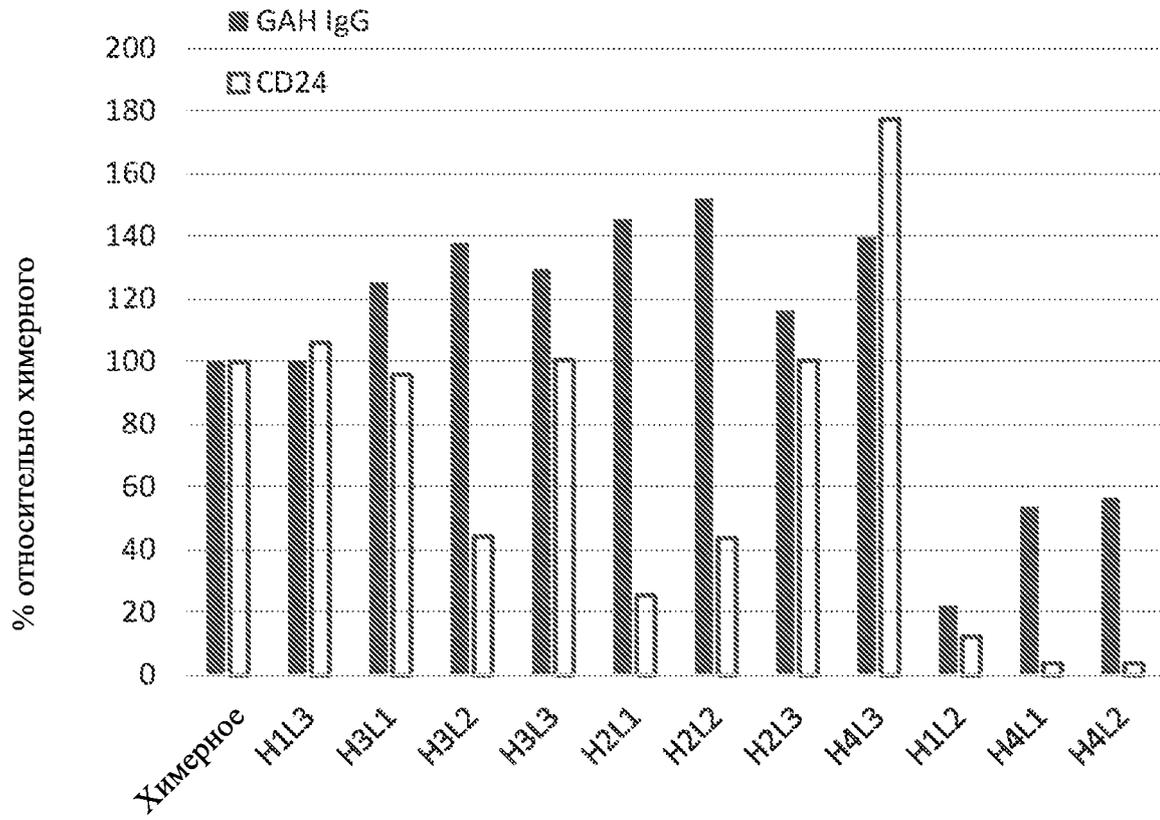
Фиг. 26

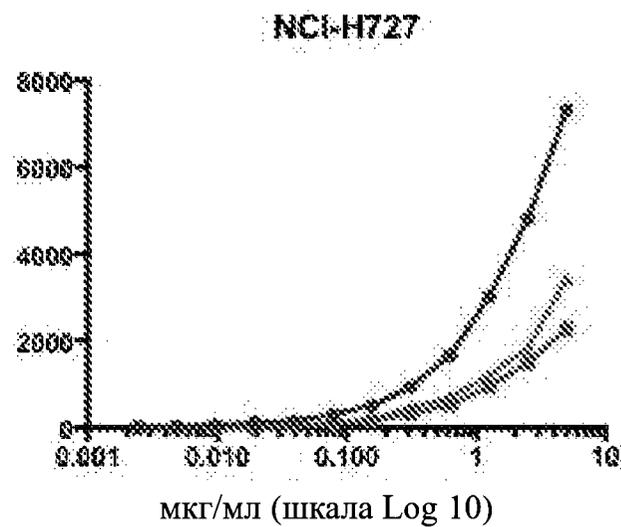
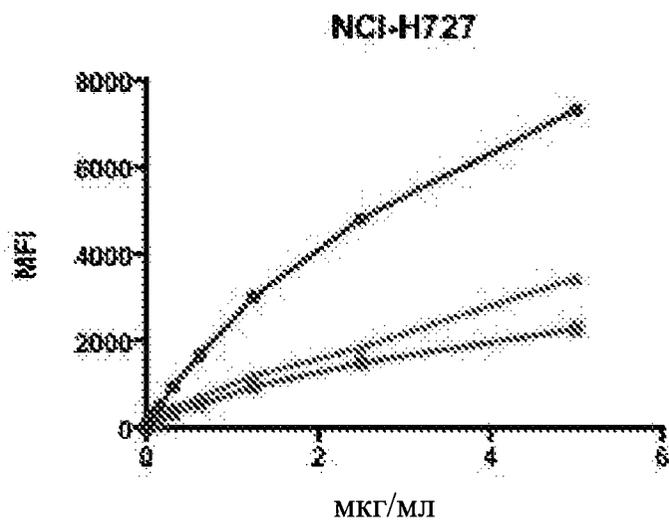
Фиг. 27



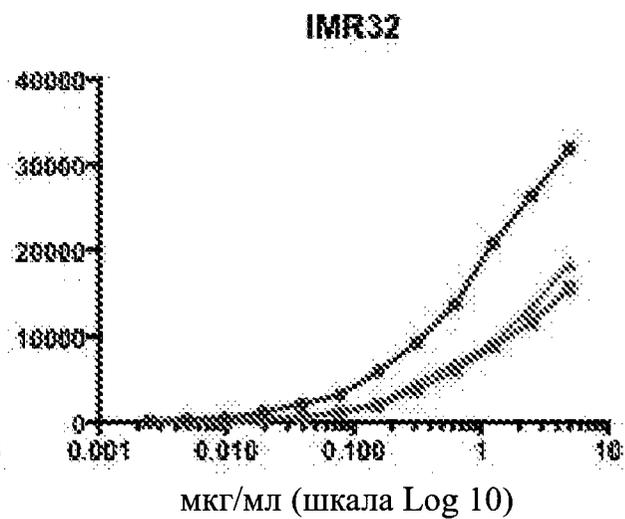
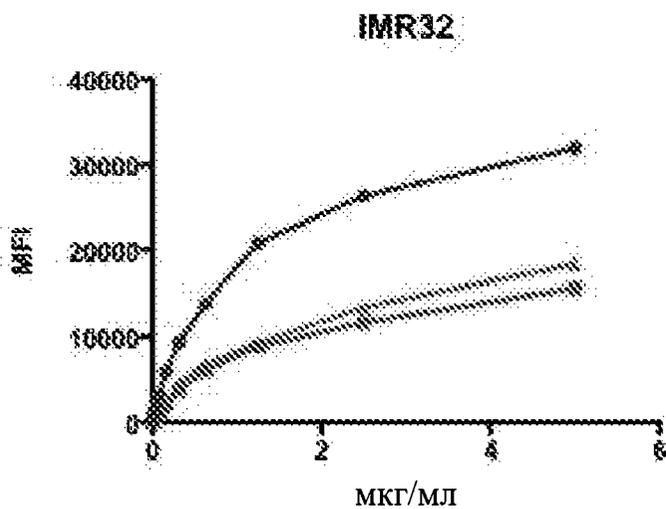
Фиг. 28

Характеристика трансфекций по экспрессии и связыванию





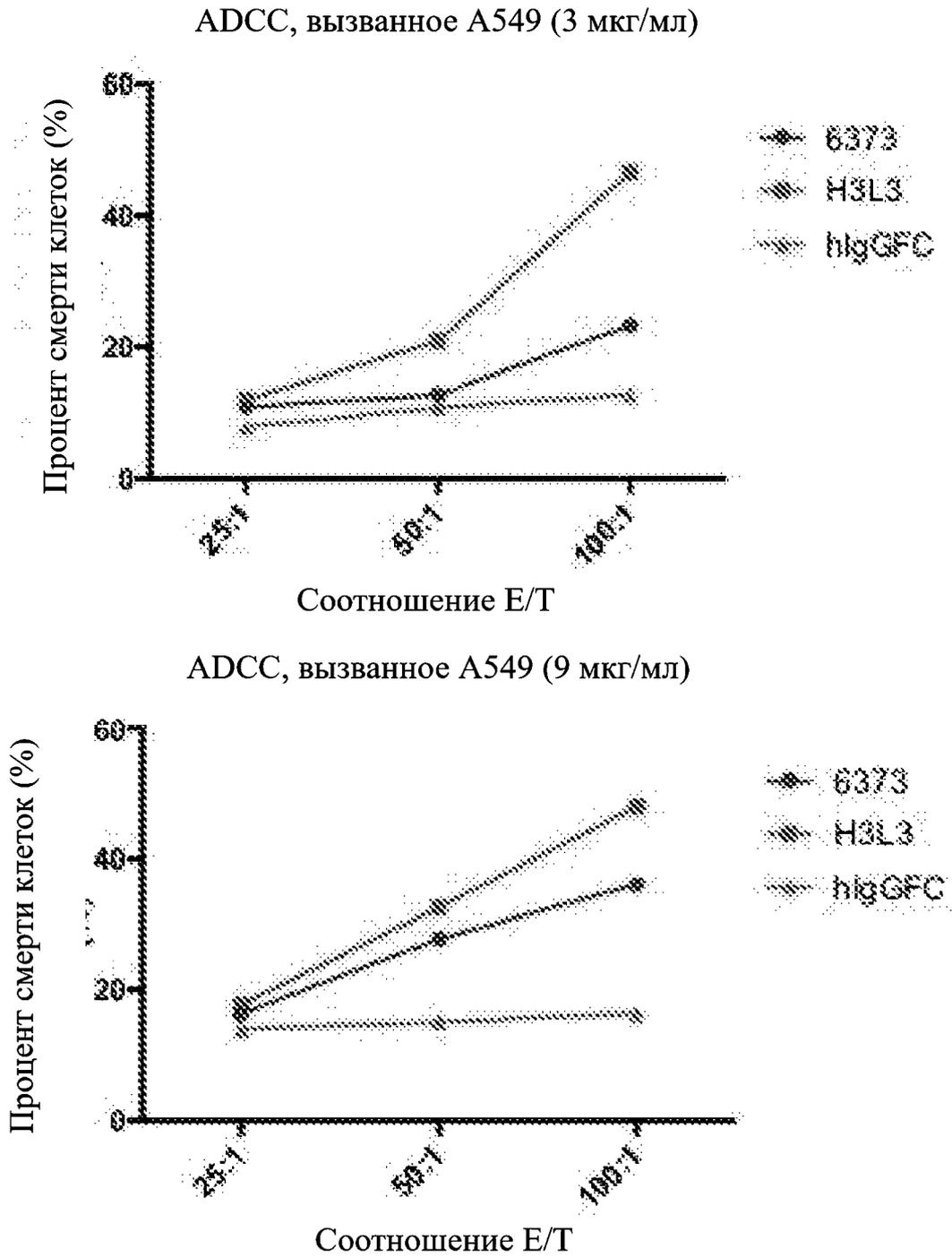
◆ 6373
 ▨ H2L3
 ▩ H3L3

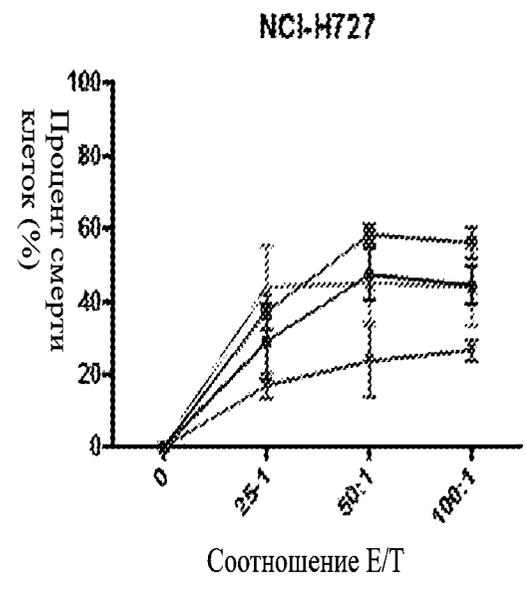
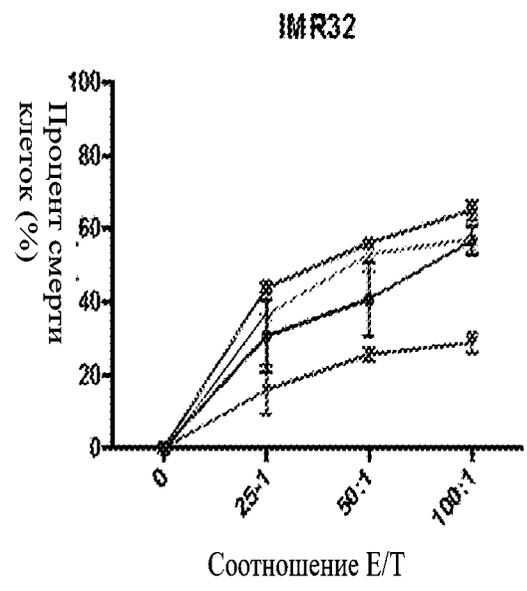
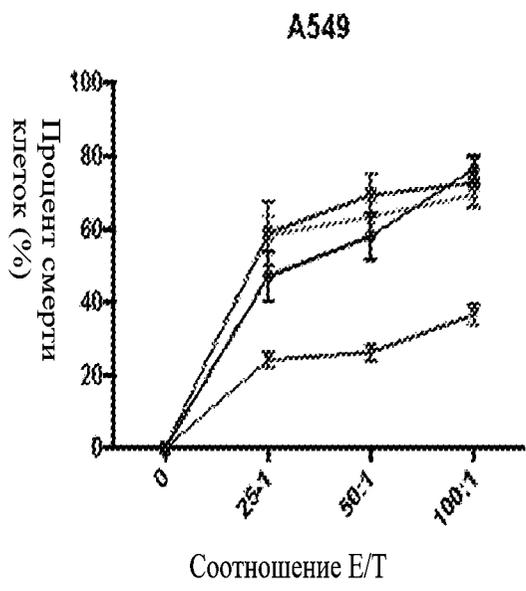


◆ 6373
 ▨ H2L3
 ▩ H3L3

Фиг. 29

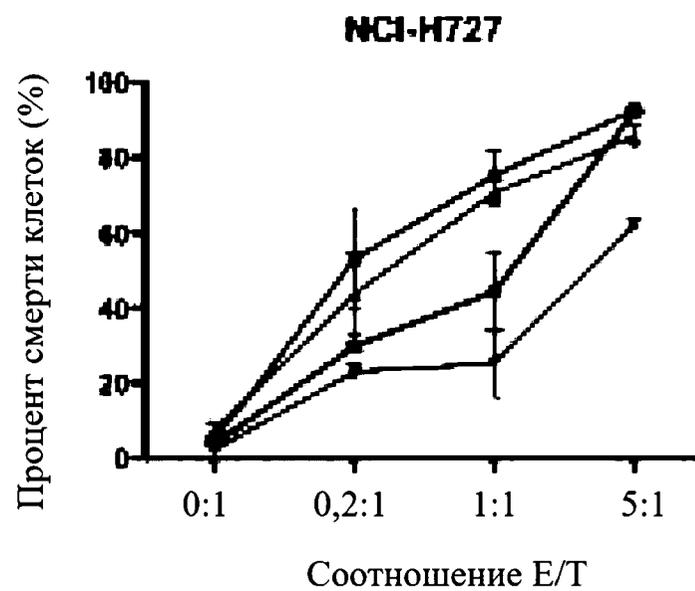
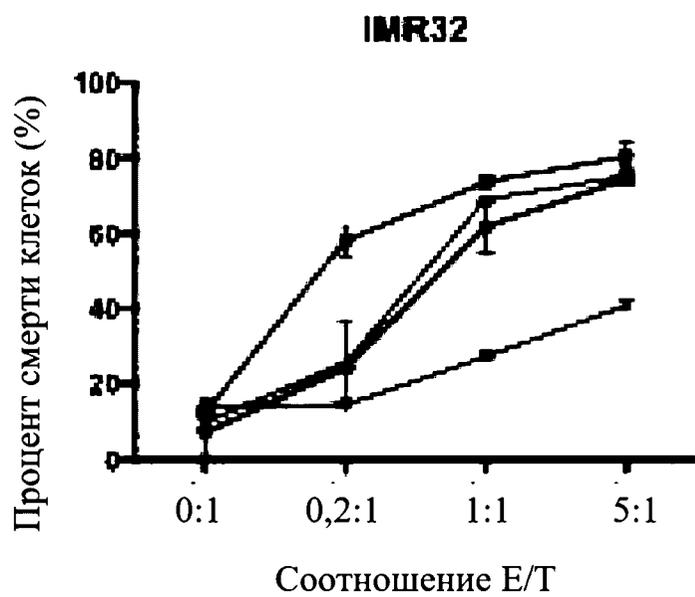
Фиг. 30





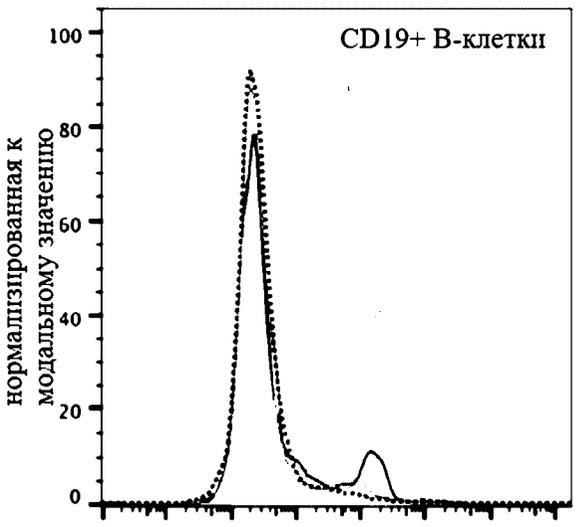
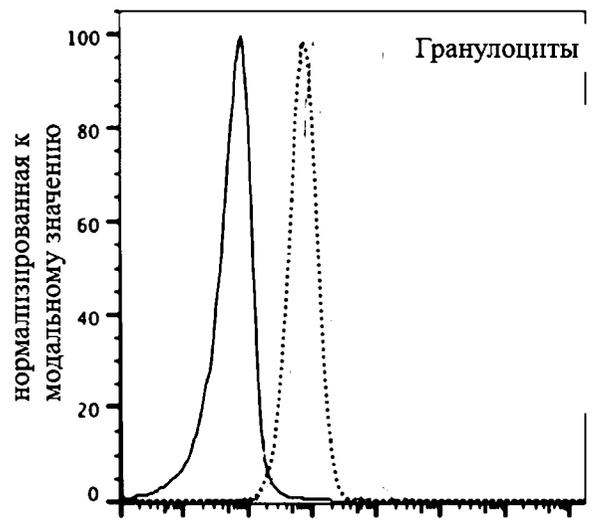
- hlgGFC
- H3L3
- d6373
- 6373

Фиг. 31

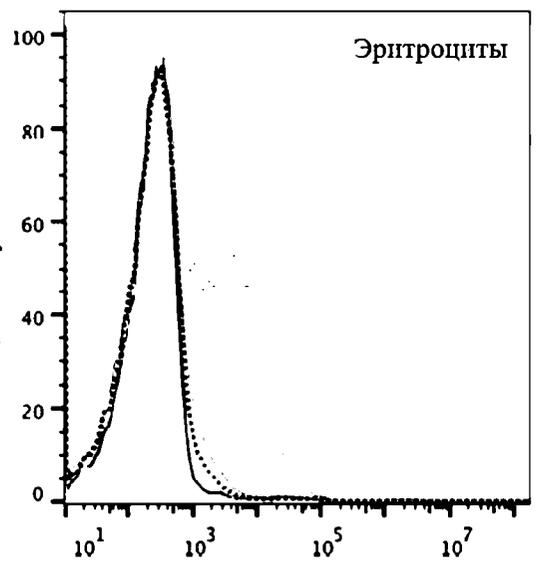
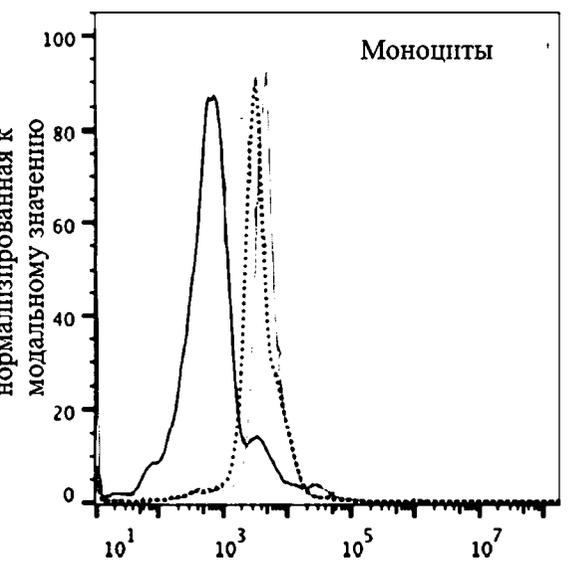
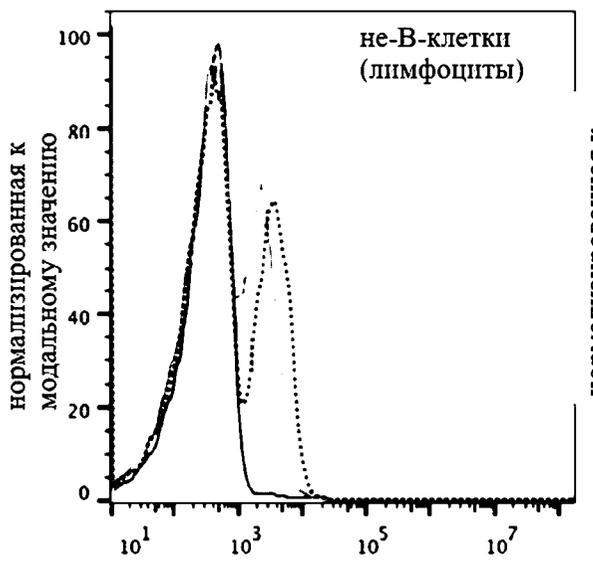


- hlgGFC
- H3L3
- d6373
- 6373

Фиг. 32



	название образца
<input type="checkbox"/>	A05 H2L3.fcs
<input type="checkbox"/>	A04 H3L3.fcs
<input type="checkbox"/>	A03 6373.fcs
<input type="checkbox"/>	A02 ML5.fcs
<input type="checkbox"/>	A01 неокраш. пропущ. первичный.fcs



Фиг. 33

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 060275-0800-01PC00	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 19/31983	International filing date (<i>day/month/year</i>) 13 May 2019 (13.05.2019)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 14 May 2018 (14.05.2018)
Applicant ONCOIMMUNE, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed.
 a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant.
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/31983

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1, 2, 17, 18, 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/31983

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 16-19, 22-24, 29, 30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-----Go to Extra Sheet for continuation-----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Claims 1-4, (10-13)(in part), limited to first antibody domain variable heavy and light chains SEQ ID NOs: 1, 2 and bispecific antibody second antibody heavy and light chain domains SEQ ID NOs: 17, 18

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/31983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/28; C07K 16/30 (2019.01)
 CPC - C07K 16/2896; C07K 16/2809; C07K 2317/31; C07K 16/28; A61K 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	WEBER et al. Antibodies to the protein core of the small cell lung cancer workshop antigen cluster-w4 and to the leucocyte workshop antigen CD24 recognize the same short protein sequence leucine-alanine-proline. Clin Exp Immunol, August 1993, Vol 93, No 2, Pages 279-285. Especially abstract, pg 280 table 1(a)(b), pg 282 Fig 2; pg 283 col 2 para 4 continued to pg 284 col 1 para 1, pg 283 fig 4.	1-3, (10-12)/(1-3) ----- 4, (10-13)/4, 13/(1-3)
Y --- A	TSUBOKAWA et al. The monoclonal antibody HCM31 specifically recognizes the Sd(a) tetrasaccharide in goblet cell mucin. FEBS Open Bio, 20 July 2012, Vol 2, Pages 223-233. Especially abstract.	1-3, (10-12)/(1-3) ----- 4, (10-13)/4, 13/(1-3)
Y --- A	US 2017/0224818 A1 (LINDHOFER et al.) 10 August 2017 (10.08.2017). Especially claims 1, 8, 9.	(10-12)/(1-3) ----- 13/(1-3)
A	US 2016/0231328 A1 (BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY) 11 August 2016 (11.08.2016). Especially SEQ ID NO: 11	4, (10-13)/4
A	US 2006/0167232 A1 (ABURATANI et al.) 27 July 2006 (27.07.2006) Especially SEQ ID NO: 20	4, (10-13)/4
A	WO 2017/125897 A1 (NOVARTIS AG) 23 July 2016 (23.07.2017). Especially SEQ ID NO: 552	13/(1-3)
A	US 2015/0284475 A1 (WUHAN YZY BIOPHARMA CO LTD) 8 October 2015 (08.10.2015). Especially SEQ ID NO: 1	13/(1-3)

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 July 2019	Date of mailing of the international search report 16 OCT 2019
---	--

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/31983

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-15, drawn to a composition comprising an antibody that binds CD24.

The antibody composition will be searched to the extent that the antibody comprises the first named heavy chain variable region, SEQ ID NO: 1 and the light chain variable region SEQ ID NO: 2 (both in claim 4) and the second domain of a bispecific antibody (claim 10) comprising the first domain, as above, and also binds to CD3 (claim 12), and comprises variable heavy and light chains SEQ ID NOs 17 and 18, respectively (claim 13). It is believed that claims 1-4, (10-13)(in part) read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 1, 2, 17, 18. Additional first domain variable heavy and light chains and bi-specific antibody second domain variable heavy and light chains will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected variable heavy and light chains. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: SEQ ID NOs: 3, 11, 23 [this sequence includes both heavy and light chains] (claims 1-3, 5, (10-12, 14)(in part)).

Group II: Claims 20-21, drawn to a composition comprising a chimeric antigen receptor.

Group III: Claims 25, 26, 31, 32 drawn to a method comprising administering a peptide epitope specific for an antibody or use of the peptide epitope in the manufacture of a medicament.

Group IV: Claims 27, 28 drawn to a method of diagnosing malignant tissues or identifying circulating cancer cells by using a specific antibody.

The inventions listed as Groups I+, II-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Technical Features:

Group I+ has the special technical feature of a composition comprising an antibody, not required by Groups II, III, IV.

Groups II has the special technical feature of a chimeric antigen receptor of a T cell, not required by Groups I+, III, IV.

Group III has the special technical feature of administering a peptide epitope or using the peptide epitope to manufacture a medicament, not required by Groups I+, II, IV.

Group IV has the special technical feature of a method of diagnosing malignant tissues or identifying circulating cancer cells by using a specific antibody, not required by Groups I+, II, III.

No technical features are shared between the heavy and light chain polypeptide variable region of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ inventions and Group II-IV were considered to share the technical features of

1. Group I+ claims share the common technical feature of claim 1.
2. Group II claim 20 depends from Group I+ claims 4-9, which ultimately depend from Group I+ claim 1.
3. Groups I+ and III share the common technical feature of a peptide epitope.
4. Group IV claims 26, 27, depend from Group I+ claim 1.

these shared technical features are previously disclosed by the publication titled "Antibodies to the protein core of the small cell lung cancer workshop antigen cluster-w4 and to the leucocyte workshop antigen CD24 recognize the same short protein sequence leucine-alanine-proline" by Weber et al. (hereinafter "Weber") [published in August 1993 in Clin Exp Immunol Vol 93 No 2 Pages 279-285], in view of the publication titled "The monoclonal antibody HCM31 specifically recognizes the Sd(a) tetrasaccharide in goblet cell mucin" by Tsubokawa et al. (hereinafter "Tsubokawa") [published 20 July 2012 in FEBS Open Bio Vol 2 Pages 223-233].

----continued on next sheet----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/31983

continued from previous sheet

As to shared technical features #1, 3, 4, Weber discloses (claim 1) a composition comprising an antibody, wherein the antibody exposed on cancer cells (abstract; "We recently described the identity of the small cell lung cancer (SCLC) cluster-w4 antigen and the human B cell differentiation marker CD24 ... The three anti-cluster-w4 MoAbs SWA11, SWA21 and SWA22 and the anti-CD24 MoAbs OKB2 and ALB9 recognized the same short leucine-alanine-proline (LAP) sequence in an area without potential glycosylation sites close to the GPI anchor of the protein core of the cluster-w4/CD24 antigen"; pg 283 col 2 para 4 continued to pg 284 col 1 para 1; Due to a very high degree of glycosylation, the protein portion of the cluster-w4/CD24 antigen represents only about 10% of its molecular weight. Since all protein binding antibodies examined recognized the same tripeptide sequence which is localized in the middle of the only small stretch of the protein core without potential N- and O-glycosylation sites (Table I), one can assume the rest of the protein core to be entirely glycosylated, leaving position 19-21 as the only protein sequence exposed to the antibody binding"). Although Weber implies lack of antibody targets in the heavily glycosylated (i.e. glycan shielded) regions of CD24 (as above, pg 283 col 2 para 4 continued to pg 284 col 1 para 1) does not specifically disclose binds to an epitope that is glycan-shielded on non-cancerous cells, Tsubokawa discloses antigen target site availability changes in non-cancerous vs. cancerous cells (abstract; " monoclonal antibody HCM31 ... Immunohistochemical examination of human gastrointestinal tracts showed that HCM31 site-specifically stained the goblet cells in normal sigmoid colon and normal rectum, but the goblet cells stained with HCM31 were reduced in the corresponding cancer tissues. HCM31 seems to be useful for diagnosis of colonic cancer and for examining the function of secretory-type mucin with Sd(a) antigen").

As to shared technical feature #2, Weber discloses a peptide epitope (abstract; "recognized the same short leucine-alanine-proline (LAP) sequence in an area without potential glycosylation sites").

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+, II-IV lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claims 16-19, 22-24, 29, 30 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).