

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393163** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.14

(22) Дата подачи заявки
2022.05.11

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ АНТИТЕЛА К CD276 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) PCT/CN2021/093157;
PCT/CN2022/089645

(32) 2021.05.11; 2022.04.27

(33) CN

(86) PCT/CN2022/092138

(87) WO 2022/237820 2022.11.17

(71) Заявитель:
АНТЕНДЖИН БАЙОЛОДЖИКС
ЛИМИТЕД (CN)

(72) Изобретатель:
Юйвэнь Хуэй, Хоу Бин, Ли Тэнтэн,
Чэнь Пэн, Дэн Минь, Шань Бо, Мэй
Джей (CN)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предложены антитела к CD276 и молекулы биспецифичных антител к CD276/PD-L1, выделенные полинуклеотиды, кодирующие их, фармацевтические композиции, содержащие их, и их применения.

A1

202393163

202393163

A1

PCT/CN2022/092138

МПК: *C07K 16/28* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

НОВЫЕ АНТИТЕЛА К CD276 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к новым антителам к CD276.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

B7-H3 (CD276, идентификаторы UniProt для аминокислотной последовательности человека: Q5ZPR3 и аминокислотной последовательности мыши: Q8VE98) является важным недавно обнаруженным представителем иммунных контрольных точек семейств B7 и CD28, который представляет собой трансмембранную костимулирующую молекулу I типа, существующую в двух изоформах, определяемых ее внеклеточным доменом. У мышей внеклеточный домен состоит из одной пары вариабельных (IgV)-подобных и константных (IgC)-подобных доменов иммуноглобулина, тогда как у человека он состоит из одной пары (2Ig-B7-H3) или двух идентичных пар (4Ig-B7-H3) или двух идентичных пар (4Ig-B7-H3) благодаря дупликации экзонов. мРНК B7-H3 широко распространена в большинстве тканей; при этом белок B7-H3, напротив, имеет очень ограниченную экспрессию в нормальных тканях из-за его посттранскрипционной регуляции с помощью микроРНК. Однако белок B7-H3 экспрессируется с высокой частотой при многих различных типах рака (60% всех видов рака) (“B7-H3: an attractive target for antibody-based immunotherapy”. *Clinical Cancer Research*: clincanres.2584.2020).

Функция B7-H3 вызывает споры. Его классифицировали либо как костимулирующую молекулу для активации T-клеток, которая ингибирует иммунные реакции, специфичные для опухолевого антигена, либо как неиммунологическую роль, такую как содействие миграции, росту опухоли, инвазии, метастазированию, злокачественной стадии, частоте рецидивов, ангиогенезу, химиорезистентности, эпителиально-мезенхимальному переходу и влияние на метаболизм опухолевых клеток. Сообщается, что рецептор B7-H3 запускает рецептор, экспрессируемый на транскрипте 2, подобном миелоидным клеткам (TREM) (TLT-2 или TREML2), который связывает B7-H3 и костимулирует активацию, в частности, T-клеток CD8. Сообщается также, что B7-H3 является ингибитором NK-клеток и остеобластных клеток путем лигирования

неизвестного рецептора(ов). (The contrasting role of B7-H3, PNAS July 29, 2008, 105 (30) 10277-10278). Лечение моноклональными антителами для блокировки B7-H3 является основной иммунотерапевтической стратегией лечения рака.

Учитывая клинический успех ингибирующей блокады иммунных контрольных точек (CTLA-4 (антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов), PD-1 (белок программируемой гибели клеток) и PD-L1 (лиганд 1 белка программируемой гибели клеток)), моноклональные антитела, направленные против CD276, производят впечатление многообещающей терапевтической стратегии, заслуживающей разработки. Благодаря селективной экспрессии на солидных опухолях несколько групп создали антитела к CD276, такие как эноблитузумаб (MGA271), омбуртамаб, MGD009, MGC018, DS-7300a и CAR Т-клетки (“B7-H3: an attractive target for antibody-based immunotherapy”. Clinical Cancer Research: clincanres.2584.2020) и наблюдали подавление роста опухоли *in vitro* и *in vivo*. Сообщается также, что CD276 экспрессируется в клетках гематологических опухолей (см. Wei Zhang et al., B7 Family Members in Lymphoma: Promising Novel Targets for Tumor Immunotherapy? Front. Oncol., 31 March 2021), что указывает на возможность CD276 также быть потенциальной мишенью для лечения гематологических видов рака.

Несмотря на разработку терапевтических средств, нацеленных на CD276, существует значительная потребность в новых антителах к CD276.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Во всем настоящем изобретении термины в неопределенной и определенной форме используются для обозначения одного или более чем одного (то есть по меньшей мере одного) обозначаемого грамматического объекта. Например, «антитело» означает одно или более чем одно антитело.

В настоящем изобретении предложены молекулы новых антител к CD276, их аминокислотные и нуклеотидные последовательности и их применения.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие 1, 2 или 3 последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1-3, 9-11, 17-19, 25-27, 33-35, 41-43, 49-51, 57-59, 65-67, 73-75, 81-83, 89-91, 97-99, 105-107, 113-115, 121-123, 129-131, 137-139, 145-147, 153-155, 161-163, 169-171, 177-179, 185-187, 193-195, 201-203, 209-211, 217-219, 225-227, 233-235, 241-243, 249-251, 257-259, 265-267, 273-275, 281-283, 289-291, 297-299, 305-307, 313-315, 321-323, 329-331, 337-339 и 374-375, и/или 1, 2 или 3 последовательности CDR легкой цепи,

выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6, 12-14, 20-22, 28-30, 36-38, 44-46, 52-54, 60-62, 68-70, 76-78, 84-86, 92-94, 100-102, 108-110, 116-118, 124-126, 132-134, 140-142, 148-150, 156-158, 164-166, 172-174, 180-181, 188-190, 196-198, 204-206, 212-214, 220-222, 228-230, 236-238, 244-246, 252-254, 260-262, 268-270, 276-278, 284-286, 292-294, 300-302, 308-310, 316-318, 324-326, 332-334, 340-342 и 376-377.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

- a) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1-3;
- b) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9-11;
- c) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 17-19;
- d) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25-27;
- e) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 33-35;
- f) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 41-43;
- g) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 49-51;
- h) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 57-59;
- i) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 65-67;
- j) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 73-75;
- k) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 81-83;
- l) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 89-91;
- m) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 97-99;				
n) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 105-107;	1,	2	или	3
o) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 113-115;	1,	2	или	3
p) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 121-123;	1,	2	или	3
q) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 129-131;	1,	2	или	3
r) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 137-139;	1,	2	или	3
s) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 145-147;	1,	2	или	3
t) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 153-155;	1,	2	или	3
u) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 161-163;	1,	2	или	3
v) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 169-171;	1,	2	или	3
w) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 177-179;	1,	2	или	3
x) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 185-187;	1,	2	или	3
y) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 193-195;	1,	2	или	3
z) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 201-203;	1,	2	или	3
aa) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 209-211;	1,	2	или	3
bb) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 217-219;	1,	2	или	3
cc) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 225-227;	1,	2	или	3

- dd) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 233-235; 1, 2 или 3
- ee) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 241-243; 1, 2 или 3
- ff) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 249-251; 1, 2 или 3
- gg) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 257-259; 1, 2 или 3
- hh) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 265-267; 1, 2 или 3
- ii) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 273-275; 1, 2 или 3
- jj) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 281-283; 1, 2 или 3
- kk) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 289-291; 1, 2 или 3
- ll) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 297-299; 1, 2 или 3
- mm) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 305-307; 1, 2 или 3
- nn) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 313-315; 1, 2 или 3
- oo) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 321-323; 1, 2 или 3
- pp) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 329-331; 1, 2 или 3
- qq) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 337-339; и 1, 2 или 3
- rr) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9, 374 и 375. 1, 2 или 3

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

- a) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 4-6;
- b) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 12-14;
- c) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20-22;
- d) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 28-30;
- e) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 36-38;
- f) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44-46;
- g) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 52-54;
- h) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 60-62;
- i) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 68-70;
- j) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 76-78;
- k) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 84-86;
- l) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 92-94;
- m) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 100-102, 108-110;
- n) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 108-110;
- o) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 116-118;
- p) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 124-126;
- q) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 132-134;

CDR, выбранные из SEQ ID NO: 132-134;

r) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 140-142;

s) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 148-150;

t) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 156-158;

u) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 164-166;

v) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 172-174;

w) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 180-181;

x) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 188-190;

y) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 196-198;

z) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 204-206;

aa) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 212-214;

bb) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 220-222;

cc) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 228-230;

dd) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 236-238;

ee) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 244-246;

ff) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 252-254;

gg) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 260-262;

- hh) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 268-270;
- ii) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 276-278;
- jj) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 284-286;
- kk) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 292-294;
- ll) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 300-302;
- mm) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 308-310;
- nn) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 316-318;
- oo) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 324-326;
- pp) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 332-334;
- qq) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 340-342;
- рт) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 376, 13 и 14; и
- ss) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 377, 45 и 46.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат:

- a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6;
- b) вариабельную области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID

NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14;

с) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22;

д) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30;

е) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38;

ф) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO:41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO:46;

г) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54;

h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62;

- i) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70;
- j) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78;
- k) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 83; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86;
- l) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 91; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 94;
- m) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 102;
- n) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 110;
- o) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 118;

р) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 123; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 126;

q) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133 и SEQ ID NO: 134;

г) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138 и SEQ ID NO: 139; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 142;

с) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150;

т) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 155; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157 и SEQ ID NO: 158;

у) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165 и SEQ ID NO: 166;

в) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174;

w) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 182;

x) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 190;

y) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 и SEQ ID NO: 195; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 198;

z) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 и SEQ ID NO: 203; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205 и SEQ ID NO: 206;

aa) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 и SEQ ID NO: 214;

bb) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 и SEQ

ID NO:222;

сс) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO:225, SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229 и SEQ ID NO: 230;

dd) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234 и SEQ ID NO: 235; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 238;

ее) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242 и SEQ ID NO: 243; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 и SEQ ID NO: 246;

ff) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250 и SEQ ID NO: 251; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253 и SEQ ID NO: 254;

gg) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 и SEQ ID NO: 259; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261 и SEQ ID NO: 262;

hh) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266 и SEQ ID NO: 267; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 269 и SEQ ID NO: 270;

ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274 и SEQ

ID NO: 275; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277 и SEQ ID NO: 278;

jj) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282 и SEQ ID NO: 283; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285 и SEQ ID NO: 286;

kk) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293 и SEQ ID NO: 294;

ll) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298 и SEQ ID NO: 299; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301 и SEQ ID NO: 302;

mm) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306 и SEQ ID NO: 307; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309 и SEQ ID NO: 310;

nn) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314 и SEQ ID NO: 315; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317 и SEQ ID NO: 318;

oo) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322 и SEQ ID NO: 323; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325 и SEQ ID NO: 326;

pp) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330 и SEQ ID NO: 331; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333 и SEQ ID NO: 334;

qq) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338 и SEQ ID NO: 339; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341 и SEQ ID NO: 342; или

rr) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 376, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14; или

ss) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 349 и гомологичных последовательностей, обладающих идентичностью последовательностей с ними по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%).

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 1756, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 344, SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 350 и гомологичных последовательностей, обладающих идентичностью с ними по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%).

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат:

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8;
- b) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16;
- c) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 24;
- d) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32;
- e) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40;
- f) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 48;
- g) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 56;
- h) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64;

pp) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 335, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:336;

qq) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 343, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 344;

rr) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 347, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 348; или

ss) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 349, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 350.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 378 (EVQLVESGGGLXQPGXSLRLSCXTSGFTLSDYYMSWVRQXPGKGLEWVXFMRNKANXYTTEYSASVRGRFTISRDTSKSXIYLMNSLXXEDTAVYYCVRDRXGRPFAYWGQGT LVTVSS), где X в положении i (i=12, 16, 23, 40, 49, 57, 80, 89, 90 и 103) SEQ ID NO: 378 обозначен как X_{Hi}, где X_{H12} представляет собой V или I, X_{H16} представляет собой G или R, X_{H23} представляет собой A или T, X_{H40} представляет собой A или P, X_{H49} представляет собой G или S, X_{H57} представляет собой A или G, X_{H80} представляет собой I или T, X_{H89} представляет собой R или K, X_{H90} представляет собой A или T, X_{H103} представляет собой D или E; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 379

(DIXMTQSPXSLXXXXGXXXXIXCKSSQSLLNINQKNFLTWYXQKPGXXPXXLLIYWAS TRESGVPXRFSGSGSGTDFTLXISXXXEDLXXYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK), где X в положении i (i=3, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 32, 43, 48, 49, 51, 66, 80, 83, 84, 85, 86, 90 и 91) SEQ ID NO: 379 обозначен как X_{Li}, где X_{L3} представляет собой V или Q, X_{L9} представляет собой D, L или S, X_{L12} представляет собой A, S или P, X_{L13} представляет собой A или V, X_{L14} представляет собой S или T, X_{L15} представляет собой L, V или P, X_{L17} представляет собой D или E, X_{L18} представляет собой R или P, X_{L19} представляет собой A или V, X_{L20} представляет собой S или T, X_{L22} представляет собой N, T или S, X_{L32} представляет собой A или S, X_{L43} представляет собой Q или L, X_{L48} представляет собой Q или K, X_{L49} представляет собой A, P или S, X_{L51} представляет собой K или Q, X_{L66} представляет собой S или D, X_{L80} представляет собой K или T, X_{L83} представляет собой R или S, X_{L84} представляет собой L или V, X_{L85} представляет собой Q или E, X_{L86} представляет собой A или P, X_{L90} представляет собой A или G, X_{L91} представляет собой T

или V.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 380

(QVQLQESGPGGLVKPSXTLSLTCXVXGYSITSDYAWNWIRQXPQKGLWIGYISHSGSTSYNPSLKS RV TISRDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSLGRRWYFDVWGQGT TVTVSS), где X в положении i (i=16, 23, 25 и 41) SEQ ID NO: 380 обозначен как X_{Нi}, где X_{Н16} представляет собой E или Q, X_{Н23} представляет собой A или T, X_{Н25} представляет собой S или Y, X_{Н41} представляет собой H или P; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 381

(DIXMTQSPXSLXXXXGXXXXIXCKSSQSLLXSSTQKNYLAWYXQKPGXXPXXLLI YFASTRDSGVPXRFSGSGSGTDFTLXISXXXEDLXXYFCQQHYPFTFGQGTKLEIK), где X в положении i (i=3, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 31, 43, 48, 49, 51, 66, 80, 83, 84, 85, 86, 90 и 91) SEQ ID NO: 381 обозначен как X_{L i}, где X_{L3} представляет собой V или Q, X_{L9} представляет собой D, L или S, X_{L12} представляет собой A, S или P, X_{L13} представляет собой A или V, X_{L14} представляет собой S или T, X_{L15} представляет собой L, V или P, X_{L17} представляет собой D или E, X_{L18} представляет собой R или P, X_{L19} представляет собой A или V, X_{L20} представляет собой S или T, X_{L22} представляет собой N, T или S, X_{L31} представляет собой N или Q, X_{L43} представляет собой Q или L, X_{L48} представляет собой Q или K, X_{L49} представляет собой A, P или S, X_{L51} представляет собой K или Q, X_{L66} представляет собой S или D, X_{L80} представляет собой K или T, X_{L83} представляет собой R или S, X_{L84} представляет собой L или V, X_{L85} представляет собой Q или E, X_{L86} представляет собой A или P, X_{L90} представляет собой A или G, X_{L91} представляет собой T или V.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или 374 (MRNKANAYTT) и SEQ ID NO: 11 или 375 (VRDREG RPFAY), соответственно; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 12 или 376 (QSLLNAINQKNF), SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно; или
- (ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и

SEQ ID NO: 43, соответственно; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 44 или 377 (QSLQSSSTQKNY), SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 351, 353, 355, 357, 358, 360, 362, 364, 365, 367 и 370; и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 352, 354, 356, 359, 361, 363, 366, 368, 369, 371, 372 и 373.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат:

- a) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 351, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 352;
- b) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 353, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 354;
- c) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 355, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 352;
- d) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 355, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 356;
- e) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 357, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 352;
- f) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 357, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 354;
- g) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 358, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 359;
- h) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 360, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 361;
- i) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 362, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 359;
- j) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 362, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 363;
- k) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 364, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 359;
- l) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 364, и

- вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 361;
- m) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 365, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 366;
- n) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 367, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 368;
- o) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 367, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 369;
- p) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 367, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 366;
- q) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 370, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 369;
- г) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 370, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 366;
- s) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 365, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 371;
- t) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 367, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 372;
- u) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 367, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 373;
- v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 367, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 371;
- w) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 370, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 373; или
- x) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 370, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 371.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, дополнительно содержат одну или более замен или модификаций аминокислотных остатков, но при этом сохраняют специфическую аффинность связывания с CD276 человека.

В некоторых воплощениях замена имеет место в одной или более последовательностей CDR и/или в одной или более последовательностей VH или VL, но не в какой-либо из последовательностей CDR.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

предложенные в настоящем документе, дополнительно содержат константную область иммуноглобулина, возможно константную область Ig человека или возможно константную область IgG человека.

В некоторых воплощениях константная область содержит константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, являются химерными или гуманизированными.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, одноцепочечную молекулу антитела (scFv), камелизированное однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело и двухвалентное доменное антитело.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или более конъюгатами. В некоторых воплощениях указанный конъюгат присоединен либо непосредственно, либо через линкер. В некоторых воплощениях конъюгат содержит модифицирующий клиренс агент, химиотерапевтический агент, токсин, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку, фермент-субстратную метку, алкилирующие ДНК агенты, ингибитор топоизомеразы, связывающие тубулин агенты или другие противораковые лекарственные средства.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с CD276. В некоторых воплощениях CD276 получены от человека. В некоторых воплощениях CD276 представляет собой рекомбинантный CD276 или CD276, экспрессирующийся на поверхности клетки.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за один и тот же эпитоп с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенными в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем документе, дополнительно содержит второй терапевтический агент.

В некоторых воплощениях второй терапевтический агент представляет собой антагонист одной или более иммуноподавляющих молекул.

В некоторых воплощениях второй терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1.

В некоторых воплощениях антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, предложенный в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ экспрессирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем документе, включающий культивирование клетки-хозяина, предложенной в настоящем документе, в условиях, при которых экспрессируется указанный вектор, предложенный в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния у субъекта, на которого оказывает благоприятное действие модулирование активности CD276, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой связанное с CD276 заболевание или состояние.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой рак, заболевание, связанное с адаптивным иммунитетом, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

В некоторых воплощениях рак представляет собой опухоль надпочечника, связанный со СПИДом рак, альвеолярную саркому мягких частей, астроцитарную опухоль, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, рак молочной железы, опухоли каротидного

тела, рак шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, доброкачественную фиброзную гистиоцитому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную миксоидную хондросаркому, несовершенный фиброгенез кости, фиброзную дисплазию кости, рак желчного пузыря или желчных протоков, рак желудка, гестационную трофобластическую болезнь, герминогенную опухоль, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, опухоль островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, лейкоз, липому/доброкачественную липоматозную опухоль, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени, лимфому, рак легкого, медуллобластому, меланому, менингиому, множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярный рак щитовидной железы, опухоль паращитовидной железы, детский рак, опухоль оболочек периферических нервов, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, меланому задней увеальной оболочки, редкое гематологическое расстройство, метастатический рак почки, рабдоидную опухоль, рабдомисаркому, саркому, рак кожи, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, рак яичек, карциному тимуса, тимому, метастатический рак щитовидной железы и рак матки, возможно где рак является химиорезистентным.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой гематологический рак, выбранный из В-клеточных лимфом, таких как лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), множественная миелома (MM), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), В-клеточная лимфома маргинальной зоны (MZL), мантийно-клеточная лимфома (MCL), синдром Рихтера, лимфома Беркитта или фолликулярная лимфома.

В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека.

В некоторых воплощениях способ, предложенный в настоящем документе, включает введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или более терапевтических агентов. В некоторых воплощениях указанный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, радиационный терапевтический агент,

гормональный терапевтический агент, токсин или иммунотерапевтический агент.

В некоторых воплощениях второй терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1.

В некоторых воплощениях антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых воплощениях введение осуществляют путем перорального, назального, внутривенного, подкожного, сублингвального или внутримышечного введения.

В некоторых воплощениях указанный способ дополнительно включает проведение одной или более дополнительных терапий рака, выбранных из группы, состоящей из химиотерапии, иммунотерапии, лучевой терапии, гормональной терапии и хирургического вмешательства.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ модулирования активности CD276 в CD276-экспрессирующей клетке, включающий воздействие на CD276-экспрессирующую клетку антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенными в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ детектирования наличия или количества CD276 в образце, включающий приведение указанного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе, и определение наличия или количества CD276 в образце.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ диагностики связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта, включающий: а) получение образца от субъекта; б) приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе; в) определение наличия или количества CD276 в образце и г) соотнесение наличия или количества CD276 с наличием или статусом связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых воплощениях лекарственное средство дополнительно содержит второй терапевтический агент. В некоторых воплощениях второй терапевтический агент

представляет собой химиотерапевтический агент, радиационный терапевтический агент, гормональный терапевтический агент, токсин или иммунотерапевтический агент.

В некоторых воплощениях второй терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1. В некоторых воплощениях антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, в изготовлении диагностического реагента для диагностики заболевания или состояния, связанного с CD276.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, полезный для обнаружения CD276, возможно рекомбинантного CD276, CD276, экспрессирующегося на поверхности клетки, или CD276-экспрессирующих клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен TCR (Т-клеточный рецептор), где антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD276 и содержит антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv.

В некоторых воплощениях CAR, предложенный в настоящем документе, является биспецифичным.

В некоторых воплощениях CAR способен дополнительно специфически связываться со вторым антигеном, отличным от CD276, или вторым эпитопом CD276. В некоторых воплощениях второй антиген представляет собой опухолевый антиген.

В некоторых воплощениях сигнальный домен TCR выбран из группы, состоящей из: последовательности внутриклеточных сигнальных областей CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLR или их комбинации.

В некоторых воплощениях трансмембранная область содержит трансмембранную область CD3, CD4, CD8 или CD28.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), предложенный в настоящем документе. В одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты,

предложенной в настоящем документе. В одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR, предложенного в настоящем документе. В некоторых воплощениях клетка представляет собой иммунную клетку, возможно где иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, НК-клетку, моноцит, макрофаг или НКТ-лимфоцит.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, предложенную в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ стимулирования опосредованного Т-клетками иммунного ответа на CD276-экспрессирующую клетку или ткань у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR, предложенного в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения млекопитающего, имеющего связанное с CD276 заболевание или состояние, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клеток, предложенных в настоящем документе, с обеспечением тем самым лечения указанного млекопитающего. В некоторых воплощениях клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

В некоторых воплощениях связанное с CD276 заболевание или состояние, представляет собой рак.

В некоторых воплощениях млекопитающее представляет собой субъекта- человека.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено применение клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR, предложенной в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для стимулирования опосредованного Т-клетками иммунного ответа на CD276-экспрессирующую клетку или ткань у млекопитающего.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено применение клетки, предложенной в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения млекопитающего, имеющего связанное с CD276 заболевание или состояние.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Чертежи предназначены только для иллюстративных целей, а не для ограничения.

На фигуре 1 показана аффинность связывания антител к CD276, предложенных в настоящем документе, с клетками SKOV3, определенная с помощью анализа методом FACS.

На фигурах 2А-2Е показано связывание 6-D8-E7-A11 с несколькими линиями раковых клеток, которые экспрессируют В7Н3, определенное с помощью анализа методом FACS.

На фигурах 3А-3С показан эффект ADCC антител к CD276, предложенных в настоящем документе, в отношении клеток SKOV3.

На фигурах 4А и 4В показан эффект CDC антител к CD276, предложенных в настоящем документе, в отношении клеток CHO-S-hCD276.

На фигурах 5А-5Е показан эффект непрямой ADC-цитотоксичности антител к CD276, предложенных в настоящем документе, в отношении клеток SKOV3.

На фигуре 6 показана эффективность *in vivo* антител к CD276, предложенных в настоящем документе, при ингибировании роста опухоли в модели у мышей, инокулированных опухолевыми клетками MC-38-hCD276 (В7Н3).

На фигуре 7 показано действие на рост опухоли в подкожной модели calu-6 у бестимусных мышей balb/c (среднее \pm sem).

На фигуре 8 показано высвобождение IL2 при активации Т-клеток в анализе MLR.

На фигуре 9 показано высвобождение IFN γ при активации Т-клеток в анализе MLR.

На фигуре 10 показана аффинность связывания гуманизированных антител, полученных из 30-C7-C11-D4, с клетками SKOV3.

На фигуре 11 показана аффинность связывания гуманизированных антител, полученных из 10-G6-C4-B2, с клетками SKOV3.

На фигуре 12 показано действие на рост опухоли в подкожной модели Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c (среднее \pm SEM).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следующее описание настоящего изобретения предназначено исключительно для иллюстрации различных воплощений изобретения. По существу, обсуждаемые конкретные модификации не следует рассматривать как ограничения объема изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные эквиваленты, изменения и модификации могут быть сделаны без выхода за рамки изобретения, и понятно, что такие эквивалентные воплощения должны быть включены в настоящее описание. Все ссылки, цитированные в настоящем документе, включая публикации, патенты и патентные заявки, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Определения

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, включает любой иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, поливалентное антитело, двухвалентное антитело или моновалентное антитело, которое связывается со специфическим антигеном. Нативное интактное антитело содержит две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Тяжелые цепи млекопитающих классифицируются как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, каждая тяжелая цепь состоит из переменной области (V_H) и первой, второй и третьей константной области (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} соответственно); легкие цепи млекопитающих классифицируются как λ или κ , при этом каждая легкая цепь состоит из переменной области (V_L) и константной области. Антитело имеет Y-образную форму, при этом ножка Y состоит из второй и третьей константных областей двух тяжелых цепей, связанных между собой дисульфидной связью. Каждое плечо Y включает переменную область и первую константную область одной тяжелой цепи, связанные с переменной и константной областью одной легкой цепи. Переменные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание антигена. Переменные области в обеих цепях обычно содержат три высокопеременные петли, называемые определяющими комплементарность областями (CDR) (CDR легкой цепи, включая LCDR1, LCDR2 и LCDR3, CDR тяжелой цепи, включая HCDR1, HCDR2 и HCDR3). Границы CDR для антител и антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, могут быть определены или идентифицированы согласно соглашениям Kabat, IMGT, AbM, Chothia или Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); N. R. Whitelegg et al, Protein Engineering, v13(12), 819-824 (2000); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al, Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)). Три CDR расположены между фланкирующими участками, известными как каркасные области (FR), которые более консервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки гиперпеременных петель. Константные области тяжелой и легкой цепей не участвуют в связывании антигена, но обладают различными эффекторными функциями. Антитела относят к классам на основании аминокислотной последовательности константной области их тяжелой цепи. Пять основных классов или изотипов антител представляют собой IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые характеризуются

наличием тяжелых цепей альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю, соответственно. Некоторые из основных классов антител разделены на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь гамма1), IgG2 (тяжелая цепь гамма2), IgG3 (тяжелая цепь гамма3), IgG4 (тяжелая цепь гамма4), IgA1 (тяжелая цепь альфа1) или IgA2 (тяжелая цепь альфа2).

Термин «молекула антитела», используемый в настоящем документе, относится к антигенсвязывающему белку или полипептиду, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела (такой как CDR и/или последовательность вариабельной области). Молекула антитела включает, например, моноклональное антитело, фрагмент или домен антитела, слитый белок, содержащий фрагмент или домен антитела, полипептидный комплекс, содержащий фрагмент или домен антитела, и так далее.

Термин «антигенсвязывающий домен» (например, CD276-связывающий домен), используемый в настоящем документе, относится к фрагменту антитела, образованному из части антитела, содержащей один или более CDR, или любого другого фрагмента антитела, который связывается с антигеном, но не содержит интактной структуры нативного антитела. Примеры антигенсвязывающего домена включают, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, молекулу одноцепочечного антитела (scFv), камелизированное однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело и двухвалентное доменное антитело. Антигенсвязывающий домен способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен может содержать один или более CDR конкретного антитела человека, привитого к каркасной области одного или более различных антител человека. Более подробные форматы антигенсвязывающего домена описаны в Spiess et al, 2015, и Brinkman et al., *mAbs*, 9(2), pp.182–212 (2017), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

«Fab» в отношении антитела относится к той части антитела, которая состоит из одной легкой цепи (как вариабельной, так и константной области), связанной с вариабельной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью.

«Fab» относится к Fab-фрагменту, который включает часть шарнирной области.

«F(ab')₂» относится к димеру Fab'.

«Трудный фрагмент (Fd)» в отношении антитела относится к аминоконцевой половине фрагмента тяжелой цепи, которая может быть объединена с легкой цепью с образованием Fab. Например, фрагмент Fd может состоять из доменов V_H и CH1.

«Fv» в отношении антитела относится к наименьшему фрагменту антитела, несущему полный антигенсвязывающий сайт. Фрагмент Fv состоит из переменной области одной легкой цепи, связанной с переменной областью одной тяжелой цепи. Был предложен ряд конструкций Fv, включая dsFvs, в которых связь между двумя доменами усиливается за счет введения дисульфидной связи; и scFv могут быть образованы с использованием пептидного линкера для связывания двух доменов вместе в виде одного полипептида. Также были получены конструкции Fvs, содержащие переменный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, связанный с переменным и константным доменом соответствующей тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина.

«Одноцепочечное антитело Fv» или «scFv» относится к сконструированному антителу, состоящему из переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, соединенных друг с другом непосредственно или через последовательность пептидного линкера (Huston JS *et al.* Proc. Natl Acad Sci USA, 85:5879 (1988)).

«dsFv» относится к стабилизированному дисульфидом Fv-фрагменту, в котором связь между переменной областью одной легкой цепи и переменной областью одной тяжелой цепи представляет собой дисульфидную связь. В некоторых воплощениях «(dsFv)₂» или «(dsFv-dsFv')» содержит три пептидные цепи: два фрагмента V_H, связанные пептидным линкером (например, длинным гибким линкером) и связанные с двумя фрагментами V_L, соответственно, через дисульфидные мостики. В некоторых воплощениях dsFv-dsFv' является биспецифичным, в котором каждая дисульфидная пара тяжелой и легкой цепи имеет различную антигенную специфичность.

«Fc» в отношении антитела относится к той части антитела, которая состоит из второй и третьей константных областей первой тяжелой цепи, связанных со второй и третьей константными областями второй тяжелой цепи посредством дисульфидной связи. Часть Fc антитела отвечает за различные эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), но не участвует в связывании антигена.

«Камелизированное однодоменное антитело», «антитело из тяжелых цепей» или «HCAb» относится к антителу, которое содержит два домена V_H и не содержит легких цепей (Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999));

Muyldermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; патент США № 6,005,079). Антитела с тяжелой цепью первоначально были получены от *Camelidae* (верблюдов, дромадеров и лам). Несмотря на отсутствие легких цепей, камелизированные антитела обладают аутентичным антигенсвязывающим репертуаром (Hamers-Casterman C. *et al.*, Nature. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.* "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.* Immunology. May;109(1):93-101 (2003)). Варибельный домен антитела из тяжелых цепей (домен VHН) представляет собой наименьшую известную антигенсвязывающую единицу, образующуюся в результате адаптивных иммунных ответов (Koch-Nolte F. *et al.*, FASEB J. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).

«Нанотело» относится к фрагменту антитела, который состоит из домена VHН антитела из тяжелых цепей и двух константных доменов, CH2 и CH3.

«Доменное антитело» относится к фрагменту антитела, содержащему только варибельную область тяжелой цепи или варибельную область легкой цепи. В некоторых случаях два или более домена V_H ковалентно соединяются с пептидным линкером с получением двухвалентного или мультивалентного доменного антитела. Два домена V_H двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

Термин «химерный», используемый в настоящем документе, означает антитело или антигенсвязывающий домен, имеющий часть тяжелой и/или легкой цепи, полученную от одного вида, а остальную часть тяжелой и/или легкой цепи, полученную от разных видов. В иллюстративном примере химерное антитело может содержать константную область, полученную от человека, и варибельную область от животного, отличного от человека, например мыши. В некоторых воплощениях животное, отличное от человека, представляет собой млекопитающее, например мышь, крысу, кролика, козу, овцу, морскую свинку или хомяка.

Термин «гуманизированный», используемый в настоящем документе, означает, что антитело или антигенсвязывающий домен содержит CDR, полученные от животных, отличных от человека, области FR, полученные от человека, и, когда это применимо, константные области, полученные от человека.

Термин «функционально связан» или «функционально связанный» относится к сопоставлению двух или более представляющих интерес биологических

последовательностей, со спейсером, или линкером, или промежуточной последовательностью или без них, таким образом, что они находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать заданным образом. При использовании данного термина в отношении полипептидов подразумевается, что полипептидные последовательности связаны таким образом, что позволяет связанному продукту выполнять намеченную биологическую функцию. Например, переменная область антитела может быть функционально связана с константной областью с получением стабильного продукта с антигенсвязывающей активностью. В другом примере антигенсвязывающий домен может быть функционально связан с другим антигенсвязывающим доменом с промежуточной последовательностью между ними, и такая промежуточная последовательность может быть спейсером или может содержать гораздо более длинную последовательность, такую как константная область антитела. Указанный термин также можно использовать по отношению к полинуклеотидам. Например, когда полинуклеотид, кодирующий полипептид, функционально связан с регуляторной последовательностью (например, промоторной, энхансерной, сайленсерной последовательностью и т. д.), и это означает, что полинуклеотидные последовательности связаны таким образом, что обеспечивает регулируемую экспрессию полипептида из полинуклеотида.

Термин «слияние» или «слитый» при использовании в отношении аминокислотных последовательностей (например, пептида, полипептида или белка) относится к комбинации двух или более аминокислотных последовательностей, например, посредством химического связывания или рекомбинантных средств, с образованием единой аминокислотной последовательностью, которая не существует в природе. Слитая аминокислотная последовательность может быть получена путем генетической рекомбинации двух кодирующих полинуклеотидных последовательностей и может быть экспрессирована способом введения конструкции, содержащей рекомбинантные полинуклеотиды, в клетку-хозяина.

Термин «антиген», используемый в настоящем документе, относится к соединению, композиции, пептиду, полипептиду, белку или веществу, которое может стимулировать выработку антител или Т-клеточный ответ в клеточной культуре или у животного, включая композиции (например, такие, которые включают рак-специфический белок), которые добавляются в клеточную культуру (например, гибридому), или инъецируются или всасываются в животное. Антиген реагирует с продуктами специфического

гуморального или клеточного иммунитета (такими как антитела), в том числе индуцируемыми гетерологичными антигенами.

Термин «белок CD276» или «белок B7-H3», используемый в настоящем документе, как предполагается, охватывает любую форму CD276, например, 1) нативную непротессированную молекулу CD276, «полноразмерную» цепь CD276 или встречающиеся в природе варианты CD276, включая, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты; 2) любую форму CD276, возникающую в результате процессинга в клетке; или 3) полноразмерную форму, фрагмент (например, усеченную форму, внеклеточный/трансмембранный домен) или модифицированную форму (например, мутированную форму, гликозилированную/ПЭГилованную, слитую с His-меткой/иммуофлуоресцентную слитую форму) субъединицы CD276, полученную посредством рекомбинантного способа.

Термин «антитело к CD276», «анти-CD276-связывающий домен» или «CD276-связывающий домен» относится к антителу или антигенсвязывающему домену, которые способны специфически связываться с CD276 (например, CD276 человека, обезьяны или мыши).

Термин «специфическое связывание» или «специфически связывает», используемый в настоящем документе, относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как, например, между антителом и антигеном.

Связывание антител с рекомбинантным CD276 или CD276, экспрессируемым на поверхности клеток, также может быть представлено значением «полумаксимальной эффективной концентрации» (EC₅₀), которое относится к концентрации антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта (например, связывание или ингибирование и т. д.). Значение EC₅₀ можно измерить способами, известными в данной области техники, например, с помощью сэндвич-анализа, такого как ELISA, вестерн-блоттинга, анализа методом проточной цитометрии и других анализов связывания. В некоторых воплощениях антитела и их фрагменты, представленные в настоящем документе, специфически связываются с рекомбинантным CD276 человека при EC₅₀ (т.е. 50% концентрации связывания) не более 0,05 нМ, не более 0,06 нМ, не более 0,07 нМ, не более 0,08 нМ, не более 0,09 нМ, не более 0,1 нМ, не более 0,2 нМ, не более 0,3 нМ, не более 0,4 нМ, не более 0,5 нМ, не более 0,6 нМ, не более 0,7 нМ, не более 0,8 нМ, не более 0,9 нМ, не более 1 нМ, не более 1,5 нМ, не более 2 нМ, не более 2,5 нМ, не более 3,5 нМ, не более 3 нМ, не более 4 нМ, не более 4,5 нМ, не более 5 нМ, не более 6 нМ, не более 7

нМ, не более 8 нМ, не более 9 нМ или не более 10 нМ, определенной с помощью анализа методом проточной цитометрии.

Способность «блокировать связывание» или «конкурировать за один и тот же эпитоп» при использовании в настоящем документе относится к способности антитела или антигенсвязывающего домена ингибировать связывающее взаимодействие между двумя молекулами (например, CD276 человека и его связывающим лигандом, например, TLT-2) в любой обнаруживаемой степени. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий домен, который блокирует связывание между двумя молекулами, ингибирует взаимодействие связывания между двумя молекулами по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90%. В некоторых воплощениях это ингибирование может составлять более 85% или более 90%.

Термин «эпитоп», используемый в настоящем документе, относится к конкретной группе атомов или аминокислот антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы могут образовываться как из смежных аминокислот (также называемых линейным или последовательным эпитопом), так и из несмежных аминокислот, соединенных друг с другом благодаря третичной укладке белка (также называемых конфигурационным или конформационным эпитопом). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно располагаются линейно вдоль первичных аминокислотных остатков на белке, и небольшие сегменты смежных аминокислот могут расщепляться за счет связывания антигена с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) или сохраняться при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичным сворачиванием, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5, приблизительно 7 или приблизительно 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Два антитела могут связывать один и тот же или близкородственный эпитоп внутри антигена, если они демонстрируют конкурентное связывание с антигеном. Например, если антитело или антигенсвязывающий домен блокируют связывание эталонного антитела с антигеном по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере, на 90%, или по меньшей мере на 95%, то можно считать, что антитело или антигенсвязывающий домен связывают тот же/близкородственный эпитоп, что и эталонное антитело.

«Консервативная замена» в отношении аминокислотной последовательности относится к замене аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со схожими физико-химическими свойствами. Например,

консервативные замены могут быть сделаны среди аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми цепями (например, Met, Ala, Val, Leu и Ile), среди остатков с нейтральными гидрофильными боковыми цепями (например, Cys, Ser, Thr, Asn и Gln), среди остатков с кислыми боковыми цепями (например, Asp, Glu), среди аминокислот с основными боковыми цепями (например, His, Lys и Arg) или среди остатков с ароматическими боковыми цепями (например, Trp, Tyr и Phe). Как известно в данной области техники, консервативная замена обычно не вызывает существенных изменений в конформационной структуре белка и, следовательно, может сохранять биологическую активность белка.

Термины «гомолог» и «гомологичный», используемые в настоящем документе, являются взаимозаменяемыми и относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной цепи) или аминокислотным последовательностям, которые имеют идентичность последовательностей по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) к другим последовательностям при оптимальном выравнивании.

«Процент (%) идентичности последовательности» по отношению к аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) определяется как процент остатков аминокислот (или нуклеиновой кислоты) в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислоте (или последовательности нуклеиновой кислоты) в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения пробелов для достижения максимального количества идентичных аминокислот (или нуклеиновых кислот). Консервативная замена аминокислотных остатков может считаться или не считаться идентичными остатками. Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательностей аминокислот (или нуклеиновых кислот) может быть выполнено, например, с использованием общедоступных инструментов, таких как BLASTN, BLASTp (доступны на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), см. также, Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403–410 (1990), Stephen F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (доступен на веб-сайте Европейского института биоинформатики, см. также Higgins D.G. et al., *Methods in Enzymology*, 266:383–402 (1996); Larkin M.A. et al., *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21): 2947–8 (2007)) и программного обеспечения ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут использовать параметры по умолчанию,

предоставляемые инструментом, или могут настроить параметры, соответствующие выравниванию, например, путем выбора подходящего алгоритма.

«Эффекторные функции» в настоящем документе относятся к биологической активности, обусловленной связыванием Fc-области антитела с его эффекторами, такими как комплекс C1, рецептор Fc и эффекторная клетка (например, макрофаг). Примеры эффекторных функций включают: комплементзависимую цитотоксичность (CDC), индуцированную взаимодействием антител и C1q в комплексе C1; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), индуцируемую связыванием Fc-области антитела с Fc-рецептором на эффекторной клетке; и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), индуцируемый связыванием Fc-области антитела с фагоцитозом. Стало хорошо известно, что специфические гликановые структуры, связанные с консервативным двухантенным гликаном в домене Fc-CH₂, могут сильно влиять на взаимодействие с FcγR, которые опосредуют ADCC и ADCP, а также на связывание C1q, начальное событие связывания, ведущее к CDC (см. Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 2015; 25: 1325-34).

«Лечение» или «осуществление лечения» состояния в настоящем документе включает предупреждение или облегчение состояния, замедление начала или скорости развития состояния, снижение риска развития состояния, предотвращение или задержку развития симптомов, связанных с состоянием, уменьшение или прекращение симптомов, связанных с состоянием, создание полной или частичной регрессии состояния, излечение состояния или некоторую их комбинацию.

Термин «субъект», или «индивидуум», или «животное», или «пациент», используемый в настоящем документе, относится к человеку или животному, отличному от человека, включая млекопитающее или примата, нуждающемуся в диагностике, прогнозировании, улучшении состояния, предупреждении и /или лечении заболевания или расстройства. Субъекты-млекопитающие включают людей, обезьян, домашних животных, сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, спортивных или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, свиньи, коровы, медведи и так далее.

Термин «вектор», используемый в настоящем документе, относится к носителю, в который может быть функционально вставлен полинуклеотид, кодирующий белок, чтобы вызвать экспрессию этого белка. Вектор можно использовать для трансформации,

трансдукции или трансфекции клетки-хозяина, чтобы вызвать экспрессию генетического элемента, который он несет, в клетке-хозяине. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды и искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Категории вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Вектор может содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая последовательности промотора, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать точку начала репликации. Вектор может также включать материалы, способствующие его проникновению в клетку, включая, помимо прочего, вирусную частицу, липосому или белковое покрытие. Вектор может представлять собой вектор экспрессии или вектор клонирования.

Фраза «клетка-хозяин», используемая в настоящем документе, относится к клетке, в которую был введен экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

«Связанное с CD276» заболевание или состояние в настоящем документе относится к любому заболеванию или состоянию, вызванному, усугубленному или иным образом связанному с повышенной или пониженной экспрессией или активностью CD276. В некоторых воплощениях состояние, связанное с CD276, представляет собой расстройство, связанное с иммунной системой, такое как, например, рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

«Рак» в настоящем документе относится к любому медицинскому состоянию, характеризующемуся ростом злокачественных клеток или новообразованием, аномальной пролиферацией, инфильтрацией или метастазированием, и включает как солидные опухоли, так и несоллидные раковые заболевания (гематологические злокачественные новообразования), такие как лейкоз. Используемый здесь термин «солидная опухоль» относится к твердой массе неопластических и/или злокачественных клеток. Примеры рака или опухолей включают опухоль надпочечника, рак, связанный со СПИДом, альвеолярную саркому мягких частей, астроцитарную опухоль, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, рак

молочной железы, опухоли каротидного тела, рак шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобный почечно-клеточный рак, светлоклеточный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, доброкачественную фиброзную гистиоцитому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную миксоидную хондросаркому, несовершенный фиброгенез кости, фиброзную дисплазию кости, рак желчного пузыря или желчных протоков, рак желудка, гестационную трофобластическую болезнь, герминогенную опухоль, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, островковый рак клеточную опухоль, саркому Капоши, рак почки, лейкоз, липому/доброкачественную липоматозную опухоль, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени, лимфому, рак легких, медуллобластому, меланому, менингиому, множественную опухоль эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярный рак щитовидной железы, опухоль паращитовидной железы, детский рак, опухоль оболочек периферических нервов, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, заднюю увеальную меланому, редкое гематологическое заболевание, метастатический рак почки, рабдоидную опухоль, рабдомисаркому, саркому, рак кожи, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, рак яичка, карциному тимуса, тимому, метастатический рак щитовидной железы и рак матки.

В некоторых воплощениях гематологические злокачественные новообразования включают В-клеточные лимфомы, возможно лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), множественную миелому (MM), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому маргинальной зоны (MZL), мантийно-клеточную лимфому (MCL), синдром Рихтера, лимфому Беркитта или фолликулярную лимфому.

В некоторых воплощениях рак выбран из рака желудка, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы и рака толстой кишки. В некоторых воплощениях рак выбран из лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы и В-клеточной лимфомы.

В некоторых воплощениях рак является химиорезистентным. Термин «химиорезистентный рак», используемый в настоящем документе, относится к типу рака,

который не реагирует на эффекты химиотерапии. Например, рак, который реагирует на химиотерапию или комбинацию различных химиотерапевтических препаратов, внезапно начинает расти, может называться химиорезистентным раком.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что указанный носитель, переносящая среда, разбавитель, эксципиент(ы) и/или соль обычно химически и/или физически совместимы с другими ингредиентами, содержащими состав, и физиологически совместимы с их реципиентом.

Антитело к CD276

Настоящее изобретение относится к антителам к CD276 и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) последовательностей CDR антитела к CD276 9-E8-F9-C10, 10-G6-C4-B2, 18-F9-D8-G7, 9-G2-H6-E4, 20-F8-B5-G2, 30-C7-C11-D4, 23-F10-G4-F11, 6-H11-G5-D8, 27-E7-D8-C7, 30-E2-G7-G7, 5-D1-G6-D9, 3-C2-C3-E7, 11-G10-B4-B11, 16-C6-F7-F5, 22-E11-C3-F2, 24-C10-F9-G7, 25-C8-D7-C5, 4-D5-B9-B11, 10-B9-D10-A12, 15-G1-D1-E3, 8-B4-F5-E11, 6-F3-G2-G1, 9-B9-H11-G7, 9-G12-D6-A11, 13-A8-C4-G1, 15-C8-B5-G7, 28-G2-E6-B10, 3-G7-D8-D3, 14-E7-G9-D4, 20-C5-D7-D3, 8-C3-E3-F3, 2-A7-B10-A3, 26-D2-D6-B12, 11-C12-F4-F6, 16-G3-D10-C10, 27-F8-E10-E11, 7-E1-F8-F6, 25-D3-G4-C6, 13-E4-G9-A4, 20-A2-D10-G8, 3-F2-E7-F9, 6-D8-E7-A11 и 21-B3-B1-H5. В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, способны специфически связываться с CD276. Возможно, CD276 получено от человека, обезьяны или мыши. В некоторых воплощениях CD276 представляет собой рекомбинантный CD276 или CD276, экспрессируемый на поверхности клетки.

Все антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, представляют собой моноклональные антитела мыши. В таблице 1 показаны последовательности CDR этих 43 антител к CD276 согласно системе нумерации IMGT. Последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи также представлены ниже.

Таблица 1. Последовательности CDR антител к CD276

Клон антитела		CDR1	CDR2	CDR3
9-E8-F9-C10	VH	SEQ ID NO:1 GYAFSDYW	SEQ ID NO:2 ICPGSGNI	SEQ ID NO:3 TRLITRVIDY
	VL	SEQ ID NO:4 SSVNY	SEQ ID NO:5 DTS	SEQ ID NO:6 FQGSYPLT
10-G6-C4-B2	VH	SEQ ID NO:9 GFTLSDY	SEQ ID NO:10 MRNKANGYTT	SEQ ID NO:11 VRDRDGRPFAY

	VL	SEQ ID NO:12 QSLLSINQKNF	SEQ ID NO:13 WAS	SEQ ID NO:14 QNDYTYPLT
18-F9-D8-G7	VH	SEQ ID NO:17 GYTFTDYA	SEQ ID NO:18 INTYSGDT	SEQ ID NO:19 ARGGGNYPYWFYFDV
	VL	SEQ ID NO:20 SSVSSSY	SEQ ID NO:21 STS	SEQ ID NO:22 QQFSVYPLT
9-G2-H6-E4	VH	SEQ ID NO:25 GYSFTGYF	SEQ ID NO:26 INPNNGDT	SEQ ID NO:27 GRGGLPFGALDY
	VL	SEQ ID NO:28 QSLLYSRNQKNY	SEQ ID NO:29 WAS	SEQ ID NO:30 QQYHSYPYT
20-F8-B5-G2	VH	SEQ ID NO:33 GDSITSAY	SEQ ID NO:34 ISNSGST	SEQ ID NO:35 VRGERYYGYGAY
	VL	SEQ ID NO:36 KSLLSHNGNTYLY	SEQ ID NO:37 RMS	SEQ ID NO:38 MQHLEYPFT
30-C7-C11-D4	VH	SEQ ID NO:41 GYSITSDYA	SEQ ID NO:42 SHSGST	SEQ ID NO:43 ARSLGRRWYFDV
	VL	SEQ ID NO:44 QSLLSSTQKNY	SEQ ID NO:45 FAS	SEQ ID NO:46 QQHYIIPFT
23-F10-G4-F11	VH	SEQ ID NO:49 GFNIKDYP	SEQ ID NO:50 FDPDNGNV	SEQ ID NO:51 SSPYGAMDY
	VL	SEQ ID NO:52 SSVSY	SEQ ID NO:53 DTS	SEQ ID NO:54 QQGSSNPRT
6-H11-G5-D8	VH	SEQ ID NO:57 GYTFTSYD	SEQ ID NO:58 IFPNGDT	SEQ ID NO:59 ARDLRLGTFDY
	VL	SEQ ID NO:60 SSVSY	SEQ ID NO:61 DTS	SEQ ID NO:62 QQGSSNPRT
27-E7-D8-C7	VH	SEQ ID NO:65 GYTFTDYA	SEQ ID NO:66 INTYSDNT	SEQ ID NO:67 ARGLLLRSQGVYFDY
	VL	SEQ ID NO:68 SSVSY	SEQ ID NO:69 ATS	SEQ ID NO:70 QQWSSNPWT
30-E2-G7-G7	VH	SEQ ID NO:73 GFTFSYYA	SEQ ID NO:74 INGDGSHT	SEQ ID NO:75 ASLLQLGPF
	VL	SEQ ID NO:76 QNVGTN	SEQ ID NO:77 SAS	SEQ ID NO:78 QQYNNYPLT
5-D1-G6-D9	VH	SEQ ID NO:81 GLTFSTNY	SEQ ID NO:82 IYGGNGGT	SEQ ID NO:83 TSHDYGGPMDY
	VL	SEQ ID NO:84 QDISNY	SEQ ID NO:85 FTS	SEQ ID NO:86 QQTNTLPWT
3-C2-C3-E7	VH	SEQ ID NO:89 GYTFTENT	SEQ ID NO:90 INPNTGGT	SEQ ID NO:91 ARRGTNWEHWYFDV
	VL	SEQ ID NO:92 SSVSY	SEQ ID NO:93 DTS	SEQ ID NO:94 QQWSSNPLT
11-G10-B4-B11	VH	SEQ ID NO:97 GYSITSDYA	SEQ ID NO:98 ISYSGST	SEQ ID NO:99 ARGGPWFAY
	VL	SEQ ID NO:100 QSLVHSNGNTY	SEQ ID NO:101 KVS	SEQ ID NO:102 SQSTHVPFT
16-C6-F7-F5	VH	SEQ ID NO:105 GYTFTKYG	SEQ ID NO:106 IWTYTGKP	SEQ ID NO:107 ARDDGYYTYMNY

	VL	SEQ ID NO:108 QSLHTNGDTY	SEQ ID NO:109 KVS	SEQ ID NO:110 SQSTHIPWT
22-E11-C3-F2	VH	SEQ ID NO:113 GYSFTNYG	SEQ ID NO:114 NPYTGEP	SEQ ID NO:115 GRDDGYHYTMNY
	VL	SEQ ID NO:116 QSLIHSNGDTY	SEQ ID NO:117 KVS	SEQ ID NO:118 SQSTYVPWT
24-C10-F9-G7	VH	SEQ ID NO:121 GYTFTDHT	SEQ ID NO:122 ISTYYGNT	SEQ ID NO:123 ARASYGSGYGPPYYWY FDV
	VL	SEQ ID NO:124 EKIYSY	SEQ ID NO:125 NAN	SEQ ID NO:126 QHHYGTPVT
25-C8-D7-C5	VH	SEQ ID NO:129 GFTFSTYA	SEQ ID NO:130 ISGGGIDT	SEQ ID NO:131 ARQSGKGGWAMDY
	VL	SEQ ID NO:132 SSVSF	SEQ ID NO:133 ETS	SEQ ID NO:134 QQWSSNPLT
4-D5-B9-B11	VH	SEQ ID NO:137 GFTFSSYA	SEQ ID NO:138 ISGGGI	SEQ ID NO:139 ARQSGKGGWDAMDY
	VL	SEQ ID NO:140 SSVSF	SEQ ID NO:141 ETS	SEQ ID NO:142 QQWSSNPLT
10-B9-D10-A12	VH	SEQ ID NO:145 GYTFTDYT	SEQ ID NO:146 ISTYYGNT	SEQ ID NO:147 ARASYGSGYGPPYYWY FDV
	VL	SEQ ID NO:148 EKIYSY	SEQ ID NO:149 NAN	SEQ ID NO:150 QHHYGTPVT
15-G1-D1-E3	VH	SEQ ID NO:153 GYTFTSYW	SEQ ID NO:154 IHPKSGTV	SEQ ID NO:155 ARGENYDYPQFVY
	VL	SEQ ID NO:156 SQHSTYT	SEQ ID NO:157 LKKDGS	SEQ ID NO:158 GVGDTIKEQFVYV
8-B4-F5-E11	VH	SEQ ID NO:161 GDTFTSYW	SEQ ID NO:162 IHPDSGTR	SEQ ID NO:163 CSRSYGSRLAWFAY
	VL	SEQ ID NO:164 TGAVTTSNF	SEQ ID NO:165 GTN	SEQ ID NO:166 ALWYTNHFI
6-F3-G2-G1	VH	SEQ ID NO:169 DYTFTNYW	SEQ ID NO:170 IHPNSGTT	SEQ ID NO:171 ASHYGNSYSAMDY
	VL	SEQ ID NO:172 TGAVTTSNY	SEQ ID NO:173 GTS	SEQ ID NO:174 ALWYSTHYV
9-B9-H11-G7	VH	SEQ ID NO:177 GYSITSGYY	SEQ ID NO:178 YISYDGTN	SEQ ID NO:179 ARGDSNSYYFDY
	VL	SEQ ID NO:180 TGAVTTSNY	SEQ ID NO:181 GTS	SEQ ID NO:182 ALWYRTHYV
9-G12-D6-A11	VH	SEQ ID NO:185 GYSITSDYY	SEQ ID NO:186 ISYDGTN	SEQ ID NO:187 ARGKDGSYFDY
	VL	SEQ ID NO:188 TGAVTTSNY	SEQ ID NO:189 GTS	SEQ ID NO:190 ALWYRTHYV
13-A8-C4-G1	VH	SEQ ID NO:193 SGYIFTSNW	SEQ ID NO:194 IHPNSGTT	SEQ ID NO:195 AGPTTTRRFYPMY
	VL	SEQ ID NO:196 TGAVTTSNY	SEQ ID NO:197 GTN	SEQ ID NO:198 ALWYSNHFI

15-C8-B5-G7	VH	SEQ ID NO:201 DYTFTSHWMHW	SEQ ID NO:202 IHPNSGTT	SEQ ID NO:203 AWGSSNSYFYAMAY
	VL	SEQ ID NO:204 TGAVTTSNY	SEQ ID NO:205 GTN	SEQ ID NO:206 ALWFSNHLV
28-G2-E6-B10	VH	SEQ ID NO:209 GYTFTSYW	SEQ ID NO:210 IHPNSDTT	SEQ ID NO:211 ARGGLGPHYFVY
	VL	SEQ ID NO:212 TGAVTTSNY	SEQ ID NO:213 GTS	SEQ ID NO:214 ALWYSPHYV
3-G7-D8-D3	VH	SEQ ID NO:217 GYTFTTYW	SEQ ID NO:218 IYPGDGDT	SEQ ID NO:219 ARPYDGYIDYPMDS
	VL	SEQ ID NO:220 SRINY	SEQ ID NO:221 DTS	SEQ ID NO:222 HQRSSYPFT
14-E7-G9-D4	VH	SEQ ID NO:225 GYTFTNYI	SEQ ID NO:226 INPYNDGI	SEQ ID NO:227 TRWGNVVFYITMDY
	VL	SEQ ID NO:228 SSVSY	SEQ ID NO:229 ATS	SEQ ID NO:230 QQWSGNPPLT
20-C5-D7-D3	VH	SEQ ID NO:233 GFTFRSYG	SEQ ID NO:234 ISGGGNYT	SEQ ID NO:235 ARHEGLPLDY
	VL	SEQ ID NO:236 ENIYSY	SEQ ID NO:237 NAK	SEQ ID NO:238 QHHYGTPTWT
8-C3-E3-F3	VH	SEQ ID NO:241 GFTFSNYG	SEQ ID NO:242 IGSYGGNTY	SEQ ID NO:243 ARDIYYGNSEAWFAY
	VL	SEQ ID NO:244 KSLHLSNGITY	SEQ ID NO:245 QMS	SEQ ID NO:246 AQNLPLPWT
2-A7-B10-A3	VH	SEQ ID NO:249 GYTFTDYA	SEQ ID NO:250 INTNYVNT	SEQ ID NO:251 ARGGKYGNVFFFAFAY
	VL	SEQ ID NO:252 QDISNY	SEQ ID NO:253 YTS	SEQ ID NO:254 QQGNTLPYT
26-D2-D6-B12	VH	SEQ ID NO:257 GYIFRNYG	SEQ ID NO:258 INSYTGKPTY	SEQ ID NO:259 ARDDGYWYTMDY
	VL	SEQ ID NO:260 QSLVHSNGITY	SEQ ID NO:261 KVS	SEQ ID NO:262 SQSTHVPWT
11-C12-F4-F6	VH	SEQ ID NO:265 GYTFRNFG	SEQ ID NO:266 INPYTGEP	SEQ ID NO:267 ARDDGYWYTMDY
	VL	SEQ ID NO:268 QSLVHSNGITY	SEQ ID NO:269 KVS	SEQ ID NO:270 SQSTHVPWT
16-G3-D10-C10	VH	SEQ ID NO:273 GYTFRNYG	SEQ ID NO:274 INPYTGEP	SEQ ID NO:275 ARDDGYWYTMDY
	VL	SEQ ID NO:276 QSLVHSNGITY	SEQ ID NO:277 KVS	SEQ ID NO:278 SQSTHVPWT
27-F8-E10-E11	VH	SEQ ID NO:281 GYTFTEYA	SEQ ID NO:282 INPNIGGT	SEQ ID NO:283 ARFLVPSTEGFTY
	VL	SEQ ID NO:284 SSVSY	SEQ ID NO:285 DTS	SEQ ID NO:286 QQWSSNPLT
7-E1-F8-F6	VH	SEQ ID NO:289 GYTFTDYV	SEQ ID NO:290 IYPRSGNT	SEQ ID NO:291 ARFDIAYSFDY
	VL	SEQ ID NO:292 QSLVHSNGVTY	SEQ ID NO:293 KVS	SEQ ID NO:294 SQGTHVPWT

25-D3-G4-C6	VH	SEQ ID NO:297 GYSFTDYI	SEQ ID NO:298 INPYNST	SEQ ID NO:299 ARDSFDWYFGV
	VL	SEQ ID NO:300 QSLVHSNGNTY	SEQ ID NO:301 KVS	SEQ ID NO:302 SQSTHVPPLT
13-E4-G9-A4	VH	SEQ ID NO:305 GFTFITYA	SEQ ID NO:306 ISGGGIDT	SEQ ID NO:307 TRQGSQGWGAMDY
	VL	SEQ ID NO:308 SRVSF	SEQ ID NO:309 ETS	SEQ ID NO:310 QQWSSNPLT
20-A2-D10-G8	VH	SEQ ID NO:313 GYTFTDYT	SEQ ID NO:314 ISTYYGNT	SEQ ID NO:315 ARASYGSGYGPYYWY FDV
	VL	SEQ ID NO:316 EKIYSY	SEQ ID NO:317 NAN	SEQ ID NO:318 QHHYGSPVT
3-F2-E7-F9	VH	SEQ ID NO:321 GYTFTDYT	SEQ ID NO:322 ISTYYGNT	SEQ ID NO:323 ARASYGSGYGPYYWY FDV
	VL	SEQ ID NO:324 EKIYSY	SEQ ID NO:325 NAN	SEQ ID NO:326 QHHYGTPVT
6-D8-E7-A11	VH	SEQ ID NO:329 GYTFTNYW	SEQ ID NO:330 IHPNSGTT	SEQ ID NO:331 AGYYGSSFSWFTY
	VL	SEQ ID NO:332 TGAVTTSNF	SEQ ID NO:333 GTS	SEQ ID NO:334 ALWYSTHYV
21-B3-B1-H5	VH	SEQ ID NO:337 GYIFRNYG	SEQ ID NO:338 INSYTGKP	SEQ ID NO:339 ARDDGYWYTMDY
	VL	SEQ ID NO:340 QSLVHSNGHTY	SEQ ID NO:341 KVS	SEQ ID NO:342 SQSTHVPWT

Последовательности переменных областей тяжелой или легкой цепи антител 9-E8-F9-C10, 10-G6-C4-B2, 18-F9-D8-G7, 9-G2-H6-E4, 20-F8-B5-G2, 30-C7-C11-D4, 23-F10-G4-F11, 6-H11-G5-D8, 27-E7-D8-C7, 30-E2-G7-G7, 5-D1-G6-D9, 3-C2-C3-E7, 11-G10-B4-B11, 16-C6-F7-F5, 22-E11-C3-F2, 24-C10-F9-G7, 25-C8-D7-C5, 4-D5-B9-B11, 10-B9-D10-A12, 15-G1-D1-E3, 8-B4-F5-E11, 6-F3-G2-G1, 9-B9-H11-G7, 9-G12-D6-A11, 13-A8-C4-G1, 15-C8-B5-G7, 28-G2-E6-B10, 3-G7-D8-D3, 14-E7-G9-D4, 20-C5-D7-D3, 8-C3-E3-F3, 2-A7-B10-A3, 26-D2-D6-B12, 11-C12-F4-F6, 16-G3-D10-C10, 27-F8-E10-E11, 7-E1-F8-F6, 25-D3-G4-C6, 13-E4-G9-A4, 20-A2-D10-G8, 3-F2-E7-F9, 6-D8-E7-A11 и 21-B3-B1-H5 представлены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности переменных областей антител к CD276

Клон	VH	VL
9-E8-F9-C10	SEQ ID NO:7 EVQLQQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFSDYWLSWVKQRPG HGLEWIGDICPGSGNIYYNERF KDKVILTADRSSSTAYLQFSSL TSEDSVVYFCTRLITRVIDYWG QGTSVTVST	SEQ ID NO:8 ENVLTQSPAIMASAPGEKVTM TCSASSSVNYMHWYQQKSSTS PKLWIYDTSKLSSGVPGRFSGS GSGNSYSLTISSMEAEDVATY YCFQGSQGYPLTFGAGTKLELK
10-G6-C4-B2	SEQ ID NO:15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC ATSGFTLSDYYMSWVRQPPGK APEWLGFMRNKANGYTTEYSA SVRGRFTISRDTSQSIHLLQMNT LRAEDGATYYCVRDRDGRPFA YWGQGTLLTVSA	SEQ ID NO:16 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTM SCKSSQSLNLSINQKNFLTQY QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAIYYCQNDYTYPLTFGT GTKLELK
18-F9-D8-G7	SEQ ID NO:23 EVQLQQSGPELVRPGVSVKISC KSGSYTFTDYAMHWVKQSHA QSLEWIGIINTYSGDTNYNQKF KGKATMTVDKSSSTAYMGLA RLTSEDSAIFYCARGGGNYPY WYFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:24 ENVLTQSPAIMASAPGEKVTM TCRASSSVSSSYLHWYQQKSG DSPKLWIYSTSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISSVEAEDAAT YYCQQFSVYPLTFGAGTKLEI K
9-G2-H6-E4	SEQ ID NO:31 EVQLQQSGPDLVKPGASVKISC KASGYSFTGYFMNWVKQRHG KSLEWIGYINPNNGDTIYNQKF KGKATLTVDKSSSTAHEMELLS LTSEDSAVYYCGRGGLPFGAL DYWGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:32 DIVMSQSPSSLAVSVGEKVN SCKSSQSLLYSRNQKNYLAWN QQKPGQSPKLLIYWASARESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVK AEDLAAAYYCQYHSYPYTFG GGTKLELK
20-F8-B5-G2	SEQ ID NO:39 EVQLQESGPSLVKPSQTLSTC SVTGDSITSAYWNWIRKFPGNK LEYMGYISNSGSTYYNPSLKR ISITRDTSKNQYLLQLNSVTTE DTGTYCVRGERYYGYGAYW GQGTLLTVSA	SEQ ID NO:40 DIVMTQATPSVPVTPGESISIC RSSKSLLSHNGNTYLYWFLQR PGQSPQLLIYRMSNLASGVPD RFSGSGSGTAFTLRISRVEAED VGVYYCMQHLEYPFTFGAGT KLELK
30-C7-C11-D4	SEQ ID NO:47 EVQLVESGPGLVKPSQSLSTC TVTGYSDYAWNWIRQFPG NKLEWVMGYISHSGSTSYNPSLK SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTT EDTATYYCARSLGRRWYFDV WGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:48 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTL SCKSSQSLNLSSTQKNYLAWY QQKPGQSPKLLVYFASTRDSG VPDRFIGSGSGTEFTLTISSVQA EDLADYFCQQHYIIPFTFGAGT KLEIK
23-F10-G4-F11	SEQ ID NO:55 EVQLQESGPDVLRPGALVKLSC KSSGFNIKDYPIHWVRQRPEQG LEWIGWFDPDNGNVIYDPRFQ GKASITADTSSNTAYLQLNSLT SEDTAVYYCSSPYGAMDYWG QGTSVTVSS	SEQ ID NO:56 QIVLTQSPEIMASAPGEKVTMT CSASSSVSYIHWYQQKSGTSP KRWIYDTSKLASGVPARFSGS GSGTSYSLTIRSMEAEDAATY YCQQGSSNPRTFGGGTKLEIK
6-H11-G5-D8	SEQ ID NO:63 EVQLQESGPELVKPGTSVKLSC KASGYTFTSYDINWVRQRPEQ	SEQ ID NO:64 QIVLTQSPEIMASAPGEKVTMT CSASSSVSYIHWYQQKSGTSP

	GLEWIGWIFPGNGDTYYNEKF KGKATLTSKSSSTAYMQLSR LTSEDSAVYFCARDLRLGTFDY WGQGTTTLTVSS	KRWIYDTSKLASGVPARFSGS GSGTSYSLTIRSMEAEDAATY YCQQGSSNPRTFGGGTKLELK
27-E7-D8-C7	SEQ ID NO:71 EVQLQESGPELVRPGVSVKISC KSGSYTFTDYAMHWVKQSHA KSLEWIGVINTYSDNTNYNRKF KGKATMTVDKSSSTAYMELAR LTSEDSAIYYCARGLLRSQLG VYFDYWGQGTTTLTVSS	SEQ ID NO:72 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVSYMHWYQQKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWSSNPWTFGGGTKLEIK
30-E2-G7-G7	SEQ ID NO:79 EVQLQESGGGLVKPGGSLKLS CAASGFTFSYYAMSWVRQTPE KRLEWVATINGDGSHTYYPDS VRGRFTISRDNANTLYLQVSS LRSEDTAMYYCASLLQLGPFW GQGTTTLTVSS	SEQ ID NO:80 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSV TCKASQNVGTNVAWYHQRPG QSPKPLIYSASYRSGVPDRFT GSGSGTDFTLTISNVQSEDLAE YFCQQYNNYPLTFGSGTKLEI K
5-D1-G6-D9	SEQ ID NO:87 EVQLQESGAELVKPGASVKLS CKTSGLTFSTNYISWLKQKPGQ SLEWIAWIYGGNGGTSYNQRF TGKAQLTVDTSSTAYMQFSSL TTEDSAIYYCTSHDYGGPMD YWGQTSVTVSS	SEQ ID NO:88 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYFTSRLHSGVPSRFSAS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQTNTLPWTFGGGTKLEIK
3-C2-C3-E7	SEQ ID NO:95 EVQLQQSGPELVKPGASVKISC KTSGYTFTENTMHWVKQSHG KRLEWIGGINPNTGGTTYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMELRS LTSEDSAVYYCARRGTNWEH WYFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:96 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMT CSASSSVSYMHWYQQKSGTSP KRWIYDTSKLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWSSNPLTFGAGTKLELK
11-G10-B4-B11	SEQ ID NO:103 DVQLQESGPELVKPSQSLSLTC TVTGYISYSDYAWNWRQFPG NKLEWMGYISYSGSTSYNPSLK SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTT EDTATYYCARGGPWFAYWGQ GTLVTVSA	SEQ ID NO:104 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASIS CRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPFTFGSGTKL EIK
16-C6-F7-F5	SEQ ID NO:111 QIQLVQSGPEVKKPGETVKISC KASGYTFTKYGINWVKQAPGE GLKWMGWIWYTYTGKPTYGDD FKGRFAFSLETSASTAYLQISDL KIEDMATYFCARDDGYYYTM NYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:112 DIVMTQTPLSLPVS LGDQASIS CRSSQSLHTNGD TYLHWYLQ KAGQPPKLLIYKVS NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYFCSQSTHIPWTFGGGT KLEIK
22-E11-C3-F2	SEQ ID NO:119 QIQLVQSGPELKRPGETVKISC KASGYSFTNYGMNWVKQAPG KGLKWMGWINPYTGEPTYAD DFKGRFAMSLETSASAAYLQIN NLKNEDMATYFCGRDDGYHY TMNYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:120 DVVMTQPPLSLPVS LGDQASIS CRSSQSLIHSNGD TYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS IRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTYVPWTFGGGTK LEIK

24-C10-F9-G7	SEQ ID NO:127 EVQLQESGPELVRPGVSVKISC KSGSYTFTDHTMHVVKESHA QSLEWIGVISTYYGNTNYNQNF KGKATLTVDKSSSTAYMELAG LTSEDSAIYYCARASYGSGYGP YYWYFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:128 DIQMTQSPASLFASVGETVTIT CRASEKIYSYLAWFQKQGKS PQFLVYNANALAEVPSRFSG SGSGTQFSLKINSLQPEDFGTY YCQHGYGTPVTFGAGSKLELK
25-C8-D7-C5	SEQ ID NO:135 EVQLQESGGGLVKPGGSLKFSC AASGFTFSTYAMSWVRQTPEK RLEWVATISGGIDTYYPDSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLR SEDTAMYYCARQSGKGGWAM DYWGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:136 QIVLTQSPAISASPGKVTMT CRASSVSFMHWYQQKSGTSP KRWIYETSKLASGVPDRFSGS GSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWSSNPLTFGAGTKLELK
4-D5-B9-B11	SEQ ID NO:143 EIGGLVKPGGSLKFSCAASGFT FSSYAMSWVRQTPEKRLEWVA TISGGIYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLRSEDAMYY CARQSGKGDAMDYWGQGT SVTVSS	SEQ ID NO:144 QIVLTQSPAISASPGKVTMT CRASSVSFMHWYQQKSGTSP KRWIYETSKLASGVPDRFSGS GSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWSSNPLTFGAGTKLELK
10-B9-D10-A12	SEQ ID NO:151 EVQLQESGPELVRPGVSVKISC KSGSYTFTDYTMHVVKLSHA KSLEWIGVISTYYGNTNYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMELAR LTSEDSAIYYCARASYGSGYGP YYWYFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:152 DIQMTQSPASLFASVGETVTIT CRASEKIYSYLAWFQKQGKS PQFLVYNANALAEVPSRFSG SGSGTQFSLKINSLQPEDFGTY YCQHGYGTPVTFGAGSKLELK
15-G1-D1-E3	SEQ ID NO:159 QVQLQQPGAELVKPGTSVKLS CKASGYTFTSYWIHWVKQRPG QGLEWIGMIHPKSGTVDYNEK FKSKATLTADKSSNTAYMQLS SLTSEASVYYCARGENYDYR PQFVYWGQGLTVTVSA	SEQ ID NO:160 QLVLTQSSASFSLGASAKLTC TLSSQHSTYTIEWYQQPLKPP KYVMELKKGDSHRTGDGIPDR FSGSSSGADRYLSISNIQPEDEA IYICGVGDTIKEQFVYVFGGGT KVTVL
8-B4-F5-E11	SEQ ID NO:167 QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKASGDTFTSYWMHWVKQRP GQGLEWIGMIHPDSGTRNYNE KVMSKATLNVDKSSSTAYLHL SSLTSEDSAVYYCSRYSRLA WFAYWGQGLTVTVSA	SEQ ID NO:168 QAVVTQESALTTSPGETVTLT CRSSTGAVTTSNFANWVQEKP DHLFTGLIGGTNNRAPGVPAR FSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AVYFCALWYTNHFIFGSGTKV TVL
6-F3-G2-G1	SEQ ID NO:175 QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKASDYTFTNYWMHWVKQRP GQGLEWIGMIHPNSGTTSYNEK FKNKATLTVDTSSATTYMLSS LTSEDSAVYYCASHYGNSYSA MDYWGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:176 QAVVTQESALTTSPGGTVILTC RSSTGAVTTSNYANWVQEKP DHLFTGLIGGTNNRAPGVVPRF SGSLIGDKAALTITGAQTEDDA MYFCALWYSTHYVFGGGTKV TVL
9-B9-H11-G7	SEQ ID NO:183 DVQLQESGPELVKPSQSLSLTC SVTGYSITSGYYWNWIRQFPGN KLEWMVYISYDGTNNYNPSLK	SEQ ID NO:184 QAVVTQESALTTSPGGTVILTC RSSTGAVTTSNYANWVQEKP DHLFTGLIGGTNNRAPGVVPRF

	NRISITRDTSKNQFFLKLNSVTT EDTATYYCARGDSNSYYFDYW GQGTTTLTVSS	SGSLIGDKAALTITGAQTEDDA MYFCALWYRTHYVFGGGTKV TVL
9-G12-D6-A11	SEQ ID NO:191 DVQLQVSGPGLVKPSQSLSLTC SVAGYSITSDYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYDGTNNYNPSL KNRISITRDTSKGQFFLKFNSVT TEDTATYYCARGKDGSSYYFDY WGQGTTTLTVSS	SEQ ID NO:192 QAVVTQESALTTSPGGTVILTC RSSTGAVTTSNYANWVQEKP DHLFTGLIGGTSNRAPGVPVRF SGSLIGDKAALTITGAQTEDDA MYFCALWYRTHYVFGGGTM VTVL
13-A8-C4-G1	SEQ ID NO:199 QVQLQQPGAELVKPGASKLS CKASGYIFTSNWMHWVKQRP GQGLEWIGMIHPNSGTTSYNEK FKNKAKLTVDKSSSTAYVQLSS LTSEDSAVYYCAGPTTTRRFYP MDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:200 QAVVTQESALTTSPGETVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQEKP DHLFTGLIGGTNNRAPGVPAR FSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNHFIFGSGTKVT VL
15-C8-B5-G7	SEQ ID NO:207 QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKASDYTFTSHWMHWVKQRP GQGLEWIGMIHPNSGTTHYNE NFKNKATLTVDNSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCAWGSSNSYF YAMAYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:208 QAVVTQESALTTSPGETVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQEKP AHLFTGLIGGTNNRAPGVPAR FSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWFSNHLVFGGGTKL TVL
28-G2-E6-B10	SEQ ID NO:215 QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKASGYTFTSYWMHWVKQRP GQGLEWIGMIHPNSDTHDYNE KFKTKATLTVDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVFYCARGGLGPHY FVYWGQGTTTLTVSS	SEQ ID NO:216 QAVVTQESALTTSPGGTVILTC RSSTGAVTTSNYASWVQEKPD HLFTGLIGGTSNRAPGVPVRF GSLIGDKAALTITGAQTEDDA MYFCALWYSPHYVFGGGTKV TVL
3-G7-D8-D3	SEQ ID NO:223 QVQLQQSGAELARPGTSVKLS CKASGYTFTTYWIQWVKQRP QGLEWIGAIYPGDGDTRYTQK FKGKATLTADKSSSTAYMQLS TLASEDSAVYYCARPYDGYI DYPMDSWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:224 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMT CSASSRINYMHWYQQKPGTSP IIWIYDTSKLAGVPARFSGSG SGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQRSSYPFTFGSGTKLEIK
14-E7-G9-D4	SEQ ID NO:231 EVQLQQSGPELVKPGASVKMS CKASGYTFTNYIMHWVKQKPG QGLEWIGYINPYNDGIKYNEKF KGKATLTSKSSSTAYMELSSL TSEDSAVYYCTRWGNVYFYT MDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:232 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVSYMHWYQQKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRMEAEDAATY YCQQWSGNPPLTFGAGTKLEL K
20-C5-D7-D3	SEQ ID NO:239 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLS CAASGFTFRSYGMSWVRQTPD KRLEWVATISGGGNYTYYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMS LKSEDTAMYCARHEGLPLDY WGQGTTTLTVSS	SEQ ID NO:240 DIQMTQSPASLSASVGETVTIT CRASENIYSYLAWYQQKQGKS PQLLVYNAKTLAEGVPSRFSG SGSGTQFSLKINSLQPEDFGNF YCQHHYGTPTWTFGGGKLEI K
8-C3-E3-F3	SEQ ID NO:247	SEQ ID NO:248

	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSNYGLSWRLTPD KRLEVVATIGSYGGNTYYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMSS LKSEDTAIYYCARDIYYGNSEA WFAYWGQGTLVTVSA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASIS CRSSKSLLSHNGITYLYWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVP DRFSSSGSETDFTLRISRVEAE DVGVYYCAQNLELPWTFGGG TKLEIK
2-A7-B10-A3	SEQ ID NO:255 QVQLQQSGAELVRPGVSVKISC KSGYTFSTDYAMHWVKQSHA KSLEWIGVINTNYVNTSYNQKF KGKATMTVDKSSSTAFMELAR LTSEDSAIYYCARGGKYGNYV FFFAYWGQGTLVTVSA	SEQ ID NO:256 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEIK
26-D2-D6-B12	SEQ ID NO:263 QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYIFRNYGMNWVKQAPG KGLKWMGWINSYTGKPTYVD DFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKNEDMATYFCARDDGYWY TMDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:264 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASIS CRSSQSLVHSNGHTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPWTFGGGTK LEIK
11-C12-F4-F6	SEQ ID NO:271 QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFRNFGMNWVKQGPG KGLKWMGWINPYTGEPTYVG DFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKNEDMATYFCARDDGYWY TMDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:272 DVVMTQTTPSLPVS LGDQASIP CRSSQSLVHSNGITYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPWTFGGGTK LEIK
16-G3-D10-C10	SEQ ID NO:279 QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFRNYGMNWVKQGPG KDLKWMGWINPYTGEPTYIGD FKGRFAFSLETSANSAYLQINN LNEDMATYFCARDDGYWYT MDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:280 DVVMTQTTPSLPVS LGDQASIP CRSSQSLVHSNGITYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPWTFGGGTK LEIK
27-F8-E10-E11	SEQ ID NO:287 EVQLQQSGPELVKPGASVKISC KTSGYTFTEYAMHWVKQSHG KILEWIGGINPNIGGTTYNQKF KDKATLTVDKSSSTASMELRSL TSEDSAVYYCARFLVPSTEGFT YWGQGTLVTVSA	SEQ ID NO:288 QIVLTQSPA IMSASPGEKVTMT CSASSSVSYMHWYQQKSGTSP KRWIYDTSRVASGV PARFSGS GSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWSSNPLTFGAGTKLELK
7-E1-F8-F6	SEQ ID NO:295 QVQLQQSGPELVKPGASVQMS CKASGYTFSTDYVISWVNQRTG QGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKF KGKATLTADKSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYFCARFDIAYSFDY WGQGTTLTVSS	SEQ ID NO:296 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASIS CRSTQSLVHSNGV TYLHWYL QKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYFCSQGTHVPWTFGGG TKLEIK
25-D3-G4-C6	SEQ ID NO:303 EIQLQQTGPELVKPGASVKISC KASGYSFTDYIILWVKQSHGMS LEWIGNINPYYNSTYYNLKFKG KATLTVDKSSSTAYMQLDSLTS	SEQ ID NO:304 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASIS CRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVED

	EDSAVYYCARDSFDWYFGVW GAGTTVTVSS	LGIYFCSQSTHVPPLTFGAGTK LELK
13-E4-G9-A4	SEQ ID NO:311 EVMLVESGGGLVKPGGSLKFS CAASGFTFITYAMSWVRQTPE KRLEWVATISGGGIDTYYPDSV KGRFTISRDNKNTLYLQVNSL RSEDTAMYYCTRQGSQGWGA MDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:312 QIVLTQSPPIMSASPGERVMT CRASSRVSMHWYQQKSGTSP RRWIYETSKLASGVPDRFSGS VSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWSSNPLTFGAGTKLELK
20-A2-D10- G8	SEQ ID NO:319 QVQLQQSGPELVRPGVSVKISC KSGYTFDVTMHWVKESHA QSLEWIGVISTYYGNTNYNQNF KGKATLTVDKSSSTAYMELAG LTSEDSAIYYCARASYGSGYGP YYWYFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:320 DIQMTQSPASLFASVGETVTIT CRASEKIYSYLAWFQKQKGS PQFLVYNANALAEVPSRFSG SGSGTQFSLKIKSLQPEDFGTY YCQHGYGSPVTFGAGSKLELK
3-F2-E7-F9	SEQ ID NO:327 QVQLQQSGPELVRPGVSVKISC KSGYTFDVTMHWVKESHA KSLEWIGVISTYYGNTNYNQNF KGKATLTVDKSSSTAYMELAG LTSEDSAIYYCARASYGSGYGP YYWYFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO:328 DIQMTQSPASLFASVGETVTIT CRASEKIYSYLAWFQKQKGS PQFLVYNANALAEVPSRFSG SGSGTQFSLKINSLQPEDFGTY YCQHGYGTPVTFGAGSKLELK
6-D8-E7-A11	SEQ ID NO:335 QVHLQQPGAELVKPGASVKLS CKASGYTFTNYWMHWVKRRP GQGLEWIGMIHPNSGTTSFNEK FKSKATLTVDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCAGYYGSSFSW FTYWGQGLTVTSA	SEQ ID NO:336 QAVVTQESALTTSPGGTVILTC RSSTGAVTTSNFANWVQEKPD HLFTGLIGGTSNRAPGVPVRF GSLIGDKAALTITGAQTEDDA MYFCALWYSTHYVFGGGTKV TVL
21-B3-B1-H5	SEQ ID NO:343 QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYIFRNYGMNWVKQAPG KGLKWMGWINSYTGKPTYVD DFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKNEDMATYFCARDDGYWY TMDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO:344 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSNGHTYLHWYEQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPWTFGGGTK LEIK

Известно, что области CDR отвечают за связывание антигена, однако было обнаружено, что не все из 6 CDR являются незаменимыми или неизменяемыми. Иными словами, можно заменить, или изменить, или модифицировать одну или более CDRs в антителе к CD276 9-E8-F9-C10, 10-G6-C4-B2, 18-F9-D8-G7, 9-G2-H6-E4, 20-F8-B5-G2, 30-C7-C11-D4, 23-F10-G4-F11, 6-H11-G5-D8, 27-E7-D8-C7, 30-E2-G7-G7, 5-D1-G6-D9, 3-C2-C3-E7, 11-G10-B4-B11, 16-C6-F7-F5, 22-E11-C3-F2, 24-C10-F9-G7, 25-C8-D7-C5, 4-D5-B9-B11, 10-B9-D10-A12, 15-G1-D1-E3, 8-B4-F5-E11, 6-F3-G2-G1, 9-B9-H11-G7, 9-G12-D6-A11, 13-A8-C4-G1, 15-C8-B5-G7, 28-G2-E6-B10, 3-G7-D8-D3, 14-E7-G9-D4, 20-C5-D7-D3, 8-C3-E3-F3, 2-A7-B10-A3, 26-D2-D6-B12, 11-C12-F4-F6, 16-G3-D10-C10, 27-F8-E10-E11, 7-E1-

F8-F6, 25-D3-G4-C6, 13-E4-G9-A4, 20-A2-D10-G8, 3-F2-E7-F9, 6-D8-E7-A11 и 21-B3-B1-H5, но при этом по существу сохранить специфическую аффинность связывания с CD276.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, содержат последовательность тяжелой цепи CDR3 одного из антител к CD276 9-E8-F9-C10, 10-G6-C4-B2, 18-F9-D8-G7, 9-G2-H6-E4, 20-F8-B5-G2, 30-C7-C11-D4, 23-F10-G4-F11, 6-H11-G5-D8, 27-E7-D8-C7, 30-E2-G7-G7, 5-D1-G6-D9, 3-C2-C3-E7, 11-G10-B4-B11, 16-C6-F7-F5, 22-E11-C3-F2, 24-C10-F9-G7, 25-C8-D7-C5, 4-D5-B9-B11, 10-B9-D10-A12, 15-G1-D1-E3, 8-B4-F5-E11, 6-F3-G2-G1, 9-B9-H11-G7, 9-G12-D6-A11, 13-A8-C4-G1, 15-C8-B5-G7, 28-G2-E6-B10, 3-G7-D8-D3, 14-E7-G9-D4, 20-C5-D7-D3, 8-C3-E3-F3, 2-A7-B10-A3, 26-D2-D6-B12, 11-C12-F4-F6, 16-G3-D10-C10, 27-F8-E10-E11, 7-E1-F8-F6, 25-D3-G4-C6, 13-E4-G9-A4, 20-A2-D10-G8, 3-F2-E7-F9, 6-D8-E7-A11 и 21-B3-B1-H5. В некоторых воплощениях антитела к CD276 и антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, содержат последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259, 267, 275, 283, 291, 299, 307, 315, 323, 331 и 339. Области CDR3 тяжелой цепи расположены в центре антигенсвязывающего сайта и поэтому, как предполагается, создают основной контакт с антигеном и обеспечивают наибольшую свободную энергию в отношении аффинности антитела к антигену. Также предполагается, что CDR3 тяжелой цепи является на сегодняшний день является наиболее разнообразной CDR антигенсвязывающего сайта с точки зрения длины, аминокислотного состава и конформации благодаря множественным механизмам диверсификации (Tonegawa S. *Nature*. 302:575-81). Разнообразие CDR3 тяжелой цепи достаточно для получения большинства специфичных признаков антител (Xu JL, Davis MM. *Immunity*. 13:37-45), а также желаемой антигенсвязывающей аффинности (Schier R, etc. *J Mol Biol*. 263:551-67).

В некоторых воплощениях антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем документе, содержат подходящие последовательности каркасной области (FR) при условии, что указанные антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты могут специфически связываться с CD276. Последовательности CDR, представленные в таблице 1, получены из мышинных антител, но их можно привить к любым подходящим последовательностям FR любого подходящего вида, например мыши, человека, крысы, кролика и других, с использованием подходящих методов, известных в данной области, таких как рекомбинантные методы.

В некоторых воплощениях антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, оптимизированы по РТМ. В настоящем документе оптимизация по РТМ относится к посттрансляционной модификации, направленной на предотвращение потенциальной агрегации, потери активности или другого риска. Примеры оптимизированных по РТМ антитела и/или их антигенсвязывающих фрагментов также включают mVH5-mVL4-10 и mVH-mVL1-30, полученные из 10-G6-C4-B2 и 30-C7-C11-D4, соответственно. Последовательности переменных областей mVH5-mVL4-10 и mVH-mVL1-30 представлены в таблице 3, где все области CDR выделены.

Таблица 3. Последовательности CDR и последовательности переменных областей антител к CD276 с оптимизацией по РТМ

Клон	VH		VL	
mVH5-mVL4-10	SEQ ID NO: 347 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC ATSGFTLSDYYMSWVRQPPGK APEWLGFMRNKANAYTTEYSA SVRGRFTISRDTQSIIYLQMN LRAEDGATYYCVRDREGRPFAYWGQGT LTVSA		SEQ ID NO: 348 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTM SCKSSQSLLNAINQKNFLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAIYYCQNDYTYPLTFGT GTKLELK	
	CDR1	SEQ ID NO:9 GFTLSDYY	CDR1	SEQ ID NO:376 QSLLNAINQKNF
	CDR2	SEQ ID NO: 374 MRNKANAYTT	CDR2	SEQ ID NO:13 WAS
	CDR3	SEQ ID NO: 375 VRDREGRPFAY	CDR3	SEQ ID NO:14 QNDYTYPLT
mVH-mVL1-30	SEQ ID NO: 349 EVQLVESGPGLVKPSQSLSLTC TVTGYSDYAWNWRQFPG NKLEWMGYISHSGSTSYNPSLK SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTT EDTATYYCARSLGRRWYFDV WGAGTTVTVSS		SEQ ID NO: 350 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTL SCKSSQSLLOSSTQKNYLAWY QQKPGQSPKLLVYFASTRDSG VPDRFIGSGSGTEFTLTISSVQA EDLADYFCQQHYIPFTFGAGT KLEIK	
	CDR1	SEQ ID NO:41 GYSITSDYA	CDR1	SEQ ID NO:377 QSLLOSSTQKNY
	CDR2	SEQ ID NO:42 SHSGST	CDR2	SEQ ID NO:45 FAS
	CDR3	SEQ ID NO:43 ARSLGRRWYFDV	CDR3	SEQ ID NO:46 QQHYIPFT

В некоторых воплощениях антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, являются гуманизированными. Гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент желательны из-за их пониженной иммуногенности у человека. Гуманизированное антитело является химерным в своих переменных областях, поскольку нечеловеческие последовательности CDR привиты к человеческим или по существу человеческим последовательностям FR. Гуманизация

антитела или антигенсвязывающего фрагмента может быть по существу осуществлена путем замены генов CDR нечеловеческого происхождения (например, мышинных) на соответствующие гены CDR человека в гене иммуноглобулина человека (см., например, Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536).

Подходящие вариабельные домены тяжелой и легкой цепи человека могут быть выбраны для достижения этой цели с использованием способов, известных в данной области. В иллюстративном примере может быть использован подход «наилучшего соответствия», при котором последовательность вариабельного домена антитела, отличного от человека (например, грызуна), подвергают скринингу или анализу с помощью программы BLAST по базе данных известных последовательностей вариабельного домена человека, идентифицируют последовательность человека, наиболее близкую к нечеловеческой последовательности из запроса и используют ее в качестве человеческого каркаса для прививки нечеловеческих последовательностей CDR (см., например, Sims et al, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). В качестве альтернативы, каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител, может быть использован для прививки нечеловеческих CDR (см., например, Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*,151:2623). В некоторых воплощениях гуманизированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, по существу состоят из всех последовательностей человека, за исключением последовательностей CDR, которые не являются человеческими. В некоторых воплощениях FR вариабельной области и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу взяты из последовательностей иммуноглобулина человека. Последовательности FR человека и последовательности константной области человека могут происходить из разных генов иммуноглобулинов человека, например последовательности FR могут быть получены из одного антитела человека, а константная область – из другого антитела человека.

В нижеприведенной таблице 4 представлены аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител для 10-G6-C4-B2 и 30-C7-C11-D4, которые обозначены как hVH2-hVL1-10, hVH3-hVL3-10, hVH4-hVL1-10, hVH4-hVL2-10, hVH5-hVL1-10, hVH5-hVL3-10, 10-G6-C4-B2_hVH2-VL1_PTM, 10-G6-C4-B2_hVH3-VL3_PTM, 10-G6-C4-B2_hVH4-VL1_PTM, 10-G6-C4-B2_hVH4-VL2_PTM, 10-G6-C4-B2_hVH5-VL1_PTM, 10-G6-C4-B2_hVH5-VL3_PTM, hVH1-hVL5-30, hVH2-

hVL1-30, hVH3-hVL2-30, hVH3-hVL5-30, hVH4-hVL2-30, hVH4-hVL5-30, 30-C7-C11-D4_hVH1-hVL5_PTM, 30-C7-C11-D4_hVH2-hVL1_PTM, 30-C7-C11-D4_hVH3-hVL2_PTM, 30-C7-C11-D4_hVH3-hVL5_PTM, 30-C7-C11-D4_hVH4-hVL2_PTM и 30-C7-C11-D4_hVH4-hVL5_PTM, где все области CDR подчеркнуты.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности вариабельной области гуманизированных антител

Антитело	VH	VL
hVH2- hVL1-10	SEQ ID NO: 351 EVQLVESGGGLVQP <u>GG</u> SLRLS CATSGFTLS <u>DIYYMSWVRQAP</u> GKGLEWVS <u>FMRNKANGYTT</u> EYSASVRGRFTISRDTSKSTIY LQMNSLRAEDTAVYYC <u>V</u> RDR <u>DGRPFAYWGQGLVTVSS</u>	SEQ ID NO: 352 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQ <u>LLNSINQKNFLTW</u> YQKPGQPPKLLIYW <u>ASTRE</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDLAVYYC <u>QNDY</u> TYP <u>LTFGQGTKLEIK</u>
hVH3- hVL3-10	SEQ ID NO: 353 EVQLVESGGGLVQP <u>GG</u> SLRLS CATSGFTLS <u>DIYYMSWVRQAP</u> GKGLEWV <u>G</u> FMRNKANGYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSSIY LQMNSLKTEDTAVYYC <u>V</u> RDR <u>DGRPFAYWGQGLVTVSS</u>	SEQ ID NO: 354 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKSSQ <u>LLNSINQKNFLTW</u> YQKPGKAPKLLIYW <u>ASTRE</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATIYYC <u>QNDY</u> TYPL <u>T</u> FGQGTKLEIK
hVH4- hVL1-10	SEQ ID NO: 355 EVQLVESGGGLIQ <u>P</u> GGSLRLS CATSGFTLS <u>DIYYMSWVRQPP</u> GKGLEWVS <u>FMRNKANGYTT</u> EYSASVRGRFTISRDTSKSTIY LQMNSLRAEDTAVYYC <u>V</u> RDR <u>DGRPFAYWGQGLVTVSS</u>	SEQ ID NO: 352 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQ <u>LLNSINQKNFLTW</u> YQKPGQPPKLLIYW <u>ASTRE</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDLAVYYC <u>QNDY</u> TYP <u>L</u> TFGQGTKLEIK
hVH4- hVL2-10	SEQ ID NO: 355 EVQLVESGGGLIQ <u>P</u> GGSLRLS CATSGFTLS <u>DIYYMSWVRQPP</u> GKGLEWVS <u>FMRNKANGYTT</u> EYSASVRGRFTISRDTSKSTIY LQMNSLRAEDTAVYYC <u>V</u> RDR <u>DGRPFAYWGQGLVTVSS</u>	SEQ ID NO: 356 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQ <u>LLNSINQKNFLTW</u> YLQKPGQSPQLLIYW <u>ASTRE</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYC <u>QNDY</u> TYP <u>L</u> TFGQGTKLEIK
hVH5- hVL1-10	SEQ ID NO: 357 EVQLVESGGGLVQP <u>G</u> RSRLS CTTSGFTLS <u>DIYYMSWVRQAP</u> GKGLEWV <u>G</u> FMRNKANGYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSIYL QMNSLKTEDTAVYYC <u>V</u> RDRD <u>GRPFAYWGQGLVTVSS</u>	SEQ ID NO: 352 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQ <u>LLNSINQKNFLTW</u> YQKPGQPPKLLIYW <u>ASTRE</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDLAVYYC <u>QNDY</u> TYP <u>L</u> TFGQGTKLEIK
hVH5- hVL3-10	SEQ ID NO: 357 EVQLVESGGGLVQP <u>G</u> RSRLS	SEQ ID NO: 354 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI

	<p>CTTSGFTLSDYYMSWVRQAP GKGLEWVGFMRNKANGYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSIIYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDRD GRPFAYWGQGTLVTVSS</p>	<p>TCKSSQSLLNAINQKNFLTW YQKPGKAPKLLIYWASTRE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATYYCQNDYTYPL TFGQGTKLEIK</p>
10-G6-C4-B2_hVH2-VL1_PTM	<p>SEQ ID NO: 358 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CATSGFTLSDYYMSWVRQAP GKGLEWVGFMRNKANAYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSTIY LQMNSLRAEDTAVYYCVRDR EGRPFAYWGQGTLVTVSS</p>	<p>SEQ ID NO: 359 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLLNAINQKNFLTW YQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDLAVYYCQNDYTYPL LTFGQGTKLEIK</p>
10-G6-C4-B2_hVH3-VL3_PTM	<p>SEQ ID NO: 360 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CATSGFTLSDYYMSWVRQAP GKGLEWVGFMRNKANAYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSSIY LQMNSLKTEDTAVYYCVRDR EGRPFAYWGQGTLVTVSS</p>	<p>SEQ ID NO: 361 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKSSQSLLNAINQKNFLTW YQKPGKAPKLLIYWASTRE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATYYCQNDYTYPL TFGQGTKLEIK</p>
10-G6-C4-B2_hVH4-VL1_PTM	<p>SEQ ID NO: 362 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLS CATSGFTLSDYYMSWVRQPP GKGLEWVGFMRNKANAYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSTIY LQMNSLRAEDTAVYYCVRDR EGRPFAYWGQGTLVTVSS</p>	<p>SEQ ID NO: 359 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLLNAINQKNFLTW YQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDLAVYYCQNDYTYPL LTFGQGTKLEIK</p>
10-G6-C4-B2_hVH4-VL2_PTM	<p>SEQ ID NO: 362 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLS CATSGFTLSDYYMSWVRQPP GKGLEWVGFMRNKANAYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSTIY LQMNSLRAEDTAVYYCVRDR EGRPFAYWGQGTLVTVSS</p>	<p>SEQ ID NO: 363 DIVMTQSPLSLPVTGPGEASI SCKSSQSLLNAINQKNFLTW YLQKPGQSPQLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYCQNDYTYPL LTFGQGTKLEIK</p>
10-G6-C4-B2_hVH5-VL1_PTM	<p>SEQ ID NO: 364 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CTTSGFTLSDYYMSWVRQAP GKGLEWVGFMRNKANAYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSIIYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDRE GRPFAYWGQGTLVTVSS</p>	<p>SEQ ID NO: 359 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLLNAINQKNFLTW YQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDLAVYYCQNDYTYPL LTFGQGTKLEIK</p>
10-G6-C4-B2_hVH5-VL3_PTM	<p>SEQ ID NO: 364 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CTTSGFTLSDYYMSWVRQAP GKGLEWVGFMRNKANAYTT EYSASVRGRFTISRDTSKSIIYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDRE</p>	<p>SEQ ID NO: 361 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKSSQSLLNAINQKNFLTW YQKPGKAPKLLIYWASTRE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATYYCQNDYTYPL TFGQGTKLEIK</p>

	<u>GRPFAYWGQGLTVTVSS</u>	
hVH1- hVL5-30	SEQ ID NO: 365 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGY <u>SITSDY</u> AWNWRQHP GKGLEWIGY <u>ISHSGSTS</u> YNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGT</u> TVTSS	SEQ ID NO: 366 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LAW YLQKPGQSPQLLIY <u>FASTR</u> DS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> GQGTKLEIK
hVH2- hVL1-30	SEQ ID NO: 367 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGY <u>SITSDY</u> AWNWRQPP GKGLEWIGY <u>ISHSGSTS</u> YNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGT</u> TVTSS	SEQ ID NO: 368 DIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LAW YQKPGKAPKLLIY <u>FASTR</u> DS SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATYFC <u>QQHYIIPFT</u> FGQGTKLEIK
hVH3- hVL2-30	SEQ ID NO: 367 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGY <u>SITSDY</u> AWNWRQPP GKGLEWIGY <u>ISHSGSTS</u> YNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGT</u> TVTSS	SEQ ID NO: 369 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LA WYQKPGQPPKLLIY <u>FASTR</u> DS DSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SSLQAEDLAVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> TFGQGTKLEIK
hVH3- hVL5-30	SEQ ID NO: 367 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGY <u>SITSDY</u> AWNWRQPP GKGLEWIGY <u>ISHSGSTS</u> YNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGT</u> TVTSS	SEQ ID NO: 366 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LAW YLQKPGQSPQLLIY <u>FASTR</u> DS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> GQGTKLEIK
hVH4- hVL2-30	SEQ ID NO: 370 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CAVY <u>GYSITSDY</u> AWNWRQP PGKGLEWIGY <u>ISHSGSTS</u> YNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGT</u> TVTSS	SEQ ID NO: 369 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LA WYQKPGQPPKLLIY <u>FASTR</u> DS DSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SSLQAEDLAVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> TFGQGTKLEIK
hVH4- hVL5-30	SEQ ID NO: 370 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CAVY <u>GYSITSDY</u> AWNWRQP PGKGLEWIGY <u>ISHSGSTS</u> YNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGT</u> TVTSS	SEQ ID NO: 366 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LAW YLQKPGQSPQLLIY <u>FASTR</u> DS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> GQGTKLEIK
30-C7-C11- D4_hVH1- hVL5_PTM	SEQ ID NO: 365 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGY <u>SITSDY</u> AWNWRQHP	SEQ ID NO: 371 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQ <u>SLLNSSTQKNY</u> LAW

	GKGLEWIGYISHSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGTTVTVSS</u>	YLQKPGQSPQLLIYFASTRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> GQGTKLEIK
30-C7-C11- D4_hVH2- hVL1_PTM	SEQ ID NO: 367 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGYSITSDYAWNWRIRPP GKGLEWIGYISHSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 372 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKSSQSLLOSSTQKNYLAW YQQKPGKAPKLLIYFASTRD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATYFC <u>QQHYIIPFT</u> FGQGTKLEIK
30-C7-C11- D4_hVH3- hVL2_PTM	SEQ ID NO: 367 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGYSITSDYAWNWRIRPP GKGLEWIGYISHSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 373 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLLOSSTQKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYFASTR DSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDLAVYFC <u>QQHYIIPF</u> <u>TFGQGTKLEIK</u>
30-C7-C11- D4_hVH3- hVL5_PTM	SEQ ID NO: 367 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGYSITSDYAWNWRIRPP GKGLEWIGYISHSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 371 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQSLLOSSTQKNYLAW YLQKPGQSPQLLIYFASTRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> GQGTKLEIK
30-C7-C11- D4_hVH4- hVL2_PTM	SEQ ID NO: 370 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CAVYGYISITSDYAWNWRIRP PGKGLEWIGYISHSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 373 DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLLOSSTQKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYFASTR DSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDLAVYFC <u>QQHYIIPF</u> <u>TFGQGTKLEIK</u>
30-C7-C11- D4_hVH4- hVL5_PTM	SEQ ID NO: 370 QVQLQESGPGLVKPSQTLST CAVYGYISITSDYAWNWRIRP PGKGLEWIGYISHSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC <u>CARSLGRRW</u> <u>YFDVWGQGTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 371 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQSLLOSSTQKNYLAW YLQKPGQSPQLLIYFASTRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFC <u>QQHYIIPFTF</u> GQGTKLEIK

В некоторых воплощениях гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, состоят по существу из всех последовательностей человека, за исключением последовательностей CDR, которые не являются человеческими. В некоторых воплощениях FR варибельной области и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу взяты из

последовательностей иммуноглобулина человека. Последовательности FR человека и последовательности константной области человека могут быть получены из различных генов иммуноглобулина человека, например, последовательности FR, полученные из одного антитела человека, и константная область из другого антитела человека. В некоторых воплощениях гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь HFR1-4 человека и/или легкую цепь LFR1-4.

В некоторых воплощениях FR-области, полученные от человека, могут содержать ту же аминокислотную последовательность, что и иммуноглобулин человека, из которого они получены. В некоторых воплощениях один или более аминокислотных остатков FR человека заменены соответствующими остатками исходного антитела, не являющегося антителом человека. В некоторых воплощениях может быть желательным сделать гуманизированное антитело или его фрагмент максимально приближенным к структуре исходного антитела, не являющегося антителом человека, чтобы оптимизировать характеристики связывания (например, повысить аффинность связывания). В некоторых воплощениях гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержит не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены аминокислотных остатков в каждой из последовательностей FR человека или не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены аминокислотных остатков во всех последовательностях FR переменного домена тяжелой или легкой цепи. В некоторых воплощениях такое изменение аминокислотного остатка может присутствовать только в FR-областях тяжелой цепи, только в FR-областях легкой цепи или в обеих цепях. В некоторых воплощениях одна или более аминокислот последовательностей FR человека мутированы случайным образом для увеличения аффинности связывания. В некоторых воплощениях одна или более аминокислот последовательностей FR человека обратно мутированы на соответствующую аминокислоту(ы) родительского антитела, не являющегося антителом человека, с целью повышения аффинности связывания.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их фрагменты, предложенные в настоящем документе, дополнительно содержат константную область иммуноглобулина. В некоторых воплощениях константная область иммуноглобулина содержит константную область тяжелой цепи и/или легкой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит области CH1, шарнир и/или CH2-CH3. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит область Fc. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит Cк или Cл.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, имеют константную область иммуноглобулина (Ig), возможно Ig человека, возможно IgG человека. В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, содержат константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

Изотипы IgG человека (подклассы зрелых антител класса G к гамма-глобулину; IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) проявляют различную способность рекрутировать эффекторные функции. Например, ADCC стимулируют IgG1 и IgG3, ADCP стимулируют IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а CDC стимулируют IgG1 и IgG3. Специфическое для изотипа участие таких эффекторных функций основано на селективности в отношении Fc-рецепторов на различных иммунных клетках и способности связывать C1q, тем самым активируя сборку мембраноатакующего комплекса (MAC). Среди различных изотипов относительная аффинность к рецепторам Fc γ , которые включают Fc γ RI, Fc γ RIIa/b/c и Fc γ RIIIa/b, является высоким для IgG1 и IgG3. Однако аффинность Fc γ к IgG2 значительно ниже, за исключением полиморфизма Fc γ RIIa H131, а IgG4 имеет только измеримую аффинность к Fc γ RI.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, содержат константную область изотипа IgG1 человека, которая может индуцировать ADCC, CDC или ADCP, или константную область изотипа IgG4 или IgG2, которая имеет сниженную или истощенную эффекторную функцию. Эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, могут приводить к цитотоксичности в отношении клеток, экспрессирующих CD276. Эффекторные функции можно оценить с помощью различных анализов, таких как анализ связывания Fc-рецептора, анализ связывания C1q и анализ лизиса клеток.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, содержат константную область изотипа IgG2 мыши, которая может индуцировать ADCC, CDC или ADCP.

Варианты антител

Настоящее изобретение также охватывает различные варианты антител и/или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе. В некоторых воплощениях настоящее изобретение охватывает различные типы вариантов типового антитела, предложенного в настоящем документе, т.е. антитело с последовательностью CDR3 тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43,

51, 59, 67, 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259, 267, 275, 283, 291, 299, 307, 315, 323, 331, 339 или 375.

В некоторых воплощениях варианты антитела содержат одну или более модификаций или замен в одной или более последовательностях CDR, представленных в Таблице 1, одной или более последовательностях FR, последовательностях вариабельной области тяжелой или легкой цепи, представленных в Таблице 2, и/или константной области (например, области Fc). Такие варианты сохраняют специфическую аффинность связывания с CD276 своих родительских антител, но обладают одним или более желательными свойствами, придаваемыми модификацией (-ми) или заменой (-ми). Например, варианты антител могут иметь повышенную аффинность связывания антигена, улучшенный характер гликозилирования, сниженный риск гликозилирования, пониженное дезаминирование, сниженную или истощенную эффекторную функцию(и), улучшенное связывание с рецептором FcRn, увеличенный фармакокинетический период полувыведения, чувствительность к pH и /или совместимость с конъюгацией (например, один или более введенных остатков цистеина).

Последовательность исходного антитела может быть подвергнута скринингу для выявления подходящих или предпочтительных остатков, подлежащих модификации или замене, с использованием способов, известных в данной области техники, например, «мутагенез со сканированием аланина» (см., например, Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085). Коротко говоря, целевые остатки (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) могут быть идентифицированы и заменены нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), и модифицированные антитела вырабатываются и подвергаются скринингу на предмет интересующего свойства. Если замена в определенном месте аминокислоты демонстрирует интересующее функциональное изменение, то это положение можно идентифицировать как потенциальный остаток для модификации или замены. Потенциальные остатки можно дополнительно оценить путем замены остатком другого типа (например, остатком цистеина, положительно заряженным остатком и т. д.).

Вариант аффинности

Вариант аффинности может содержать модификации или замены в одной или более последовательностях CDR, представленных в таблице 1, одной или более последовательностях FR или последовательностях вариабельной области тяжелой или легкой цепи, представленных в таблице 2, 3 или 4. Варианты аффинности сохраняют

аффинность специфического связывания с CD276 родительского антитела или даже имеют повышенную аффинность специфического связывания CD276 по сравнению с родительским антителом. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна (или все) замена(ы) в последовательностях CDR, последовательностях FR или последовательностях переменной области включает консервативную замену.

Специалист в данной области техники поймет, что в последовательностях CDR, представленных в таблице 1, и последовательностях FR один или более аминокислотных остатков могут быть заменены, однако полученное антитело или антигенсвязывающий фрагмент все еще сохраняют аффинность связывания с CD276 или даже имеют улучшенную аффинность связывания. Для достижения этой цели можно использовать различные способы, известные в данной области техники. Например, библиотека вариантов антител (таких как варианты Fab или scFv) может быть создана и экспрессирована с помощью технологии фагового дисплея, а затем проверена на аффинность связывания с CD276 человека. В качестве другого примера можно использовать компьютерное программное обеспечение для виртуальной имитации связывания антител с CD276 человека и идентификации аминокислотных остатков на антителах, которые образуют интерфейс связывания. Такие остатки можно либо исключить при замене, чтобы предотвратить снижение аффинности связывания, либо нацелить на замену, чтобы обеспечить более сильное связывание.

В некоторых воплощениях гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, содержат одну или более замен аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR и/или одной или более последовательностях FR. В некоторых воплощениях вариант аффинности содержит в общей сложности не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены в последовательностях CDR и/или последовательностях FR.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты содержат 1, 2 или 3 последовательности CDR, имеющие по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательностей с последовательностями, перечисленными в таблице 1, и в то же время сохраняют аффинность связывания с CD276 на уровне, аналогичном или даже выше, чем у родительского антитела.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более последовательностей переменной области, содержащих по

меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательностей с последовательностями, перечисленными в таблице 1, и в то же время сохраняют аффинность связывания с CD276 на уровне, аналогичном или даже выше, чем у родительского антитела. В некоторых воплощениях в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены или удалены в последовательности, выбранной из последовательности (или последовательностей), которые перечислены в таблице 1. В некоторых воплощениях замены, вставки или удаления происходят в областях за пределами CDR (т. е. в FR).

Вариант гликозилирования

Антитела к CD276 и антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, также включают вариант гликозилирования, который можно получить либо для увеличения, либо для уменьшения степени гликозилирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать один или более аминокислотных остатков с боковой цепью, к которой может быть присоединен углеводный фрагмент (например, олигосахаридная структура). Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина, например, остатка аспарагина в трипептидной последовательности, такой как аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацеилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикампоаминокислоте, чаще всего к серину или треонину. Удаление нативного сайта гликозилирования может быть удобно осуществлено, например, путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы одна из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования) или остатки серина или треонина (для сайтов O-связанного гликозилирования), присутствующие в последовательности, заменяются. Новый сайт гликозилирования может быть создан аналогичным способом путем введения такой трипептидной последовательности или остатка серина или треонина.

Вариант с цистеиновой модификацией

Антитела к CD276 и антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, также охватывают вариант с цистеиновой модификацией, который содержит один или более введенных свободных аминокислотных остатков цистеина.

Свободный остаток цистеина представляет собой остаток, который не является частью дисульфидного мостика. Вариант с цистеиновой модификацией является подходящим для конъюгации, например, с цитотоксическим и/или визуализирующим соединением, меткой или радиоизотопом, среди прочего, в месте модифицированного цистеина, например, через малеимид или галогенацетил. Способы конструирования антител или антигенсвязывающих фрагментов для введения свободных остатков цистеина известны в данной области техники, см., например, WO2006/034488.

Вариант Fc

Антитела к CD276 и антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, также включают вариант Fc, который содержит одну или более модификаций или замен аминокислотных остатков в его Fc-области и/или шарнирной области.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 или антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более аминокислотных замен, которые улучшают зависимое от pH связывание с неонатальным рецептором Fc (FcRn). Такой вариант может иметь увеличенный фармакокинетический период полураспада, поскольку он связывается с FcRn при кислом pH, что позволяет ему избежать деградации в лизосоме, а затем транслоцироваться и высвободиться из клетки. Способы конструирования антитела и его антигенсвязывающего фрагмента для улучшения аффинности связывания с FcRn хорошо известны в данной области техники, см., например, Vaughn, D. et al, *Structure*, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al, *Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK*, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al, *Cancer Research*, 70: 3269-3277 (2010); и Hinton, P. et al, *J. Immunology*, 176:346-356 (2006).

В некоторых воплощениях антитела к CD276 или антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более аминокислотных замен, которые изменяют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Определенные аминокислотные остатки в домене CH2 области Fc могут быть заменены для обеспечения повышенной активности ADCC. Альтернативно или дополнительно, углеводные структуры антитела могут быть изменены для усиления активности ADCC. Способы изменения активности ADCC с помощью инженерии антител были описаны в данной области техники, см., например, Shields RL. et al., *J Biol Chem*. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., *J Immunol*. 2000.164(8):4178-84; Steurer W. et al., *J Immunol*. 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. et al., *J Immunol*. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., *PNAS*, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 3009-3018; Richards JO., et al., *Mol Cancer Ther.* 2008, 7(8): 2517-27;

Shields R. L. et al, J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al, J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 или антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более аминокислотных замен, которые изменяют комплементзависимую цитотоксичность (CDC), например, путем улучшения или уменьшения связывания C1q и/или CDC (см., например, WO 99/51642, Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988), патент США № 5,648,260, патент США № 5,624,821); и WO94/29351, касающийся других примеров вариантов Fc-области.

В некоторых воплощениях антитела к CD276 или их антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более аминокислотных замен в поверхности области Fc для облегчения и/или стимуляции гетеродимеризации. Эти модификации включают введение выступа в первый полипептид Fc и полости во второй полипептид Fc, причем выступ может быть расположен в полости так, чтобы способствовать взаимодействию первого и второго полипептидов Fc с образованием гетеродимера или комплекса. Способы получения антител с этими модификациями известны в данной области техники, например, как описано в патенте США № 5,731,168.

Антигенсвязывающие фрагменты

В настоящем документе также предложены антигенсвязывающие фрагменты антитела к CD276. В данной области техники известны различные типы антигенсвязывающих фрагментов, которые могут быть разработаны на основе антител к CD276, предложенных в настоящем документе, включая, например, типичные антитела, чьи последовательности CDR и FR показаны в Таблице 1, и их различные варианты (такие как варианты аффинности, варианты гликозилирования, варианты Fc, варианты с цистеиновой модификацией и так далее).

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD276, предложенный в настоящем документе, представляет собой камелизированное однодоменное антитело, одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), dsFv, (dsFv)₂, фрагмент Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, нанотело, доменное антитело, однодоменное антитело или двухвалентное доменное антитело.

Для получения таких антигенсвязывающих фрагментов можно использовать различные способы. Иллюстративные способы включают ферментативное расщепление интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)), рекомбинантную

экспрессию клетками-хозяевами, такими как *E. Coli* (например, для фрагментов антител Fab, Fv и ScFv), скрининг из библиотеки фагового дисплея, как обсуждалось выше (например, для ScFv), и химическое соединение двух фрагментов Fab'-SH с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Квалифицированному практикующему специалисту в данной области техники будут очевидны и другие методы получения фрагментов антител.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv. Получение scFv описано, например, в WO 93/16185; патентах США №№ 5,571,894 и 5,587,458. scFv может быть слит с эффекторным белком либо по амино-, либо по карбоксиконцу с получением слитого белка (см., например, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck).

Конъюгаты

В некоторых воплощениях антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты связаны с одним или более конъюгатами, возможно где конъюгат ковалентно присоединен либо непосредственно, либо через линкер. Конъюгат представляет собой небелковую часть, которая может быть присоединена к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Предполагается, что с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, представленными в настоящем документе, могут быть связаны различные конъюгаты (см., например, "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Эти конъюгаты могут быть связаны с антителами или антигенсвязывающими фрагментами посредством ковалентного связывания, аффинного связывания, интеркаляции, координатного связывания, комплексообразования, ассоциации, смешивания или добавления, а также другими способами. В некоторых воплощениях конъюгат содержит модифицирующий клиренс агент, химиотерапевтический агент, токсин, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку, фермент-субстратную метку, ДНК-алкилирующие агенты, ингибитор топоизомеразы, тубулин-связывающие агенты или другие противораковые лекарственные средства.

В некоторых воплощениях антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть сконструированы так, чтобы они содержали специфические сайты вне эпитоп-связывающей части, которые можно использовать для связывания с одним или более конъюгатами. Например, такой сайт может включать один

или более реакционноспособных аминокислотных остатков, таких как, например, остатки цистеина или гистидина, для облегчения ковалентного связывания с конъюгатом.

В некоторых воплощениях антитела могут быть связаны с конъюгатом опосредованно или через другой конъюгат. Например, антитело или антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с биотином, а затем опосредованно конъюгированы со вторым конъюгатом, который конъюгирован с авидином. Конъюгат может представлять собой токсин (например, химиотерапевтический агент), детектируемую метку (например, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку или фермент-субстратную метку).

«Токсин» может представлять собой любой агент, который вреден для клеток или может повредить или убить клетки. Примеры токсинов включают, без ограничения, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин и его аналоги, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, тиопепа хлорамбуцил, мелфалан), кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU)), циклотофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) (цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)), а также антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Примеры обнаруживаемых меток могут включать флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, дансил, фикоэритрин или тexasский красный), фермент-субстратные метки (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, люциферазы, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы или β -D-галактозидаза), радиоизотопы (например, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi и ^{32}P , другие лантаноиды, люминесцентные метки), хромофорный фрагмент, дигоксигенин, биотин/авидин, молекулу ДНК или золото для обнаружения.

В некоторых воплощениях конъюгат может представлять собой фрагмент, модифицирующий фармакокинетику, который помогает увеличить период полувыведения

антитела. Иллюстративный пример включает водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля и тому подобное. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и если присоединено более одного полимера, это могут быть одинаковые или разные молекулы.

В некоторых воплощениях конъюгат может представлять собой очищающую часть, такую как магнитные шарики.

В некоторых воплощениях антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, применяют в качестве основы для конъюгата.

Полинуклеотиды и рекомбинантные способы

В настоящем изобретении предложены выделенные полинуклеотиды, которые кодируют антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты. ДНК, кодирующую моноклональное антитело, легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Кодирующая ДНК также может быть получена синтетическими методами.

Выделенный полинуклеотид, который кодирует антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, можно вставить в вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии, используя рекомбинантные методы, известные в данной области техники. Доступно множество векторов. Компоненты вектора обычно включают, помимо прочего, одно или более из следующих элементов: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α) и последовательность терминации транскрипции.

В некоторых воплощениях векторная система включает системы млекопитающих, бактерий, дрожжей и т.д. и содержит плазмиды, такие как, но не ограничиваясь ими, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMD18-T, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 и так далее, и другие лабораторные и коммерчески доступные векторы. Подходящие векторы могут включать плазмиды или вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы).

Векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить в клетку-хозяина для клонирования или экспрессии гена. Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах по настоящему изобретению являются прокариотные, дрожжевые или высшие эукариотические клетки, описанные выше. Подходящие для этой цели прокариоты включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E.coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также бациллы, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

Помимо прокариотов, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела к CD276. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов обычно доступны и полезны в данном случае, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева из числа *Kluveromyces*, такие как, например, *K.lactis*, *K.fragilis* (ATCC 12424), *K.bulgaricus* (ATCC 16045), *K.wickeramii* (ATCC 24178), *K.waltii* (ATCC 56500), *K.drosophilum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia Pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyrocladium* и хозяева из числа *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител или фрагмента антигена, предложенные в настоящем документе, получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты, а также соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых от таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Различные вирусные штаммы для трансфекции общедоступны, например, вариант L-1 *Autographa Californica NPV* и штамм Bm-5 *Bombyx mori NPV*, и такие вирусы можно использовать в качестве вируса согласно настоящему изобретению, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera*

frugiperda. В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака.

Однако наибольший интерес демонстрируют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало рутинной процедурой. Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (ВНК, ATCC CCL 10); Клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клетки (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MPK 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для выработки антител к CD276 и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. В другом воплощении антитело можно получить путем гомологичной рекомбинации, известной в данной области техники.

Клетки-хозяева, используемые для выработки антител или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная необходимая среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM, Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любой из носителей, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США № 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 или 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; или перевыпущенном патенте США 30,985 можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. При необходимости любая из этих сред может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста

(такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (например, аденозином и тимидином), антибиотиками (например, лекарственным средством GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для обычного специалиста в данной области техники.

При использовании рекомбинантных методик антитело может быть получено внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировано в среду. Если антитело получают внутриклеточно, на первом этапе дебрис в виде частиц (клеток-хозяев или лизированных фрагментов) удаляют, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описывают процедуру выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E.coli*. Вкратце, клеточную пасту оттаивают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 минут. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Если антитело секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из предшествующих стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста посторонних примесей.

Антитела к CD276 и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из клеток, могут быть очищены с использованием, например, хроматографии на гидроксилпатите, гель-электрофореза, диализа, ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, осаждения сульфатом аммония, высаливания и аффинной хроматографии, причем предпочтительным методом очистки является аффинная хроматография.

В некоторых воплощениях белок А, иммобилизованный на твердой фазе, используют для иммуноаффинной очистки антитела и его антигенсвязывающего

фрагмента. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях гамма1, гамма2 или гамма4 человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изотипов мыши и для гамма3 человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, позволяют добиться более высоких скоростей потока и более короткого времени обработки, чем те, которые можно достичь с помощью агарозы. Если антитело содержит домен СН3, Bakerbond ABX.TM. смола (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) пригодна для очистки. Другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от антитела, которое необходимо восстановить.

После любого этапа (-ов) предварительной очистки смесь, содержащая интересующее антитело и примеси, может быть подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким рН с использованием элюирующего буфера при рН приблизительно 2,5-4,5, предпочтительно выполняемой при низких концентрациях соли (например, приблизительно от 0 до 0,25 М соли).

CAR

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен TCR, где указанный антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD276 и содержит антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv. В некоторых воплощениях CAR, предложенный в настоящем документе, является биспецифичным. CAR способен дополнительно специфически связываться со вторым антигеном, отличным от CD276, или вторым эпитопом CD276. В некоторых воплощениях второй антиген представляет собой опухолевый антиген, опухолеассоциированный

антиген или мишень, связанную с иммунитетом, как указано выше. Сигнальный домен TCR может быть выбран из группы, состоящей из: последовательности внутриклеточных сигнальных областей CD3 ζ , Fc γ RI, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLR или их комбинации. Трансмембранная область может содержать трансмембранную область CD3, CD4, CD8 или CD28. В некоторых воплощениях второй антиген представляет собой иммуноподавляющую молекулу, такую как PD-L1, SIRP α , CD47 или B2M.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, упомянутый выше, а также клетку или вектор, содержащие такую последовательность нуклеиновой кислоты, или клетку, генетически модифицированную для экспрессии CAR, предложенную в настоящем документе. Клетка может представлять собой иммунную клетку, возможно где иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, НК-клетку, моноцит, макрофаг или НКТ-лимфоцит.

Фармацевтическая композиция

В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела к CD276 или их антигенсвязывающие фрагменты и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

Фармацевтически приемлемые носители для применения в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, могут включать, например, фармацевтически приемлемые жидкие, гелеобразные или твердые носители, водные носители, неводные носители, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, анестетики, суспендирующие/диспергирующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты, разбавители, адьюванты, эксципиенты или нетоксичные вспомогательные вещества, другие компоненты, известные в данной области техники, или различные их комбинации.

Подходящие компоненты могут включать, например, антиоксиданты, наполнители, связующие вещества, разрыхлители, буферы, консерванты, смазывающие вещества, ароматизаторы, загустители, красители, эмульгаторы или стабилизаторы, такие как сахара и циклодекстрины. Подходящие антиоксиданты могут включать, например, метионин, аскорбиновую кислоту, EDTA, тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, тиоглицерин, тиогликолевую кислоту, тиосорбит, бутилированный гидрокситолуол, бутилированный гидрокситолуол и/или пропилгаллат. Как описано в настоящем документе, включение одного или более антиоксидантов, таких как метионин,

в композицию, содержащую антитело или антигенсвязывающий фрагмент и конъюгаты, предложенные в настоящем документе, снижает окисление антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Такое снижение окисления предотвращает или уменьшает потерю аффинности связывания, тем самым улучшая стабильность антител и увеличивая срок их хранения. Таким образом, в некоторых воплощениях предложены композиции, которые содержат одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе, и один или более антиоксидантов, таких как метионин. Кроме того, предложены способы предотвращения окисления, продления срока хранения и/или улучшения эффективности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, путем смешивания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с одним или более антиоксидантами, такими как метионин.

В качестве дополнительной иллюстрации, фармацевтически приемлемые носители могут включать, например, водные носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильная вода для инъекций или раствор декстрозы и лактатный раствор Рингера для инъекций, неводные носители, такие как нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло или арахисовое масло, противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, изотонические агенты, такие как хлорид натрия или декстроза, буферы, такие как фосфатный или цитратный буферы, антиоксиданты, такие как бисульфат натрия, местные анестетики, такие как прокаина гидрохлорид, суспендирующие и диспергирующие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидон, эмульгирующие агенты, такие как полисорбат 80 (TWEEN-80), изолирующие или хелатирующие агенты, такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) или EGTA (этиленгликольтетрауксусная кислота), этиловый спирт, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, гидроксид натрия, соляная кислота, лимонная кислота или молочная кислота. Антимикробные агенты, используемые в качестве носителей, могут быть добавлены к фармацевтическим композициям в многодозовых контейнерах, которые включают фенолы или крезолы, ртуть, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловые и пропиловые эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Подходящие наполнители могут включать, например, воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин или этанол. Подходящие

нетоксичные вспомогательные вещества могут включать, например, смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для pH, стабилизаторы, усилители растворимости или такие агенты, как ацетат натрия, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина или циклодекстрин.

Фармацевтические композиции могут представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, пиллюлю, капсулу, таблетку, состав с пролонгированным высвобождением или порошок. Составы для перорального применения могут включать стандартные носители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, поливинилпирролидона, сахарина натрия, целлюлозы, карбоната магния и т. д.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции приготовлены в виде композиции для инъекций. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть получены в любой традиционной форме, такой как, например, жидкий раствор, суспензия, эмульсия или твердые формы, подходящие для получения жидкого раствора, суспензии или эмульсии. Препараты для инъекций могут включать стерильные и/или апирогенные растворы, готовые для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к смешиванию с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к смешиванию с носителем непосредственно перед использованием, а также стерильные и/или апирогенные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

В некоторых воплощениях парентеральные препараты со стандартной дозой упакованы в ампулы, флаконы или шприцы с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными и апирогенными, как известно и практикуется в данной области техники.

В некоторых воплощениях стерильный лиофилизированный порошок получают путем растворения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать эксципиент, улучшающий стабильность, или другие фармакологические компоненты порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Эксципиенты, которые могут быть применены, включают, помимо прочего, воду, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другие подходящие агенты. Растворитель может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или

другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном воплощении приблизительно при нейтральном pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, позволяет получить желаемый состав. В одном воплощении полученный раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон может содержать одну дозу или более доз антитела к CD276 или его антигенсвязывающему фрагменту или его композиции. Допустимо переполнение флаконов небольшим количеством препарата, превышающим необходимое для дозы или набора доз (например, приблизительно 10%), чтобы облегчить точный отбор проб и точное дозирование. Лиофилизированный порошок можно хранить при соответствующих условиях, например, при температуре приблизительно от 4°C до комнатной температуры.

Восстановление лиофилизированного порошка водой для инъекций позволяет получить состав для применения при парентеральном введении. В одном воплощении для восстановления к лиофилизированному порошку добавляют стерильную и/или непиротную воду или другой подходящий жидкий носитель. Точное количество зависит от выбранной терапии и может быть определено эмпирически.

Способы применения

В настоящем изобретении также предложены терапевтические способы, включающие: введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту с обеспечением тем самым лечения или предупреждения связанного с CD276 заболевания или состояния. В некоторых воплощениях связанное с CD276 заболевание или состояние, представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, заболевание адаптивного иммунитета или инфекционное заболевание.

Примеры рака включают, но не ограничиваясь ими, немелкоклеточный рак легкого (плоскоклеточный/неплоскоклеточный), мелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточный рак, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак яичников, рак молочной железы (включая базальную карциному молочной железы, протоковую карциному и дольковый рак молочной железы), рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак пищевода, мезотелиому, меланому, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, саркому, рак предстательной железы, глиобластому, рак шейки матки, карциному тимуса, меланому, миелому, грибковидные микозы, рак Меркеля, гепатоцеллюлярную карциному

(НСС), фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, лимфоидные злокачественные новообразования, базальноклеточный рак, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярный рак щитовидной железы, папиллярный рак щитовидной железы, феохромоцитому, карциному слюнных желез, папиллярный рак, папиллярную аденокарциному, медуллярный рак, бронхогенный рак, гепатому, рак желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, классическую лимфому Ходжкина (CHL), первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, Т-клеточную/богатую гистиоцитами В-клеточную лимфому, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, истинную полицитемию, опухоли тучных клеток, EBV-положительный и -отрицательный PTLD и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), плазмобластную лимфому, экстранодальную НК/Т-клеточную лимфому, карциному носоглотки, HHV8-ассоциированную первичную выпотную лимфому, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию, первичную лимфому ЦНС, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинелому, гемангиобластому, акустическую неврому, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому и ретинобластому.

В некоторых воплощениях рак представляет собой опухоль надпочечника, связанный со СПИДом рак, альвеолярную саркому мягких частей, астроцитарную опухоль, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, рак молочной железы, опухоли каротидного тела, рак шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, доброкачественную фиброзную гистиоцитому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную миксоидную хондросаркому, несовершенный фиброгенез кости, фиброзную дисплазию кости, рак желчного пузыря или желчных протоков, рак желудка, гестационную трофобластическую болезнь, герминогенную опухоль, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, опухоль островковых клеток,

саркому Капоши, рак почки, лейкоз, липому/доброкачественную липоматозную опухоль, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени, лимфому, рак легких, медуллобластому, меланому, менингиому, множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярный рак щитовидной железы, опухоль паращитовидной железы, детский рак, опухоль оболочек периферических нервов, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, меланому задней увеальной оболочки, редкое гематологическое заболевание, метастатический рак почки, рабдоидную опухоль, рабдомисаркому, саркому, рак кожи, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, рак яичек, карциному тимуса, тимому, метастатический рак щитовидной железы и рак матки. В некоторых воплощениях рак является химиорезистентным.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой гематологический рак, выбранный из В-клеточных лимфом. Примеры В-клеточных лимфом включают, но не ограничиваются ими, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), множественную миелому (MM), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому маргинальной зоны (MZL), мантийноклеточную лимфому (MCL), синдром Рихтера, лимфому Беркитта или фолликулярную лимфому.

Аутоиммунные заболевания включают, не ограничиваясь ими, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД, который представляет собой вирусное заболевание с аутоиммунным компонентом), очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТР), болезнь Бехчета, кардиомиопатию, глютенный спру-гепетиформный дерматит; синдром иммунной дисфункции хронической усталости (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD), рубцовый пемфигоид, болезнь холодных агглютининов, синдром гребня, болезнь Крона, болезнь Дегоса, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, эссенциальную смешанную криоглобулинемию,

фибромиалгию-фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический фиброз легких, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA-нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет, ювенильный хронический артрит (болезнь Стилла), ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, миастению, пернициозную анемию, узелковый полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз печени, псориаз, псориатический артрит, явления Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию (прогрессирующий системный склероз (PSS), также известный как системный склероз (SS)), синдром Шегрена, синдром ригидного человека, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

Воспалительные заболевания включают, например, хронические и острые воспалительные расстройства. Примеры воспалительных заболеваний включают болезнь Альцгеймера, астму, atopическую аллергию, аллергию, атеросклероз, бронхиальную астму, экзему, гломерулонефрит, реакцию «трансплантат против хозяина», гемолитические анемии, остеоартрит, сепсис, инсульт, трансплантацию тканей и органов, васкулит, диабетическую ретинопатию и повреждение легких, вызванное аппаратом искусственной вентиляции легких. В некоторых воплощениях связанные с CD276 состояния представляют собой воспалительные заболевания, такие как системная красная волчанка (SLE), воспаление слизистой оболочки кишечника, истощение, связанное с колитом, рассеянный склероз, вирусные инфекции, ревматоидный артрит, остеоартрит, болезнь Кона и воспалительные заболевания кишечника, псориаз, системная склеродермия, аутоиммунный диабет и тому подобное.

Инфекционное заболевание включает, но не ограничиваясь ими, грибковую инфекцию, паразитарную/протозойную инфекцию или хроническую вирусную инфекцию, например, малярию, кокцидиомикоз иммит, гистоплазмоз, онихомироз, аспергиллез, бластомикоз, белый кандидоз, паракокцидиомикоз, микроспоридиоз, акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидиаз, байлисаскаридоз, болезнь Шагаса, клонорхоз, кохлиомию, криптоспоридиоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, слоновость, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсиоз, филяриоз, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, изоспороз, лихорадку Катаяма, лейшманиоз, болезнь Лайма, метагонимоз,

миаз, онхоцеркоз, педикулез, чесотку, шистосомоз, сонную болезнь, стронгилоидоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез, трихоцеркоз, трипаносомоз, гельминтозы, инфекцию гепатита В (HBV), гепатит С (HCV), вирус герпеса, вирус Эпштейна-Барра, ВИЧ, цитомегаловирус, вирус простого герпеса типа I, вирус простого герпеса типа II, вирус папилломы человека, аденовирус, вирус иммунодефицита человека I, вирус иммунодефицита человека II, эпидемии вируса герпеса, связанные с саркомой Капоши-Веста, вирус тонкого кольца (Торкетеновирус), Т-лимфотрофный вирус человека I, Т-лимфотрофный вирус человека II, опоясывающий лишай, вирус JC или вирус ВК.

В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека.

В другом аспекте предложены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, для которого модулирование активности CD276 оказывает положительное действие, включающие введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. Термин «заболевание или состояние», используемый в настоящем документе, может использоваться взаимозаменяемо с термином «связанное с CD276 заболевание или состояние».

Терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, будет зависеть от различных факторов, известных в данной области техники, таких как, например, масса тела, возраст, история болезни, применяемые в настоящее время лекарства, состояние здоровья субъекта и вероятность перекрестных реакций, аллергия, чувствительность и неблагоприятные побочные эффекты, а также путь введения и степень развития заболевания. Дозировки могут быть пропорционально уменьшены или увеличены специалистом в данной области техники (например, врачом или ветеринаром), в зависимости от этих и других обстоятельств или требований.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, можно вводить в терапевтически эффективной дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг (например, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,5 мг /кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 45 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 55 мг/кг,

приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 65 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 75 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 85 мг/кг, приблизительно 90 мг/кг, приблизительно 95 мг/кг или приблизительно 100 мг/кг). В некоторых из этих воплощений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 50 мг/кг или менее, а в некоторых из этих воплощений доза составляет 10 мг/кг или менее, 5 мг/кг или менее, 3 мг/кг или менее, 1 мг/кг или менее, 0,5 мг/кг или менее или 0,1 мг/кг или менее. В некоторых воплощениях доза для введения может меняться в течение курса лечения. Например, в некоторых воплощениях начальная доза для введения может быть выше, чем дозы для последующего введения. В некоторых воплощениях доза для введения может варьироваться в течение курса лечения в зависимости от реакции субъекта.

Режимы введения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить разовую дозу или можно вводить несколько разделенных доз с течением времени.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить любым путем, известным в данной области техники, таким как, например, парентеральный (например, подкожный, внутрибрюшинный, внутривенный, включая внутривенную инфузию, внутримышечную или внутрикожную инъекцию) или непарентеральный (например, пероральный, интраназальный, внутриглазной, сублингвальный, ректальный или местный) пути.

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или агентами. В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить отдельно или в комбинации со вторым терапевтическим агентом. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом, например химиотерапевтическим агентом или противораковым лекарственным средством. В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации с антагонистом одной или более иммуноподавляющих молекул, например, CD24, CD47, SIRP α , PD-L1 или субъединицы бета-2 микроглобулина главного комплекса гистосовместимости класса I (B2M). Термин «антагонист», используемый в настоящем документе, может относиться к любой малой

молекуле, малой или микроРНК или антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют или ингибируют связывание CD24, CD47, SIRP α , PD-L1 или B2M с их соответствующими связывающими партнерами, чтобы предотвратить возникновение иммуноподавляющих сигналов. В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с антагонистом PD-L1, таким как антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Термин «антитело к PD-L1» может относиться к любому известному антителу к PD-L1 или его антигенсвязывающему фрагменту, включая, помимо прочего, YN035, описанное в WO2019196309A1, и MPDL3280A, описанное в WO2010077634A1.

В некоторых из этих воплощений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, которое вводят в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, можно вводить одновременно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, и в некоторых из этих воплощений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный терапевтический агент (-ы) можно вводить как часть одной и той же фармацевтической композиции. Однако антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводимые «в комбинации» с другим терапевтическим агентом, не обязательно следует вводить одновременно с агентом или в той же композиции, что и агент. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводимые до или после другого агента, считаются вводимым «в комбинации» с этим агентом, при использовании этой фразы в настоящем документе, даже если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второй агент вводятся разными путями. Там, где это возможно, дополнительные терапевтические агенты, вводимые в комбинации с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, описанные в настоящем документе, вводят в соответствии со схемой, указанной в информационном листке дополнительного терапевтического агента, или в соответствии со Справочником врачей 2003 года (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) или протоколами, хорошо известными в данной области техники.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены способы детектирования наличия или количества CD276 в образце, включающие приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и определение наличия или количества CD276 в образце.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены способы диагностики связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта, включающие: а) получение образца от субъекта; б) приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе; в) определение наличия или количества CD276 в образце и г) соотнесение наличия CD276 с заболеванием или состоянием, связанным с CD276, у субъекта.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения также предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта, в изготовлении диагностического реагента для диагностика заболевания или состояния, связанного с CD276.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен способ модулирования активности CD276 в CD276-экспрессирующей клетке, включающий воздействие на CD276-экспрессирующую клетку антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенными в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен способ детектирования наличия или количества CD276 в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе, и определение наличия или количества CD276 в образце.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен способ диагностики связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта, включающий: а) получение образца от субъекта; б) приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе; в) определение наличия или количества CD276 в образце и г) соотнесение наличия или количества CD276 с наличием или статусом связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта. Лекарственное средство может дополнительно содержать второй терапевтический агент, например, антагонист PD-L1, возможно где антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем документе, в изготовлении диагностического реагента для диагностики заболевания или состояния, связанного с CD276.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, полезный для обнаружения CD276, возможно рекомбинантного CD276, CD276, экспрессирующегося на поверхности клетки, или CD276-экспрессирующих клеток. Термин «рекомбинантный», используемый в настоящем документе, относится к искусственному манипулированию одной или более биологическими молекулами, такими как полинуклеотидные или полипептидные молекулы, с применением одного или более методов молекулярной биологии, чтобы превратить такую биологическую молекулу (-ы) в нечто отличающееся от ее естественного состояния.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен способ стимулирования опосредованного Т-клетками иммунного ответа на CD276-экспрессирующую клетку или ткань у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества генетически модифицированной клетки для экспрессии CAR, содержащей антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен TCR, причем антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD276 и содержит антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv. В некоторых воплощениях CAR, предложенный в настоящем документе, является биспецифичным. CAR способен дополнительно специфически связываться со вторым антигеном, отличным от CD276, или вторым эпитопом CD276. В некоторых воплощениях второй антиген представляет собой опухолевый антиген, как указано выше. Сигнальный домен TCR может быть выбран из группы, состоящей из: последовательности внутриклеточной сигнальной области CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLR или их комбинации. Трансмембранная область может содержать трансмембранную область CD3, CD4, CD8 или CD28. В некоторых воплощениях второй антиген представляет собой иммуноподавляющую молекулу, например PD-L1, SIRP α , CD24, CD47 или B2M.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен способ лечения млекопитающего, имеющего связанное с CD276 заболевание или состояние, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, которая генетически модифицирована для экспрессии CAR, предложенного в настоящем документе (например, аутологичной Т-клетки), тем самым осуществляя лечение млекопитающего. В некоторых воплощениях связанное с CD276 заболевание или состояние, представляет собой рак. В некоторых воплощениях млекопитающее представляет собой человека.

Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения и не должны интерпретироваться как ограничивающие объем изобретения. Все конкретные композиции, материалы и способы, описанные ниже, полностью или частично, входят в объем настоящего изобретения. Эти конкретные композиции, материалы и способы не предназначены для ограничения изобретения, а просто иллюстрируют конкретные воплощения, входящие в объем изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные композиции, материалы и способы, не используя изобретательский потенциал и не выходя за рамки изобретения. Понятно, что в описанные в настоящем документе процедуры можно внести множество изменений, оставаясь при этом в пределах настоящего изобретения. Изобретатели намерены включать такие изменения в объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Технология получения гибридомы

1. Методы

1.1 Иммунизация и определение титра сыворотки

1.1.1 Иммуноген и стратегии иммунизации

Иммунизация клетками

В качестве иммуногена использовали клетки CHO-S, характеризующиеся сверхэкспрессией белка CD276 человека (UniProt ID: Q5ZPR3, то есть CHO-S-hCD276) или белка CD276 мыши (UniProt ID: Q8VE98, то есть CHO-S-mCD276).

Иммунизация белком

Рекомбинантный белок CD276 человека (SEQ ID NO: 346): рекомбинантный белок CD276 человека получали путем расщепления белка CD276 человека энтерокиназой, и внеклеточный домен CD276 человека подвергали слиянию с 6xHis-меткой и DDDDK (SEQ ID NO: 345).

Рекомбинантный белок CD276 человека (SEQ ID NO: 346):

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQ
DQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYQGYPEAEVFWQDGGQGVPLTGNVTTSQMANEQG
LFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVAL
VGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLL
AQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGD
TVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGT
YSCLVRNPVLQQDAHSGSVTITGQPMTFPPEANHHHHHDDDDK.

Мышей Balb/c и SJL иммунизировали, как указано ниже. После первичной иммунизации проводили несколько бустерных иммунизаций до достижения у животных достаточных титров антисыворотки, подходящих для получения гибридомы.

Группа	Иммуноген	Путь	Животное/линия	Размер группы	Доза
1	Клетки CHO-S-hCD276	Внутрибрюшинная инъекция (в/б)	Balb/c	5	5×10^6
2	Рекомбинантный белок CD276 человека	подкожная инъекция (п/к)	Balb/c	5	100 мкг
3	CHO-S-mCD276	в/б	Balb/c	5	5×10^6
4	Клетки CHO-S-hCD276	в/б	SJL	5	5×10^6
5	Рекомбинантный белок CD276 человека	п/к	SJL	5	100 мкг

1.1.2 Планы иммунизаций

План иммунизации (Группа 1)

День 0	Взятие крови до иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первичная иммунизация: 5×10^6 клеток на мышь в/б
День 14	Бустерная иммунизация 1: 5×10^6 клеток на мышь в/б
	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ1)

	Анализ взятой крови методом FACS
День 28	Бустерная иммунизация 2: в/б, 5×10^6 клеток на мышь в/б
День 38	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ2)
День 38	Анализ взятой крови методом FACS
	Анализ данных и завершение фазы
День 39	Бустерная иммунизация перед слиянием (последняя), п/к, 100 мкг на мышь
	<ul style="list-style-type: none"> Животные, не отобранные для слияния клеток, будут содержаться в клетках, и им могут быть проведены дополнительные бустерные иммунизации.

План иммунизации (Группа 2)

День 0	Взятие крови до иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первичная иммунизация: 100 мкг/мышь п/к, CFA
День 14	Бустерная иммунизация 1: 100 мкг/мышь п/к, IFA
	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ1)
	Анализ взятой крови методом FACS
День 28	Бустерная иммунизация 2: п/к, 100 мкг/мышь п/к, IFA
День 38	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ2)
День 38	Анализ взятой крови методом FACS
	Анализ данных и завершение фазы
День 42	Бустерная иммунизация перед слиянием (последняя), в/б, 5×10^6 клеток на мышь
	<ul style="list-style-type: none"> Животные, не отобранные для слияния клеток, будут содержаться в клетках, и им могут быть проведены дополнительные бустерные иммунизации.

План иммунизации (Группа 3)

День 0	Взятие крови до иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первичная иммунизация: 5×10^6 клеток на мышь в/б
День 14	Бустерная иммунизация 1: 5×10^6 клеток на мышь в/б
	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ1)
	Анализ взятой крови методом FACS
День 28	Бустерная иммунизация 2: в/б, 5×10^6 клеток на мышь в/б
День	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл

38	сыворотки/мышь) (ТВ2)
День 38	Анализ взятой крови методом FACS
	Анализ данных и завершение фазы
День 39	Бустерная иммунизация перед слиянием (последняя), в/б, 5×10^6 клеток на мышь
	<ul style="list-style-type: none"> Животные, не отобранные для слияния клеток, содержались в клетках, и им могли быть проведены дополнительные бустерные иммунизации.

План иммунизации (Группа 4)

День 0	Взятие крови до иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первичная иммунизация: 5×10^6 клеток на мышь в/б
День 14	Бустерная иммунизация 1: 5×10^6 клеток на мышь в/б
	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ1)
	Анализ взятой крови методом FACS
День 28	Бустерная иммунизация 2: в/б, 5×10^6 клеток на мышь в/б
День 38	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ2)
День 38	Анализ взятой крови методом FACS
	Анализ данных и завершение фазы
День 42	Бустерная иммунизация 2: в/б, 5×10^6 клеток на мышь в/б
День 51	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ2)
День 51	Анализ взятой крови методом FACS
	Анализ данных и завершение фазы
День 52	Бустерная иммунизация перед слиянием (последняя), в/б, 5×10^6 клеток на мышь
	<ul style="list-style-type: none"> Животные, не отобранные для слияния клеток, содержались в клетках, и им могли быть проведены дополнительные бустерные иммунизации.

План иммунизации (Группа 5)

День 0	Взятие крови до иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первичная иммунизация: 100 мкг/мышь п/к, CFA
День 14	Бустерная иммунизация 1: 100 мкг/мышь п/к, IFA
	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (ТВ1)

	Анализ взятой крови методом FACS
День 28	Бустерная иммунизация 2: п/к, 100 мкг/мышь п/к, IFA
День 38	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (TB2)
День 38	Анализ взятой крови методом FACS
День 42	Бустерная иммунизация 2: п/к, 100 мкг/мышь п/к, IFA
День 51	Взятие крови после иммунизации (15-30 мкл сыворотки/мышь) (TB2)
День 51	Анализ взятой крови методом FACS
	Анализ данных и завершение фазы
День 68	Бустерная иммунизация перед слиянием (последняя), п/к, 100 мкг/мышь
	<ul style="list-style-type: none"> Животные, не отобранные для слияния клеток, содержались в клетках, и им могли быть проведены дополнительные бустерные иммунизации.

1.1.3 Анализ антисыворотки, полученной после иммунизации

Скрининг- Проводили взятие крови после иммунизации и оценивали образцы путем анализа методом FACS с использованием линии клеток CHO-S, характеризующейся стабильной сверхэкспрессией CD276 человека и/или мыши (CHO-S-hCD276 и/или CHO-S-mCD276).

Скрининг- Проводили взятие крови после иммунизации и оценивали образцы путем анализа методом Elisa с использованием внеклеточного домена рекомбинантного белка CD276 человека.

1.2 Получение гибридомы и скрининг

1.2.1 Слияние клеток и скрининг

Слияние- Для слияния спленоцитов отбирали мышей, которые лучше всего отвечали на иммунизацию, что определяли путем анализа полученной после иммунизации крови методом FACS. Лимфоциты из селезенок и лимфатических узлов подвергали слиянию с линией клеток Sp2/0 с применением оптимизированного протокола слияния под действием электрического поля. Для обеспечения успешного слияния клеток проводили многократные слияния.

Скрининг и культивирование- Слитые клетки высевали (от 2×10^4 до 10^5 на лунку) в стопку 96-луночных планшетов. В планшетах отслеживали рост клеток и еженедельно добавляли подпитку. Лунки с ростом клеток подвергали скринингу с помощью методов первичного скрининга через 10-14 дней с применением FACS и/или

других подходящих методов, таких как Elisa. Проводили многократные слияния и скрининги для каждого антигена-мишени. Положительные родительские клоны, которые показали положительный результат связывания с CHO-S-CD276 и положительный сигнал Elisa при первичном скрининге, выращивали в 24-луночных планшетах для вторичного скрининга.

Дополнительный скрининг антител- После первичного скрининга положительные родительские клоны, выращенные в 24-луночных планшетах, снова подвергали скринингу с помощью анализа, описанного для воронкообразного скрининга гибридом ниже.

Представляющие интерес гибридомы были выбраны для последующего субклонирования.

1.2.2 Субклонирование, скрининг и криоконсервирование гибридом

Субклонирование- Родительские гибридомы с желаемой реактивностью и изотипами, полученные в результате воронкообразного скрининга, описанного выше, далее подвергали субклонированию путем нескольких циклов предельных разведений или сортировки отдельных клеток до получения моноклонов.

Скрининг и выращивание- Планшеты после субклонирования подвергали скринингу с помощью Elisa в отношении белков или клеток, и субклоны с хорошей связывающей способностью выращивали до масштаба 24-луночных планшетов для контрольных испытаний. Специфичность и перекрестная реактивность этих субклонов были подтверждены с помощью анализа методом FACS. Кратко, родительские клетки CHO-S, CHO-S-hCD276, линию клеток CHO-S, характеризующуюся стабильной сверхэкспрессией CD276 *Macaca_fascicularis*, линию клеток CHO-K1 S, характеризующуюся стабильной сверхэкспрессией CD276 мыши, инкубировали с антителами, продуцируемыми каждым субклоном, соответственно. Для обнаружения связывания первичного антитела с клетками применяли вторичное антитело, конъюгированное с флуоресцентным красителем. Медианную интенсивность флуоресценции определяли с помощью анализа методом FACS.

Криоконсервирование- Целевые субклональные линии клеток подвергали секвенированию и затем выращивали в культуральных флаконах для криоконсервирования. Первоначально криоконсервировали 4-6 пробирок для каждой линии клеток в количестве $0,5-13,0 \times 10^6$ клеток/пробирку. При необходимости для выбранных наиболее ценных линий клеток создавали главный банк клеток и рабочий банк

клеток.

2. Результаты

Авторы настоящего изобретения обнаружили 43 антитела с уникальными последовательностями, демонстрирующих положительный результат связывания с клетками CHO-S, характеризующимися стабильной сверхэкспрессией белка CD276 человека (CHO-S-hCD276), но не связывающихся с родительскими клетками CHO-S, что свидетельствует о том, что эти антитела являются антителами, распознающими CD276 человека. Из них 42 антитела могли связываться с CD276 яванского макака и 11 антител могли связываться с белком CD276 мыши. Значения MFI окрашивания антителами мыши CHO-S, CHO-S-hCD276, CHO-S-mCD276, CHO-S-Macaca_fascicularis CD276 (CHO-S-synoCD276), определенные с помощью FACS, представлены в таблице ниже (таблица 5).

Таблица 5. MFI при связывании антител с различными линиями клеток

Клон	MFI по данным FACS (CHO-S)	MFI по данным FACS (CHO-S-hCD276)	MFI по данным FACS CHO-S-mCD276	MFI по данным FACS CHO-S-synoCD276
15-G1-D1-E3	1585	62545	6610	99442
28-G2-E6-B10	1267	56316	2077	40831
6-D8-E7-A11	2571	37901	92619	100797
8-B4-F5-E11	1574	40419	7366	58650
13-A8-C4-G1	999	54074	6198	95808
6-F3-G2-G1	1441	37392	6978	113858
15-C8-B5-G7	1114	36640	5734	42958
3-G7-D8-D3	1331	82411	1291	6422
14-E7-G9-D4	1331	78067	1304	61808
6-H11-G5-D8	1327	112516	1358	30365
7-E1-F8-F6	1345	6990	1309	5590
9-E8-F9-C10	1309	7607	1951	5705
3-C2-C3-E7	1188	38810	2770	2106
27-F8-E10-E11	1322	15962	1349	80481
9-G2-H6-E4	1309	49603	27620	5404
25-D3-G4-C6	1331	5941	1372	5386
27-E7-D8-C7	1313	94678	1587	87885
2-A7-B10-A3	1322	58948	2039	56030
18-F9-D8-G7	1309	126666	20645	83534
10-B9-D10-A12	1280	399656	3171	10125
24-C10-F9-G7	1342	85105	1184	15198
20-A2-D10-G8	1184	77149	1255	9025
3-F2-E7-F9	1250	52275	1141	35661
5-D1-G6-D9	1349	45271	1529	62228

23-F10-G4-F11	1327	127095	1300	36702
16-C6-F7-F5	1276	141395	1833	19524
22-E11-C3-F2	1188	74329	1667	56507
11-C12-F4-F6	1345	41880	1340	5137
16-G3-D10-C10	1336	23162	1322	6188
26-D2-D6-B12	1345	47467	1313	63076
21-B3-B1-H5	1304	71491	1345	20230
30-C7-C11-D4	1327	138317	8222	96294
11-G10-B4-B11	1307	32768	2798	26386
20-F8-B5-G2	1322	88781	67038	51137
9-B9-H11-G7	1041	96785	1356	145769
9-G12-D6-A11	1066	53167	1422	35661
10-G6-C4-B2	1340	5647	17431	4322
8-C3-E3-F3	1340	63936	1322	12053
30-E2-G7-G7	1322	46988	1296	35122
20-C5-D7-D3	1309	77017	1345	13206
13-E4-G9-A4	1209	148759	1370	16822
25-C8-D7-C5	1188	147755	1157	39074
4-D5-B9-B11	1225	144785	2099	148256

ПРИМЕР 2: Определение характеристик антител: Аффинность

1. Методы

1.1 Аффинность связывания с клетками в отношении линии раковых клеток SKOV3

Для создания и продукции химерных антител IgG1 человека были выбраны последовательности 31 антитела мыши из таблицы 5. Аффинность связывания этих антител и эталонного антитела, эноблитузумаба (см. US8802091, MGA271, в частности, с конструкцией, обозначенной как hBRCA84D-2), а также MGC018 (конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором mAb MGA017 (IgG1 человека) конъюгировано через расщепляемый линкер с пролекарством секо-дуокармицин-гидроксibenзамид-азаиндолом (DUBA), алкилирующим агентом, который может повреждать ДНК как в делящихся, так и в неделящихся клетках, тем самым вызывая гибель клеток) с полученной от пациента-человека линией клеток рака яичника, SKOV3, определяли с помощью анализа методом FACS.

Протокол анализа методом FACS является следующим:

1. Клетки обрабатывали трипсином (1X); собранные клетки центрифугировали при 300 g в течение 3 мин и отбрасывали супернатант.
2. Клетки 2 раза промывали буфером для FACS путем центрифугирования при 300

g в течение 3 мин с отбрасыванием супернатанта.

3. Клетки ресуспендировали и высевали $2 \cdot 10^5$ клеток/лунку в планшет для анализа в 50 мкл буфера для FACS, затем добавляли 50 мкл первичного антитела (конечная концентрация первичного антитела: (5,00, 1,67, 0,56, 0,19, 0,06, 0,02, 0,01, 0,00 мкг/мл или 20,00, 6,67, 2,22, 0,74, 0,25, 0,08, 0,03, 0,00 мкг/мл). Инкубировали при 4°C в течение 1 часа.

4. Клетки дважды промывали с применением условий стадии 2. Клетки ресуспендировали в 100 мкл/лунку разведенного вторичного антитела, инкубировали при 4°C в течение 1 часа в темноте.

5. Клетки дважды промывали с применением условий стадии 2. Клетки ресуспендировали в 100 мкл/лунку буфера для FACS. Клетки содержали в темноте для анализа методом FACS.

Аффинность связывания выбранных антител в отношении SKOV3 была выше, ниже или сопоставима с таковой для эталонного антитела эноблитузумаба (см. таблицу 6 и фигуру 1).

Таблица 6. Аффинность связывания химерных антител с SKOV3

Номер	Название	SKOV3	
		MFI (макс.)	EC ₅₀ (мкг/мл)
1	IgG	114,8	/
2	Эноблитузумаб	830,3	0,9847
3	MGC018	2545	0,3847
4	15-G1-D1-E3	3186	0,8113
5	6-D8-E7-A11	2828	0,4022
6	15-C8-B5-G7	2137	0,2929
7	3-G7-D8-D3	1214	0,5095
8	14-E7-G9-D4	2726	1,618
9	6-H11-G5-D8	199,6	1,78
10	7-E1-F8-F6	3378	0,9823
11	3-C2-C3-E7	3703	1,433
12	27-F8-E10-E11	3224	2,26
13	9-G2-H6-E4	291,7	3,659
14	25-D3-G4-C6	3447	1,267
15	27-E7-D8-C7	4750	0,5425
16	18-F9-D8-G7	4610	0,2857
17	10-B9-D10-A12	3879	2,082
18	20-A2-D10-G8	3112	0,7906
19	23-F10-G4-F11	6725	4,425
20	16-C6-F7-F5	5354	0,1858
21	22-E11-C3-F2	5545	0,5228
22	16-G3-D10-C10	3176	1,311

23	21-B3-B1-H5	2718	0,7228
24	30-C7-C11-D4	4266	0,2821
25	11-G10-B4-B11	3747	0,5358
26	20-F8-B5-G2	3012	1,109
27	10-G6-C4-B2	5640	0,8215
28	8-C3-E3-F3	2883	0,6432
29	30-E2-G7-G7	5628	0,814
30	20-C5-D7-D3	2308	0,941
31	13-E4-G9-A4	3076	1,775
32	25-C8-D7-C5	3483	2,031

2. Анализ аффинности в отношении белка с помощью Biacore (ChemPartner)

Условия анализа:

Аналит: В7НЗ

Рабочий буфер: HBS-EP⁺

Скорость потока: 30 мкл/мин

Иммобилизация: Ab, 10 мкл/мин в течение 60 с

Введение серийных разведений В7НЗ

Время контакта: 180 с

Время диссоциации: 400 с

Регенерация: Gly, pH 1,5, 30 мкл/мин в течение 30 с

Метод: Многоцикловая кинетика/аффинность с применением иммобилизации

Модель прибора: Biacore 8K (GE)

Температура анализа: 25 °С

В таблице 7 представлена аффинность связывания химерных антител с hВ7НЗ, определенная с помощью Biacore (ChemPartner).

Но-мер	Кинетическая модель	Раствор иммобилизованного агента 1	Раствор аналита 1	Критерий Chi ² кинетики (RU ²)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
1	Связывание 1:1	2 мкг/мл 15-G1-D1-E3	В7НЗ ЧЕЛОВЕКА	5,91E-01	5,50E+05	2,11E-04	3,83E-10
2	Связывание 1:1	1 мкг/мл 6-D8-E7-A11	В7НЗ ЧЕЛОВЕКА	8,17E-01	4,64E+05	3,48E-04	7,49E-10

3	Связывание 1:1	2 мкг/мл 15-C8-B5- G7	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	3,70E-01	4,92E+05	1,96E-04	3,99E-10
4	Связывание 1:1	2 мкг/мл 7- E1-F8-F6	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	1,97E-01	2,60E+05	2,22E-04	8,55E-10
5	Связывание 1:1	2 мкг/мл 27-F8-E10- E11	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	2,34E-01	2,78E+05	1,73E-04	6,21E-10
6	Связывание 1:1	2 мкг/мл 25-D3-G4- C6	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	1,42E-01	1,08E+05	2,50E-04	2,31E-09
7	Связывание 1:1	1 мкг/мл 18-F9-D8- G7	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	8,59E-01	4,89E+05	2,39E-04	4,89E-10
8	Связывание 1:1	2 мкг/мл 20-A2-D10- G8	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	8,74E-01	5,08E+05	2,82E-04	5,55E-10
9	Связывание 1:1	2 мкг/мл 16-C6-F7- F5	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	2,15E+00	3,77E+05	2,43E-04	6,45E-10
10	Связывание 1:1	2 мкг/мл 16-G3-D10- C10	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	1,29E-01	1,85E+05	2,14E-04	1,16E-09
11	Связывание 1:1	1 мкг/мл 10-G6-C4- B2	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	1,80E-01	2,52E+05	1,98E-04	7,85E-10
12	Связывание 1:1	1 мкг/мл 8- C3-E3-F3	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	4,26E-01	9,90E+05	4,40E-04	4,44E-10
13	Связывание 1:1	2 мкг/мл 20-C5-D7- D3	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	5,33E-01	6,45E+05	4,16E-04	6,44E-10
14	Связывание 1:1	2 мкг/мл 25-C8-D7- C5	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	3,97E-01	2,03E+05	2,43E-04	1,20E-09
15	Связывание 1:1	1 мкг/мл 10-B9-D10- A12	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	6,25E-01	3,75E+05	2,82E-04	7,52E-10
16	Связывание 1:1	1 мкг/мл эноблитузу маба	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	5,98E-01	1,28E+05	4,86E-04	3,80E-09
17	Связывание 1:1	2 мкг/мл MGC018	В7Н3 ЧЕЛОВЕКА	6,03E-02	8,89E+05	4,08E-04	4,59E-10

3. Профиль экспрессии В7Н3 на нескольких линиях раковых клеток

Экспрессию В7Н3 выявляли методом FACS с применением 6-D8-E7-A11. Был обнаружен высокий уровень экспрессии В7Н3 на нескольких линиях раковых клеток, таких как ВхРС3 (рак поджелудочной железы), MCF7 (рак молочной железы), Dentr0it562 (рак головы и шеи), RKO (рак толстой кишки) и SUN620 (рак желудка) (см. фигуру 2).

ПРИМЕР 3. Определение характеристик антител: ADCC

1. Методы

Для определения ADCC антител к CD276 в 96-луночный стерильный планшет с плоским дном высевали 1×10^5 /лунку SKOV3, затем добавляли 2×10^4 Jurkat-NFAT-Luciferase-CD16 в качестве эффекторных клеток. После этого в каждую лунку добавляли серийные разведения антител и инкубировали планшет при 37°C, 5% CO₂ в течение 18 часов. Затем регистрировали люциферазную активность для оценки активности ADCC антител.

2. Результаты

Все антитела согласно настоящему изобретению продемонстрировали выраженный эффект ADCC в отношении клеток SKOV3 (линия клеток рака яичника человека). Некоторые из антител продемонстрировали более низкую или сопоставимую EC₅₀ при сравнении с эталонным антителом, эноблитузумабом (таблица 8 и фигура 3), что указывает на то, что они опосредуют эффект ADCC в отношении клеток SKOV3 более эффективно, чем эноблитузумаб (MGA271).

Таблица 8. EC₅₀ индуцированного антителами эффекта ADCC в отношении SKOV3

	EC ₅₀ (мкг/мл)
Эноблитузумаб	0,08636
9-E8-F9-C10	4,052
10-G6-C4-B2	0,2369
18-F9-D8-G7	0,5032
27-E7-D8-C7	0,1035
3-C2-C3-E7	0,1864
16-C6-F7-F5	0,006641
22-E11-C3-F2	0,01792
30-E2-G7-G7	0,2473
23-F10-G4-F11	0,1367
11-G10-B4-B11	17,34
30-C7-C11-D4	0,03268
5-D1-G6-D9	1,553
20-F8-B5-G2	3,013
9-G2-H6-E4	13,6

10-B9-D10-A12	0,2585
20-A2-D10-G8	0,2625
20-C5-D7-D3	0,06897
13-E4-G9-A4	0,8762
25-C8-D7-C5	0,1228
16-G3-D10-C10	0,04186
21-B3-B1-H5	0,6478
8-C3-E3-F3	0,1111
15-G1-D1-E3	0,06548
15-C8-B5-G7	0,6968
27-F8-E10-E11	0,02385
25-D3-G4-C6	0,03723
2-A7-B10-A3	4,207
3-G7-D8-D3	0,008984
14-E7-G9-D4	0,2516
7-E1-F8-F6	0,01771
6-D8-E7-A11	0,06677

ПРИМЕР 4. Определение характеристик антител: CDC

1. Методы

Для определения CDC антител к CD276 клетки CHO-S-hCD276 ресуспендировали в среде для культивирования клеток в количестве 4Е5 клеток/мл, а затем добавляли в 96-луночный планшет с непрозрачными стенками по 50 мкл/лунку. Антитела к CD276 разбавляли полной средой F-12К и добавляли в 96-луночный планшет с непрозрачными стенками по 50 мкл/лунку. Комплемент сыворотки человека разбавляли средой для культивирования клеток и добавляли в тот же планшет по 50 мкл/лунку. Полученную смесь инкубировали в течение 2 часов в CO₂-инкубаторе при 37°C. Добавляли реагент для определения клеточной цитотоксичности CellTiter-Glo по 50 мкл/лунку, и полученную смесь инкубировали в течение 10 минут при к. т. Регистрировали сигнал люминесценции жизнеспособных клеток на микропланшетном анализаторе.

2. Результаты

Все антитела к CD276 продемонстрировали выраженный эффект CDC в отношении клеток CHO-S-hCD276 и более низкое значение EC₅₀ по сравнению с таковым для эталонного антитела, эноблитузумаба (MGA271) (см. таблицу 9 и фигуру 4).

Таблица 9. Максимальный процент уничтожения CHO-S-hCD276 и EC₅₀ индуцированного антителами эффекта CDC

	EC ₅₀ (нМ)	Наибольшая цитотоксичность (%)
--	-----------------------	--------------------------------

18-F9-D8-G7	2,441	70,33
30-C7-C11-D4	3,215	60,27
10-G6-C4-B2	2,738	93,53
16-C6-F7-F5	1,284	92,09
15-C8-B5-G7	7,537	86,1
7-E1-F8-F6	1,69	91,89
25-D3-G4-C6	2,413	89,7
Fc MGA271-WT	8,913	19,63
20-A2-D10-G8	1,922	85,07
16-G3-D10-C10	1,428	93,56
25-C8-D7-C5	2,417	91,37
6-D8-E7-A11	1,575	92,45
MGC018	1,672	93,32
MGA271	7,28	80,09
Fc MGA271-WT	9,64	19,77

ПРИМЕР 5. Определение характеристик антител: Непрямая ADC-цитотоксичность

1. Методы

Fab-ZAP представляет собой химический конъюгат моновалентного антитела козы к иммуноглобулину человека (вторичного антитела) и инактивирующего рибосомы белка сапорина. Fab-ZAP применяют для определения способности антител к интернализации. В этом анализе 80 мкл клеток SKOV-3 высевали в количестве 2000 клеток/лунку в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем добавляли антитела к CD276 по 40 мкл/лунку. Добавляли по 40 мкл/лунку разведения Fab-ZAP human и инкубировали в течение 96 часов в CO₂-инкубаторе при 37°C. Добавляли реагент для определения клеточной цитотоксичности CellTiter-Glo по 100 мкл/лунку и инкубировали в течение 10 минут при к. т. Регистрировали сигнал люминесценции жизнеспособных клеток на микропланшетном анализаторе.

2. Результаты

Все антитела к CD276 продемонстрировали выраженный эффект ADC в отношении клеток SKOV3 с более низкими или сопоставимыми значениями IC₅₀ при сравнении с эталонным антителом, MGC018 (таблица 10, фигура 5), что указывает на то, что они являются потенциальными кандидатами для получения ADC.

Таблица 10. IC₅₀ непрямой ADC-цитотоксичности в отношении SKOV3

	IC ₅₀ (нМ)
MGC018	0,013
6-D8-E7-A11	0,008

15-C8-B5-G7	0,008
7-E1-F8-F6	0,028
25-D3-G4-C6	0,023
18-F9-D8-G7	0,014
10-B9-D10-A12	0,021
20-A2-D10-G8	0,007
16-C6-F7-F5	0,009
22-E11-C3-F2	0,016
10-G6-C4-B2	0,008
8-C3-E3-F3	0,012
20-C5-D7-D3	0,007
13-E4-G9-A4	0,021
25-C8-D7-C5	0,018

ПРИМЕР 6. Эффективность антител *in vivo* для лечения подкожной карциномы толстой кишки мыши MC-38-hCD276 у самок мышей C57BL/6

1. План исследования и методы

Для исследования эффективности *in vivo* конструировали и экспрессировали несколько моноклональных антител с Fc IgG2a мыши.

1. Опухолевые клетки MC-38-hCD276 (B7H3) содержали *in vitro* в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в воздухе. Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали с помощью счетчика клеток перед инокуляцией опухоли.

2. Каждой мыши подкожно инокулировали в правую заднюю область бока опухолевые клетки MC-38-hCD276 (B7H3) (1×10^6) в 0,1 мл PBS для развития опухоли. Дату рандомизации обозначали как день 0, и введение начинали с дня 0.

3. Рандомизацию начинали при достижении среднего размера опухоли приблизительно 50-60 мм³. В это исследование было включено 60 мышей. Всех животных случайным образом распределяли в 7 исследуемых групп. Рандомизацию проводили с помощью метода случайных блоков.

4. Два раза в неделю определяли объемы опухолей в двух измерениях с помощью штангенциркуля, и объем выражали в мм³ согласно формуле: $V = (L \times W \times W)/2$, где V представляет собой объем опухоли, L представляет собой длину опухоли (наибольшее измерение опухоли), и W представляет собой ширину опухоли (наибольшее измерение опухоли, перпендикулярное L). Введение, а также определение размера опухоли и массы тела проводили в боксе с ламинарным потоком воздуха (см. таблицу 11, фигуру 6).

5. В качестве контроля применяли атезолизумаб (антитело к PD-L1, также называемое тецентрик (Tecentriq) или MPDL3280A, см. WO2010077634A1) и Antengene-084M (последовательность Fab MGA271 (см. US8802091B), сконструированная совместно с IgG2a мыши).

Таблица 11. План исследования для испытания эффективности *in vivo*.

Группа	N	Линия мышей	Модель опухоли	Лечение	Величина дозы (мг/кг) или (мг/кг)	Раствор для введения (мг/мл)	Объем введения (мкл/г)	Путь	Частота и длительность введения
1	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	IgG2A мыши	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
2	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	Атезолизумаб	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
3	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	IgG2a мыши 16-C6-F7-F5	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
4	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	IgG2a мыши 25-C8-D7-C5	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
5	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	IgG2a мыши 30-C7-C11-D4	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
6	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	IgG2a мыши 18-F9-D8-G7	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
7	6	C57BL/6	MC-38-hCD276	IgG2a мыши 6-D8-E7-A11	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз
8	6	C57BL/6	MC-38-	IgG2a	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5

		6	hCD276	мыши 10-G6- C4-B2					доз
9	6	C57BL/ 6	MC-38- hCD276	IgG2a мыши Anten gene- 084M	5	0,5	10	в/б	Q3D x 5 доз

2. Результаты

Как показано на фигуре 6, некоторые из антител к CD276 продемонстрировали высокую эффективность *in vivo*. В частности, IgG2a мыши 25-C8-D7-C5 продемонстрировал более сильное ингибирование опухоли, чем IgG2a мыши Antengene-084M.

ПРИМЕР 7: Исследование эффективности ADC антител *in vivo*

1. План исследования и методы

Для оценки потенциала ADC антител проводили конъюгирование антител с VC-MMAE в ChemPartner. Были получены серии конъюгированных с VC-MMAE антител. Подробные сведения представлены в таблице 12.

Таблица 12. Обобщенные сведения о конъюгатах антител

Название ADC	Концентрация (мг/мл)	Кол-во (мг)	Агрегация по данным SEC (%)	Содержание эндотоксина (EU/мг)	DAR по данным HIC
MGC018	3,865	11,6	1,04	0,23	4,48
16-C6-F7-F5	3,680	9,6	1,07	0,34	4,45
20-A2-D10-G8	3,287	9,9	0,26	0,27	4,15
6-D8-E7-A11	4,041	8,1	1,52	0,41	4,18
10-G6-C4-B2	3,706	16,7	0,62	0,48	4,20
15-C8-B5-G7	3,627	15,2	0,76	0,66	4,42
18-F9-D8-G7	3,900	15,6	0,79	0,75	4,04
hIgG	3,825	8,0	1,09	0,29	4,39

Для исследования Calu-6 каждой бестимусной мыши Balb/c подкожно инокулировали в правую переднюю область бока опухолевые клетки Calu-6 (5×10^6) в 0,1 мл PBS для развития опухоли. Рандомизацию начинали при достижении среднего размера

опухоли приблизительно 122 мм³. В исследование было включено 60 мышей. Дату рандомизации обозначали как день 0, введение начинали с дня 0.

2. Результаты

В этом исследовании изучали терапевтическую эффективность исследуемых агентов для лечения имплантированного подкожно рака легкого человека Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c. В ходе исследования эффективности при запланированных схемах введения не наблюдалось выраженного снижения массы тела, смертности или токсических реакций. На 24 день MGC018, 10-G6-C4-B2, 16-C6-F7-F5, 15-C8-B5-G7 и 18-F9-D8-G7 в дозе 3 мг/кг в качестве единственного агента демонстрируют существенную противоопухолевую эффективность в отношении модели Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c, соответственно. Результаты представлены на фигуре 7 и в таблице 13.

Таблица 13. Противоопухолевая активность исследуемых соединений в подкожной модели Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c

Группа	Описание лечения	Размер опухоли (мм ³) на 24 день	T/C (%) на 24 день	TGI (%) на 24 день	P-значение
1	IgG	2103,52 ± 236,00	-	-	-
2	MGC018	215,48 ± 53,71	10,24	89,76	<0,0001
3	10-G6-C4-B2	229,10 ± 66,60	10,89	89,11	<0,0001
4	16-C6-F7-F5	398,44 ± 116,04	18,94	81,06	0,00159
5	20-A2-D10-G8	504,02 ± 62,98	23,96	76,04	0,0765
6	15-C8-B5-G7	561,24 ± 285,12	26,68	73,32	0,00174
7	18-F9-D8-G7	418,59 ± 75,48	19,90	80,10	0,0126
8	6-D8-E7-A11	493,00 ± 61,89	23,44	76,56	0,0677

Примечание: а: Среднее ± SEM; б: Значения TGI, T/C и р получены при сравнении с объемом опухоли в группе 1 на 24 день с использованием критериев Даннетта.

ПРИМЕР 8: Исследование активации Т-клеток (анализ MLR) антителами

1. План исследования и методы

Индукция DC

Клетки-моноциты ресуспендировали в количестве 5×10^6 в 3 мл полной среды с добавлением 2 ед./мл фактора культуры дендритных клеток, и затем культивировали клетки в 6-луночной планшете. На второй день добавляли 2 мл/лунку свежей полной среды с добавлением 2 ед./мл фактора культуры дендритных клеток для культивирования в течение еще трех дней. Затем происходила дифференцировка моноцитов с образованием незрелых дендритных клеток (iDC). После 48 часов стимуляции фактором созревания

дендритных клеток в дозе 2 ед./мл происходила дифференцировка iDC с образованием зрелых дендритных клеток.

Расщепление антител

Объединяли 25 мкг hIgG1 и 3 мкл 10X Glyco-буфера, и затем добавляли PBS для обеспечения общего объема реакционной смеси 30 мкл. Добавляли 1 мкл протеазы IdeZ, затем инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Добавляли 10 мкл гранул с белком A/G в 1 мл PBS, промывали 2 раза. Гранулы ресуспендировали в реакционном растворе, полученном на стадии, описанной выше.

Пробирку помещали на магнит на 1 мин при комнатной температуре, F(ab)₂ находился в супернатанте, а Fc был иммобилизован на гранулах.

Анализ MLR

Высевали Т-клетки в количестве 0,2 миллиона клеток/лунку и mDC в количестве 0,02 миллиона клеток/лунку.

Клетки обрабатывали PBS, IgG1, 25-C8-D7-C5, 30-C7-C11-D4, ВМК (MGA271) или их Fab (конечная концентрация 5 мкг/мл). Через 24 часа собирали супернатанты и определяли IL-2 и IFN γ человека с помощью Elisa.

2. Результаты

Как показано на фигурах 8 и 9, 30-C7-C11-D4 может вызывать активацию Т-клеток, тогда как 25-C8-D7-C5 и ВМК (MGA271) не могут.

ПРИМЕР 9: Гуманизация антител и оптимизация РТМ

9.1 Анализ аффинности гуманизированных антител в отношении клеток с помощью FACS

Для проведения гуманизации и оптимизации РТМ были выбраны 10-G6-C4-B2 и 30-C7-C11-D4. Аффинность гуманизированных кандидатных антител и последовательностей с оптимизированными РТМ оценивали с помощью FACS.

Результаты представлены на фигурах 10 и 11. Все последовательности показали аффинность, сравнимую с таковой для исходного антитела.

9.2 Анализ аффинности в отношении белка с помощью Biacore (ChemPartner)

Условия анализа:

Аналит: В7НЗ. Рабочий буфер: HBS-EP+. Скорость потока: 30 мкл/мин. Иммобилизация: Ab, 10 мкл/мин в течение 60 с. Введение серийных разведений В7НЗ. Время контакта 180 с, время диссоциации 400 с. Регенерация: Gly, pH 1,5, 30 мкл/мин в

течение 30 с. Метод: Многоцикловая кинетика/аффинность с применением иммобилизации. Модель прибора: Biacore 8K(GE). Температура анализа: 25°C.

Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14. Аффинность связывания гуманизированных антител с hV7H3, определенная с помощью Biacore (ChemPartner).

Кинетическая модель	Раствор иммобилизуемого агента 1	Раствор анализатора 1	Критерий Chi ² кинетики (RU ²)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2	B7H3	2,05E-01	2,16E+05	8,97E-05	4,15E-10
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2_hVH2-VL1_PTM	B7H3	1,10E-01	8,53E+04	7,26E-05	8,51E-10
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2_hVH3-VL3_PTM	B7H3	1,61E-01	1,18E+05	1,02E-06	8,70E-12
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2_hVH4-VL1_PTM	B7H3	1,16E-01	8,96E+04	1,55E-04	1,73E-09
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2_hVH4-VL2_PTM	B7H3	1,21E-01	5,27E+04	7,12E-05	1,35E-09
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2_hVH5-VL1_PTM	B7H3	1,11E-01	1,47E+05	1,37E-05	9,29E-11
Связывание 1:1	10-G6-C4-B2_hVH5-VL3_PTM	B7H3	2,61E-01	1,46E+05	1,01E-06	6,92E-12

9.3 Исследование терапевтического потенциала ADC гуманизированных антител 10-G6-C4-B2 *in vivo*

Оценивали терапевтический потенциал ADC гуманизированных антител 10-G6-C4-B2 *in vivo*. Конъюгаты антител с VC-MMAE были сконструированы в ChemPartner. Были получены серии конъюгированных с VC-MMAE антител, подробные сведения о которых приведены в таблице 15.

Таблица 15. Обобщенные сведения о конъюгатах антител

Название ADC	Концентрация (мг/мл)	Кол-во (мг)	Агрегация по данным SEC (%)	DAR по данным HIC	Содержание эндотоксина (EU/мг)
--------------	----------------------	-------------	-----------------------------	-------------------	--------------------------------

10-G6-C4-B2_hVH2-VL1_PTM	3,073	6,88	0,85	4,69	0,039
10-G6-C4-B2_hVH3-VL3_PTM	3,186	8,19	0,5	4,44	0,028
10-G6-C4-B2_hVH4-VL1_PTM	3,181	7,60	1,37	4,57	0,047
10-G6-C4-B2_hVH4-VL2_PTM	2,950	7,82	1,82	4,22	0,041
10-G6-C4-B2_hVH5-VL1_PTM	1,834	1,47	1,56	4,33	Не определяли
10-G6-C4-B2_hVH5-VL3_PTM	3,251	7,90	0,2	4,6	0,055
IgG	3,286	7,85	1,19	4,63	0,037
10-G6-C4-B2	2,506	4,21	0,43	4,35	0,036

Для исследования Calu-6 каждой бестимусной мыши Balb/c подкожно инокулировали в правую переднюю область бока опухолевые клетки Calu-6 (5×10^6) в 0,1 мл PBS для развития опухоли. Рандомизацию начинали при достижении среднего размера опухоли приблизительно 122 мм³. В исследование было включено 60 мышей. Дату рандомизации обозначали как день 0, введение начинали с дня 0.

В этом исследовании изучали терапевтическую эффективность исследуемых агентов для лечения имплантированного подкожно рака легкого человека Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c. В ходе исследования эффективности при запланированных схемах введения не наблюдалось выраженного снижения массы тела, смертности или токсических реакций.

Результаты представлены на фигуре 12 и в таблице 16. На 26 день почти все исследуемые агенты в дозе 3 мг/кг в качестве единственного агента демонстрируют существенную противоопухолевую эффективность в отношении модели Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c, соответственно.

Таблица 16. Противоопухолевая активность исследуемых соединений в подкожной модели Calu-6 у бестимусных мышей Balb/c

Описание лечения	Размер опухоли (мм ³) ^a на 26 день	T/C (%) на 26 день	TGI (%) на 26 день	P-значение ^b
IgG, 3мг/кг, QWx4 дозы	2823,12 ± 361,18(6)	--	--	--
10-G6-C4-B2, 3мг/кг, QWx4 дозы	752,77 ± 33,24(6)	26,66	73,34	>0,05 (0,0645)
10-G6-C4-B2_hVH2-VL1_PTM, 3мг/кг, QWx4	936,63 ± 227,54(6)	33,18	66,82	<0,05 (0,0421)

ДОЗЫ

10-G6-C4-B2_hVH3- VL3_PTМ, 3мг/кг, QWx4 дозы	544,41 ± 49,50(6)	19,28	80,72	<0,001 (4,35E-05)
10-G6-C4-B2_hVH4- VL1_PTМ, 3мг/кг, QWx4 дозы	633,69 ± 61,73(6)	22,45	77,55	<0,001 (0,000727)
10-G6-C4-B2_hVH4- VL2_PTМ, 3мг/кг, QWx4 дозы	744,98 ± 69,83(6)	26,39	73,61	<0,05 (0,0396)
10-G6-C4-B2_hVH5- VL1_PTМ, 3мг/кг, QWx4 дозы	856,17 ± 216,11(6)	30,33	69,67	<0,01 (0,00691)
10-G6-C4-B2_hVH5- VL3_PTМ, 3мг/кг, QWx4 дозы	595,32 ± 124,15(6)	21,09	78,91	<0,001 (0,000593)

Примечание: Среднее ± SEM; Значения TGI, T/C и p получены при сравнении с объемом опухоли в группе 1 на 26 день с использованием критерия Краскела-Уоллиса.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD276, содержащие 1, 2 или 3 последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1-3, 9-11, 17-19, 25-27, 33-35, 41-43, 49-51, 57-59, 65-67, 73-75, 81-83, 89-91, 97-99, 105-107, 113-115, 121-123, 129-131, 137-139, 145-147, 153-155, 161-163, 169-171, 177-179, 185-187, 193-195, 201-203, 209-211, 217-219, 225-227, 233-235, 241-243, 249-251, 257-259, 265-267, 273-275, 281-283, 289-291, 297-299, 305-307, 313-315, 321-323, 329-331, 337-339 и 374-375, и/или 1, 2 или 3 последовательности CDR легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6, 12-14, 20-22, 28-30, 36-38, 44-46, 52-54, 60-62, 68-70, 76-78, 84-86, 92-94, 100-102, 108-110, 116-118, 124-126, 132-134, 140-142, 148-150, 156-158, 164-166, 172-174, 180-181, 188-190, 196-198, 204-206, 212-214, 220-222, 228-230, 236-238, 244-246, 252-254, 260-262, 268-270, 276-278, 284-286, 292-294, 300-302, 308-310, 316-318, 324-326, 332-334, 340-342 и 376-377.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

- a) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1-3;
- b) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9-11;
- c) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 17-19;
- d) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25-27;
- e) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 33-35;
- f) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 41-43;

g) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 49-51;

h) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 57-59;

i) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 65-67;

j) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 73-75;

k) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 81-83;

l) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 89-91;

m) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 97-99;

n) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 105-107;

o) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 113-115;

p) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 121-123;

q) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 129-131;

r) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 137-139;

s) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 145-147;

t) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности

CDR, выбранные из SEQ ID NO: 153-155;

u) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 161-163;

v) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 169-171;

w) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 177-179;

x) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 185-187;

y) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 193-195;

z) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 201-203;

aa) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 209-211;

bb) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 217-219;

cc) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 225-227;

dd) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 233-235;

ee) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 241-243;

ff) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 249-251;

gg) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 257-259;

hh) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 265-267;

ii) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 273-275;

jj) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 281-283;

kk) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 289-291;

ll) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 297-299;

mm) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 305-307;

nn) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 313-315;

oo) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 321-323;

pp) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 329-331;

qq) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 337-339; и

гг) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9, 374 и 375.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, содержащие вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

a) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 4-6;

b) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 12-14;

c) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3

- последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20-22;
- d) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 28-30;
- e) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 36-38;
- f) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44-46;
- g) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 52-54;
- h) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 60-62;
- i) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 68-70;
- j) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 76-78;
- k) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 84-86;
- l) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 92-94;
- m) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 100-102;
- n) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 108-110;
- o) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 116-118;
- p) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 124-126;
- q) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3

- последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 132-134;
- г) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 140-142; 1, 2 или 3
- с) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 148-150; 1, 2 или 3
- т) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 156-158; 1, 2 или 3
- у) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 164-166; 1, 2 или 3
- в) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 172-174; 1, 2 или 3
- w) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 180-181; 1, 2 или 3
- х) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 188-190; 1, 2 или 3
- у) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 196-198; 1, 2 или 3
- z) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 204-206; 1, 2 или 3
- aa) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 212-214; 1, 2 или 3
- bb) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 220-222; 1, 2 или 3
- cc) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 228-230; 1, 2 или 3
- dd) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 236-238; 1, 2 или 3
- ee) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 236-238; 1, 2 или 3

- последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 244-246;
- ff) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 252-254; 1, 2 или 3
- gg) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 260-262; 1, 2 или 3
- hh) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 268-270; 1, 2 или 3
- ii) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 276-278; 1, 2 или 3
- jj) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 284-286; 1, 2 или 3
- kk) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 292-294; 1, 2 или 3
- ll) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 300-302; 1, 2 или 3
- mm) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 308-310; 1, 2 или 3
- nn) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 316-318; 1, 2 или 3
- oo) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 324-326; 1, 2 или 3
- pp) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 332-334; 1, 2 или 3
- qq) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 340-342; 1, 2 или 3
- rr) вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 376, 13 и 14; и 1, 2 или 3
- ss) вариабельной области легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 377, 45 и 46.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащие:

a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6;

b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22;

d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30;

e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38;

f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности

CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO:46;

g) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54;

h) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62;

i) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70;

j) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78;

k) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 83; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86;

l) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 91; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 94;

m) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 102;

n) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 110;

o) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 118;

p) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 123; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 126;

q) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133 и SEQ ID NO: 134;

г) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности

CDR, выбранные из SEQ ID NO:137, SEQ ID NO: 138 и SEQ ID NO: 139; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 142;

s) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150;

t) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 155; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157 и SEQ ID NO: 158;

u) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165 и SEQ ID NO: 166;

v) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174;

w) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 182;

x) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 190;

у) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 и SEQ ID NO: 195; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 198;

z) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 и SEQ ID NO: 203; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205 и SEQ ID NO: 206;

aa) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 и SEQ ID NO: 214;

bb) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 и SEQ ID NO: 222;

cc) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229 и SEQ ID NO: 230;

dd) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234 и SEQ ID NO: 235; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 238;

ee) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242 и SEQ ID NO: 243; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 и SEQ ID NO: 246;

ff) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250 и SEQ ID NO: 251; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253 и SEQ ID NO: 254;

gg) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 и SEQ ID NO: 259; и переменную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261 и SEQ ID NO: 262;

hh) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266 и SEQ ID NO: 267; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 269 и SEQ ID NO: 270;

ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274 и SEQ ID NO: 275; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277 и SEQ ID NO: 278;

jj) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282 и SEQ ID NO: 283; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285 и SEQ ID NO: 286;

kk) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293 и SEQ ID NO: 294;

ll) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298 и SEQ ID NO: 299; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301 и SEQ ID NO: 302;

mm) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306 и SEQ ID NO: 307; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309 и SEQ ID NO: 310;

nn) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314 и SEQ ID NO: 315; и переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317 и SEQ ID NO: 318;

oo) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3

последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322 и SEQ ID NO: 323; и вариабельную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325 и SEQ ID NO: 326;

pp) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330 и SEQ ID NO: 331; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333 и SEQ ID NO: 334;

qq) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338 и SEQ ID NO: 339; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341 и SEQ ID NO: 342;

гг) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 375; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 376, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14; или

ss) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 87,

SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 349 и гомологичных последовательностей с идентичностью им по меньшей мере 80%.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, содержащие вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 1756, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 344, SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 350 и гомологичных последовательностей с идентичностью им по меньшей мере 80%.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, содержащие:

- a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8;
- b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16;
- c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 24;

- d) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32;
- e) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40;
- f) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 48;
- g) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 56;
- h) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64;
- i) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 71, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 72;
- j) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 79, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 80;
- k) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 87, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 88;
- l) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 95, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 96;
- m) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 103, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 104;
- n) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 111, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 112;
- o) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 119, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 120;
- p) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 127, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 128;
- q) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 135, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 136;

- г) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 144;
- с) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 151, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 152;
- т) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 159, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 160;
- у) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 167, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 168;
- в) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 176;
- ш) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 184;
- х) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 191, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 192;
- ы) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 199, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 200;
- з) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 207, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 208;
- аа) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 215, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 216;
- бб) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 223, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 224;
- сс) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 231, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 232;
- дд) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 239, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 240;
- ее) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 247, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 248;

- ff) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 255, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 256;
- gg) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 263, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 264;
- hh) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 271, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 272;
- ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 279, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 280;
- jj) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 287, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 288;
- kk) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 295, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 296;
- ll) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 303, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 304;
- mm) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 311, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 312;
- nn) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 319, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 320;
- oo) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 327, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 328;
- pp) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 335, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 336;
- qq) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 343, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 344;
- rr) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 347, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 348; или
- ss) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 349, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 350.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, которые являются гуманизированными.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 378 (EVQLVESGGGLXQPGXSLRLSCXTSGFTLSDYYMSWVRQXPGKGLEWVXFMRNKANXYTTEYSASVRGRFTISRDTSKSXIYLMNSLXXEDTAVYYCVRDRXGRPFAYWGQGT LVTVSS), где X в положении i (i=12, 16, 23, 40, 49, 57, 80, 89, 90 и 103) SEQ ID NO: 378 обозначен как X_{Нi}, где X_{Н12} представляет собой V или I, X_{Н16} представляет собой G или R, X_{Н23} представляет собой A или T, X_{Н40} представляет собой A или P, X_{Н49} представляет собой G или S, X_{Н57} представляет собой A или G, X_{Н80} представляет собой I или T, X_{Н89} представляет собой R или K, X_{Н90} представляет собой A или T, X_{Н103} представляет собой D или E; и

варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 379 (DIXMTQSPXSLXXXXGXXXXIXCKSSQSLLNQKNFLTWYXQKPGXXPXXLLIYWAS TRESGVPXRFSGSGSGTDFTLXISXXXXEDLXXYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK), где X в положении i (i=3, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 32, 43, 48, 49, 51, 66, 80, 83, 84, 85, 86, 90 и 91) SEQ ID NO: 379 обозначен как X_{L_i}, где X_{L3} представляет собой V или Q, X_{L9} представляет собой D, L или S, X_{L12} представляет собой A, S или P, X_{L13} представляет собой A или V, X_{L14} представляет собой S или T, X_{L15} представляет собой L, V или P, X_{L17} представляет собой D или E, X_{L18} представляет собой R или P, X_{L19} представляет собой A или V, X_{L20} представляет собой S или T, X_{L22} представляет собой N, T или S, X_{L32} представляет собой A или S, X_{L43} представляет собой Q или L, X_{L48} представляет собой Q или K, X_{L49} представляет собой A, P или S, X_{L51} представляет собой K или Q, X_{L66} представляет собой S или D, X_{L80} представляет собой K или T, X_{L83} представляет собой R или S, X_{L84} представляет собой L или V, X_{L85} представляет собой Q или E, X_{L86} представляет собой A или P, X_{L90} представляет собой A или G, X_{L91} представляет собой T или V.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, которые содержат

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 380 (QVQLQESGPGLVKPSXTLSLTCXVXGYSITSDYAWNWIWIRQXPGKGLEWIGYISHSGSTS YNPSLKS RVTVISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSLGRRWYFDVWGQGTTVTV SS), где X в положении i (i=16, 23, 25 и 41) SEQ ID NO: 380 обозначен как X_{Нi}, где X_{Н16} представляет собой E или Q, X_{Н23} представляет собой A или T, X_{Н25} представляет собой S или Y, X_{Н41} представляет собой H или P; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 381 (DIXMTQSPXSLXXXXGXXXXIXCKSSQSLXSSTQKNYLAWYXQKPGXXPXXLLIYFAS TRDSGVPXRFSGSGSGTDFTLXISXXXEDLXXYFCQQHYIPFTFGQGTKLEIK), где X в положении i (i=3, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 31, 43, 48, 49, 51, 66, 80, 83, 84, 85, 86, 90 и 91) SEQ ID NO: 381 обозначен как X_{Li}, где X_{L3} представляет собой V или Q, X_{L9} представляет собой D, L или S, X_{L12} представляет собой A, S или P, X_{L13} представляет собой A или V, X_{L14} представляет собой S или T, X_{L15} представляет собой L, V или P, X_{L17} представляет собой D или E, X_{L18} представляет собой R или P, X_{L19} представляет собой A или V, X_{L20} представляет собой S или T, X_{L22} представляет собой N, T или S, X_{L31} представляет собой N или Q, X_{L43} представляет собой Q или L, X_{L48} представляет собой Q или K, X_{L49} представляет собой A, P или S, X_{L51} представляет собой K или Q, X_{L66} представляет собой S или D, X_{L80} представляет собой K или T, X_{L83} представляет собой R или S, X_{L84} представляет собой L или V, X_{L85} представляет собой Q или E, X_{L86} представляет собой A или P, X_{L90} представляет собой A или G, X_{L91} представляет собой T или V.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, которые содержат:

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или 374 (MRNKANAYTT) и SEQ ID NO: 11 или 375 (VRDREG RPFAY), соответственно; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 12 или 376 (QSLLNAINQKNF), SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно; или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43, соответственно; и вариабельную область легкой цепи каппа, содержащую 1, 2 или 3 последовательности CDR, представленные как SEQ ID NO: 44 или 377 (QSLQSSSTQKNY), SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 351, 353, 355, 357, 358, 360, 362, 364, 365, 367 и 370; и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 352, 354, 356, 359, 361, 363, 366, 368, 369, 371, 372 и 373.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, дополнительно содержащие одну или более замен или модификаций аминокислотных остатков, но сохраняющие при этом специфическую аффинность связывания с CD276 человека.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, где указанная замена имеет место в одной или более последовательностей CDR и/или в одной или более последовательностей VH или VL, но не в какой-либо из последовательностей CDR.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, дополнительно содержащие константную область иммуноглобулина, возможно константную область Ig человека или возможно константную область IgG человека.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, где константная область содержит константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-16, которые являются химерными.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, которые представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, молекулу одноцепочечного антитела (scFv),

камелизированное однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело и двухвалентное доменное антитело.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или более конъюгатов, возможно где конъюгат ковалентно присоединен либо непосредственно, либо через линкер.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, где указанный конъюгат содержит модифицирующий клиренс агент, химиотерапевтический агент, токсин, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку, фермент-субстратную метку, алкилирующие ДНК агенты, ингибитор топоизомеразы, связывающие тубулин агенты или другие противораковые лекарственные средства.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20, где CD276 получены от человека и возможно где CD276 представляет собой рекомбинантный CD276 или CD276, экспрессирующийся на поверхности клетки.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за один и тот же эпитоп с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-21.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Фармацевтическая композиция по п. 23, дополнительно содержащая второй терапевтический агент, где возможно второй терапевтический агент представляет собой антагонист одной или более иммуноподавляющих молекул.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, где второй терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1 (лиганд 1 белка программируемой гибели клеток), возможно где антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

26. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22.

27. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п. 26.

28. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 27.

29. Способ экспрессирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-22, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 28 в условиях, при которых экспрессируется вектор по п. 27.

30. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, на которого оказывает благоприятное действие модулирование активности CD276, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-22 или фармацевтической композиции по любому из пп. 24-25.

31. Способ по п. 30, где заболевание или состояние представляет собой связанное с CD276 заболевание или состояние.

32. Способ по п. 30, где заболевание или состояние представляет собой рак, заболевание, связанное с адаптивным иммунитетом, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

33. Способ по п. 32, где рак представляет собой опухоль надпочечника, связанный со СПИДом (синдромом приобретенного иммунодефицита) рак, альвеолярную саркому мягких частей, астроцитарную опухоль, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, рак молочной железы, опухоли каротидного тела, рак шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, доброкачественную фиброзную гистиоцитому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную миксоидную хондросаркому, несовершенный фиброгенез кости, фиброзную дисплазию кости, рак желчного пузыря или желчных протоков, рак желудка, гестационную трофобластическую болезнь, герминогенную опухоль, рак головы и шеи,

гепатоцеллюлярную карциному, опухоль островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, лейкоз, липому/доброкачественную липоматозную опухоль, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени, лимфому, рак легкого, медуллобластому, меланому, менингиому, множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярный рак щитовидной железы, опухоль паращитовидной железы, детский рак, опухоль оболочек периферических нервов, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, меланому задней увеальной оболочки, редкое гематологическое расстройство, метастатический рак почки, рабдоидную опухоль, рабдомисаркому, саркому, рак кожи, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, рак яичек, карциному тимуса, тимому, метастатический рак щитовидной железы и рак матки, возможно где рак является химиорезистентным.

34. Способ по п. 32, где заболевание или состояние представляет собой гематологический рак, выбранный из В-клеточных лимфом, возможно лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (MZL), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), синдрома Рихтера, лимфомы Беркитта или фолликулярной лимфомы.

35. Способ по п. 30, где субъект представляет собой человека.

36. Способ по п. 30, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества одного или более терапевтических агентов.

37. Способ по п. 30, где терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, радиационный терапевтический агент, гормональный терапевтический агент, токсин или иммунотерапевтический агент.

38. Способ по п. 37, где указанный второй терапевтический агент представляет

собой антагонист PD-L1, возможно где антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

39. Способ по любому из пп. 30-38, где введение осуществляют путем перорального, назального, внутривенного, подкожного, сублингвального или внутримышечного введения.

40. Способ по пп. 30-39, где указанный способ дополнительно включает проведение одной или более дополнительных терапий рака, выбранных из группы, состоящей из химиотерапии, иммунотерапии, лучевой терапии, гормональной терапии и хирургического вмешательства.

41. Способ модулирования активности CD276 в CD276-экспрессирующей клетке, включающий воздействие на указанную CD276-экспрессирующую клетку антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-22.

42. Способ детектирования наличия или количества CD276 в образце, включающий приведение указанного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-22 и определение наличия или количества CD276 в образце.

43. Способ диагностики связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта, включающий: а) получение образца от субъекта; б) приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-22; в) определение наличия или количества CD276 в образце и д) соотнесение наличия или количества CD276 с наличием или статусом связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта.

44. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-21 в изготовлении лекарственного средства для лечения связанного с CD276 заболевания или состояния у субъекта.

45. Применение по п. 44, где лекарственное средство дополнительно содержит второй терапевтический агент, возможно где второй терапевтический агент представляет собой антагонист одной или более иммуноподавляющих молекул.

46. Применение по п. 45, где указанный второй терапевтический агент представляет собой антагонист PD-L1, возможно где антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

47. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-22 в изготовлении диагностического реагента для диагностики связанного с CD276 заболевания или состояния.

48. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22, полезный для обнаружения CD276, возможно рекомбинантного CD276, CD276, экспрессирующегося на поверхности клетки, или CD276-экспрессирующих клеток.

49. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен TCR (Т-клеточный рецептор), где указанный антигенсвязывающий домен специфично связывается с CD276 и содержит антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22.

50. CAR по п. 49, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv.

51. CAR по п. 49 или 50, который является биспецифичным.

52. CAR по п. 51, где указанный CAR способен дополнительно специфически связываться со вторым антигеном, отличным от CD276, или вторым эпитопом на CD276.

53. CAR по п. 52, где указанный второй антиген представляет собой опухолевый антиген.

54. CAR по п. 49, где сигнальный домен TCR выбран из группы, состоящей из: последовательности внутриклеточных сигнальных областей CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLR или их комбинации.

55. CAR по п. 49, где трансмембранная область содержит трансмембранную область CD3, CD4, CD8 или CD28.

56. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный

рецептор (CAR) по любому из пп. 49-55.

57. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п. 56.

58. Клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR по любому из пп. 49-55.

59. Клетка по п. 58, где указанная клетка представляет собой иммунную клетку, возможно где указанная иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, НК-клетку, моноцит, макрофаг или НКТ-лимфоцит.

60. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по п. 56.

61. Способ стимулирования опосредованного Т-клетками иммунного ответа на CD276-экспрессирующую клетку или ткань у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR по любому из пп. 49-55.

62. Способ лечения млекопитающего, имеющего связанное с CD276 заболевание или состояние, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки по п. 57 или п. 58 с обеспечением тем самым лечения указанного млекопитающего.

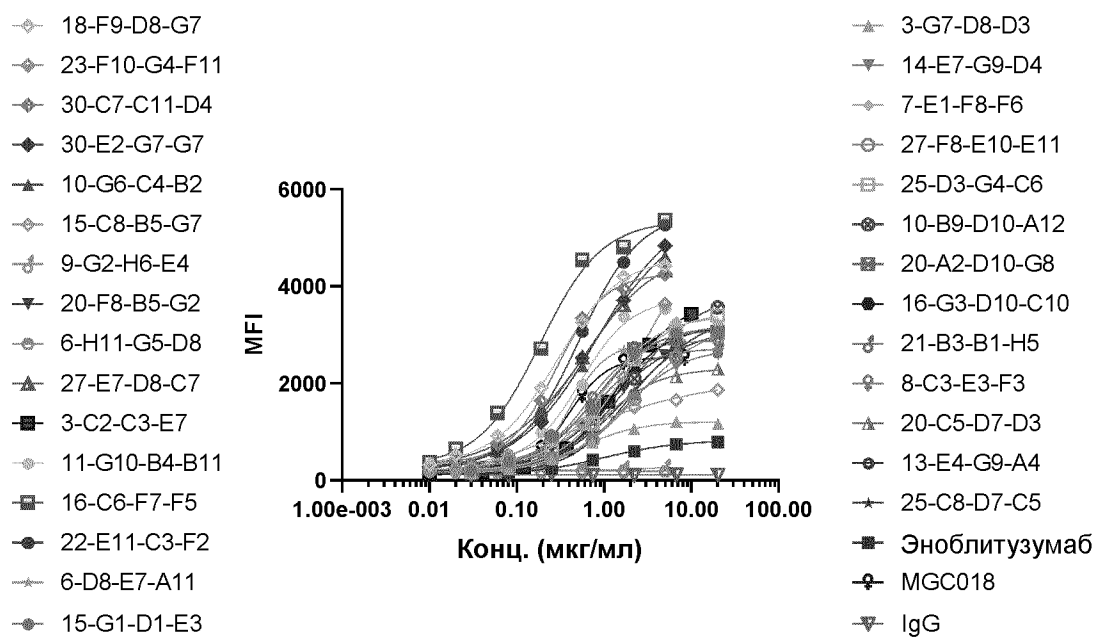
63. Способ по п. 62, где клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

64. Способ по п. 62, где связанное с CD276 заболевание или состояние представляет собой рак.

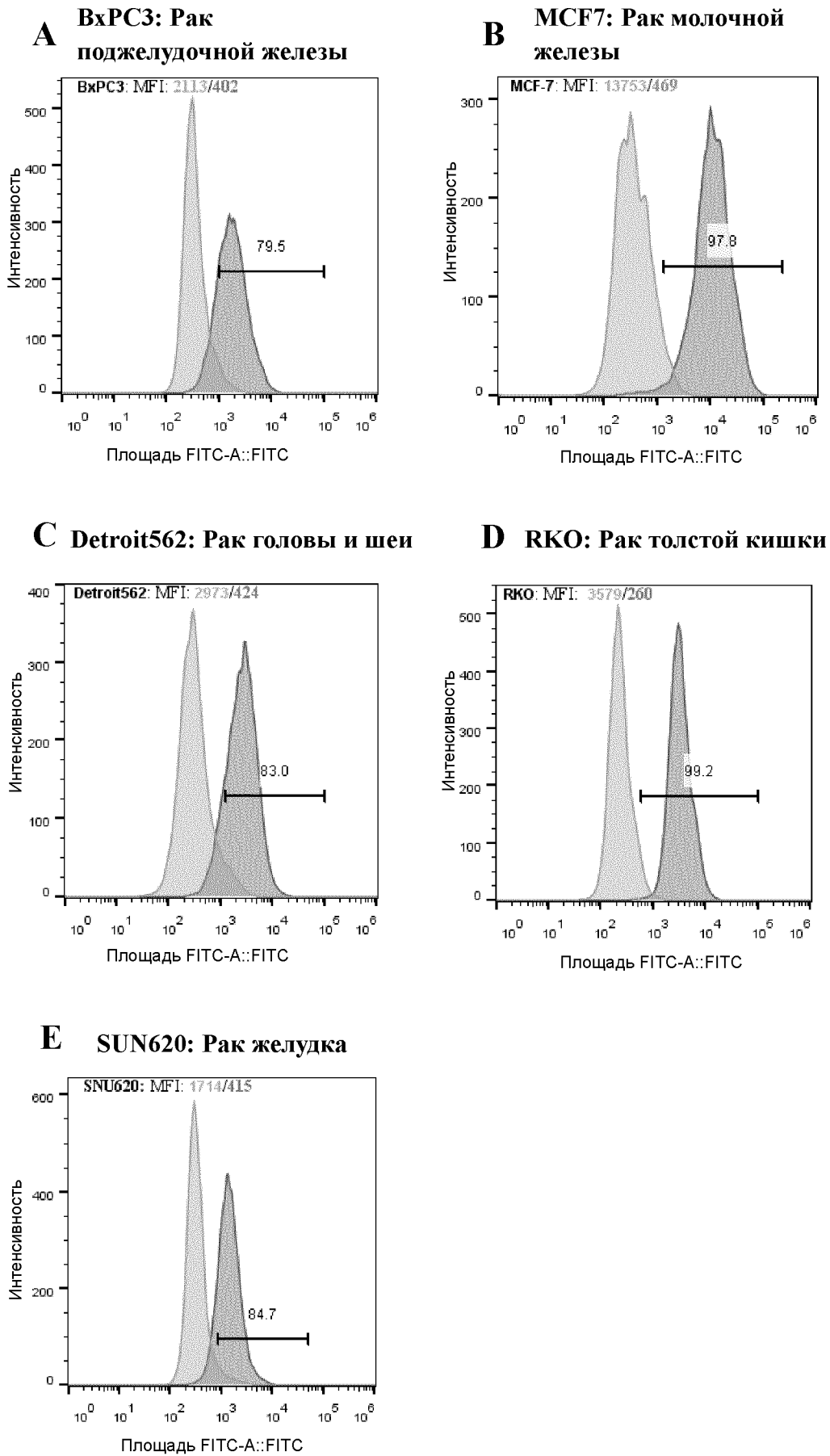
65. Способ по п. 62, где млекопитающее представляет собой субъекта-человека.

66. Применение клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR по любому из пп. 49-55, в изготовлении лекарственного средства для стимулирования опосредованного Т-клетками иммунного ответа на CD276-экспрессирующую клетку или ткань у млекопитающего.

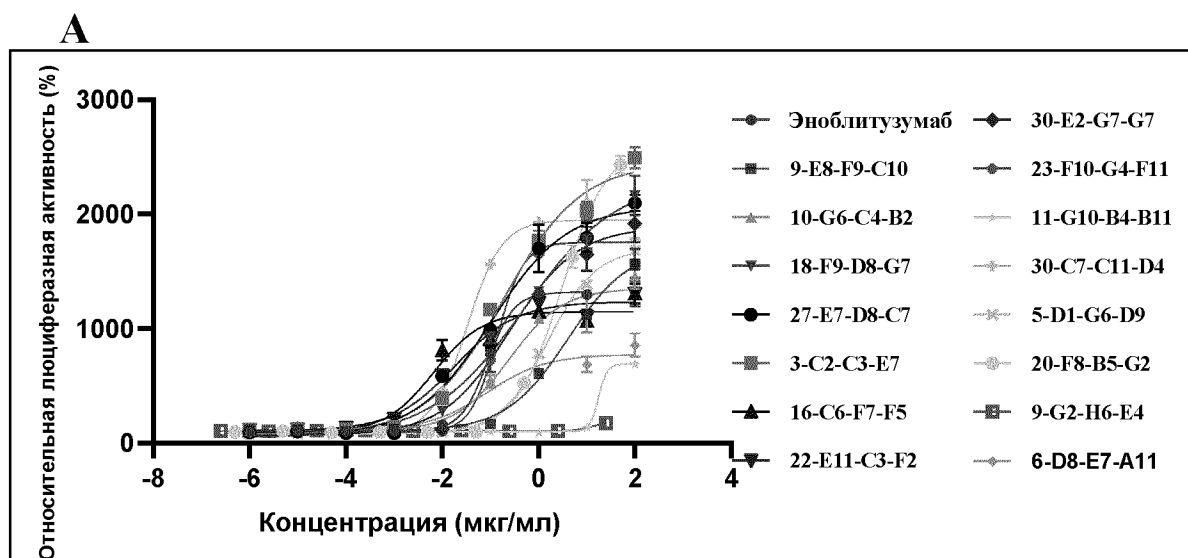
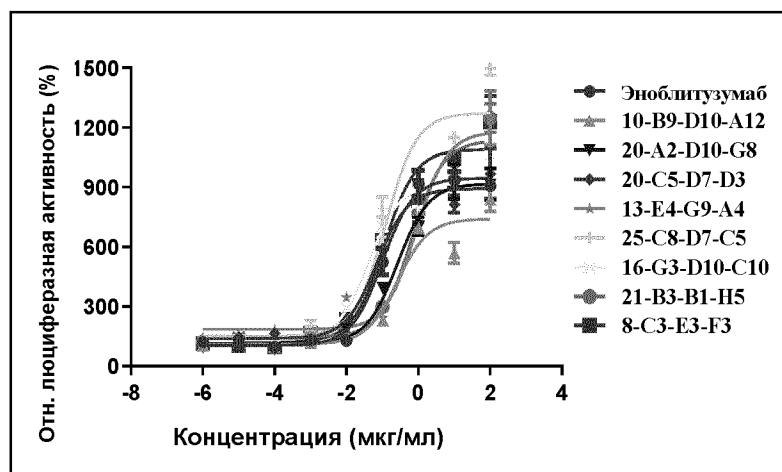
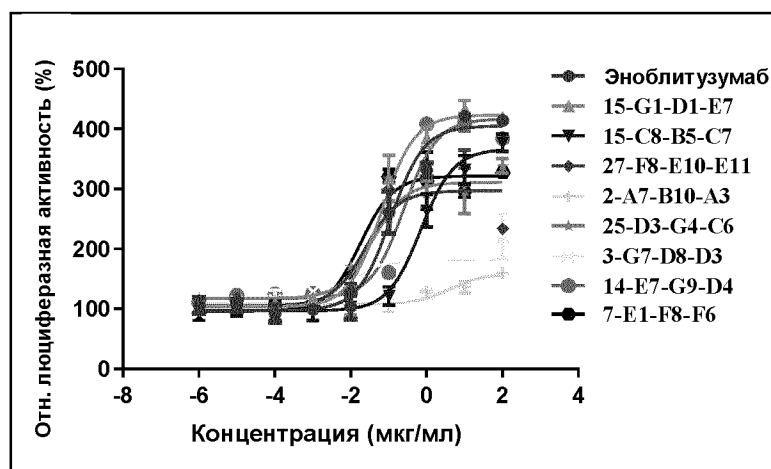
67. Применение клетки по п. 57 или п. 58 в изготовлении лекарственного средства для лечения млекопитающего, имеющего связанное с CD276 заболевание или состояние.



Фиг. 1

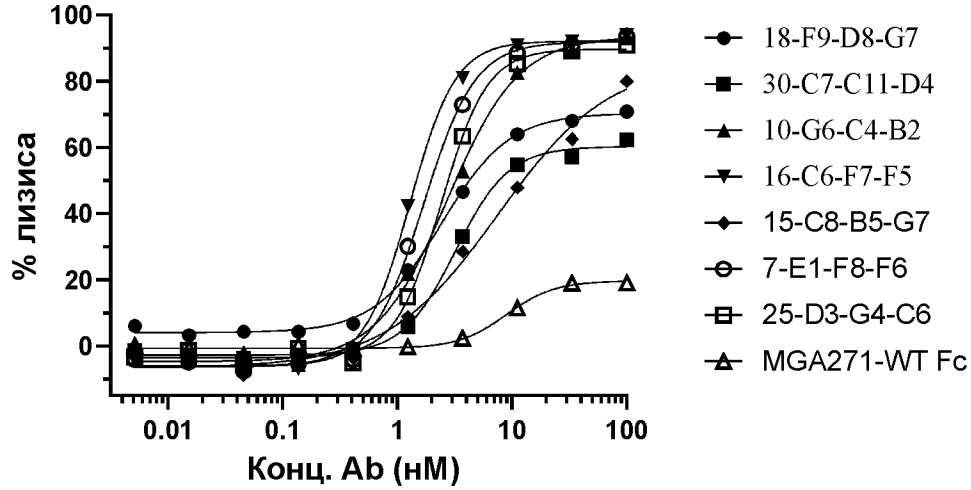


Фиг. 2

**B****C**

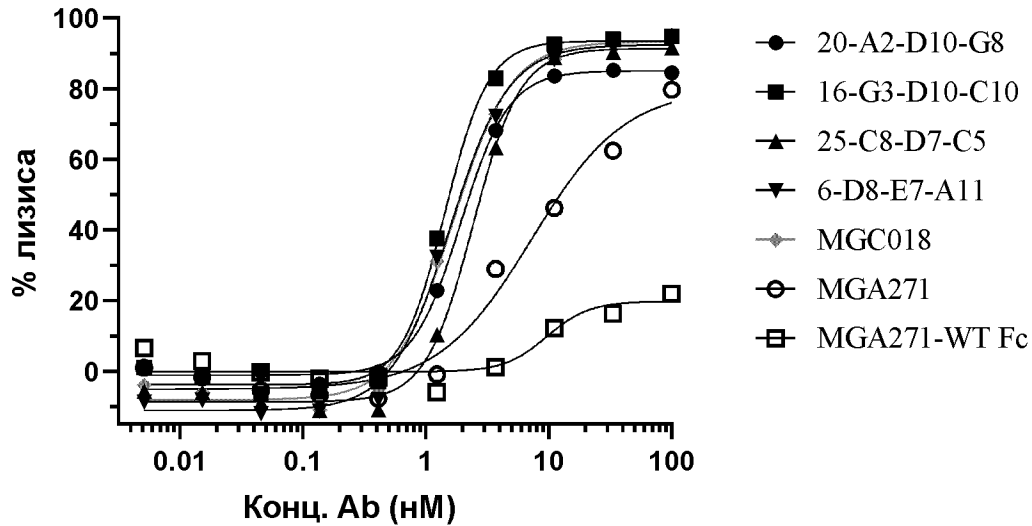
Фиг. 3

А Анализ CDC на клетках CHO-S-CD276



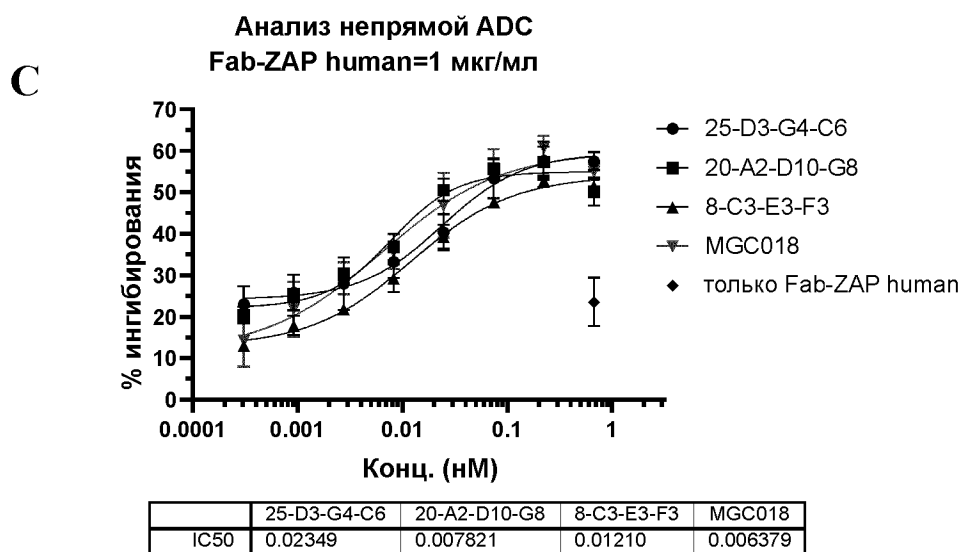
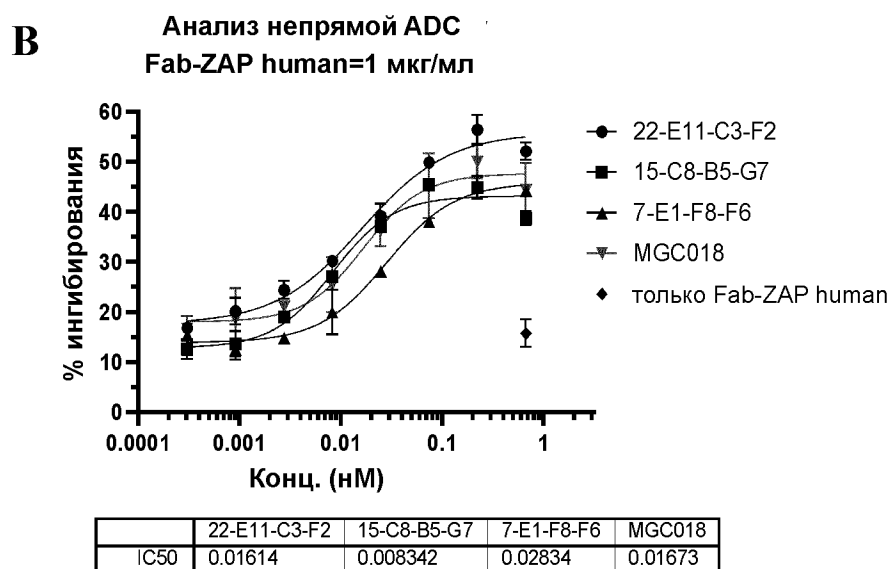
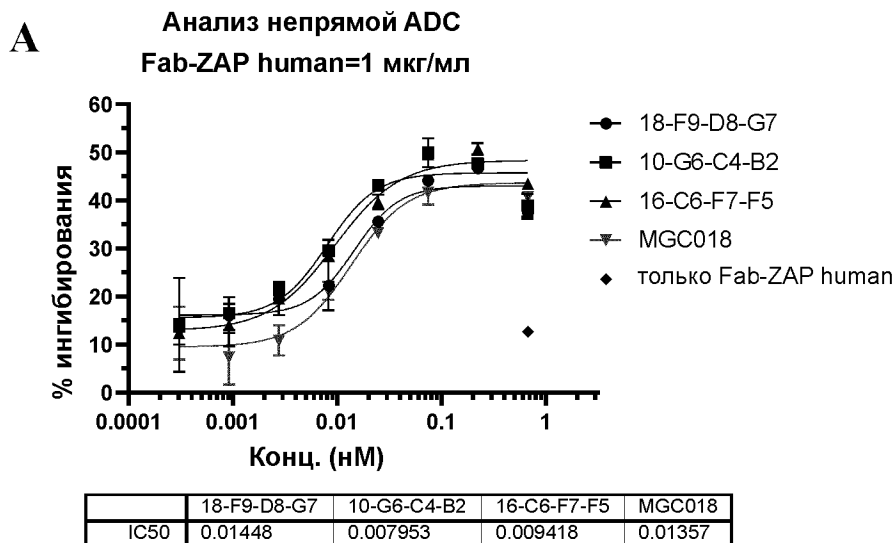
	18-F9-D8-G7	30-C7-C11-D4	10-G6-C4-B2	16-C6-F7-F5	15-C8-B5-G7	7-E1-F8-F6	25-D3-G4-C6	MGA271-WT Fc
EC50	2.441	3.215	2.738	1.284	7.537	1.690	2.413	8.913

В Анализ CDC на клетках CHO-S-CD276



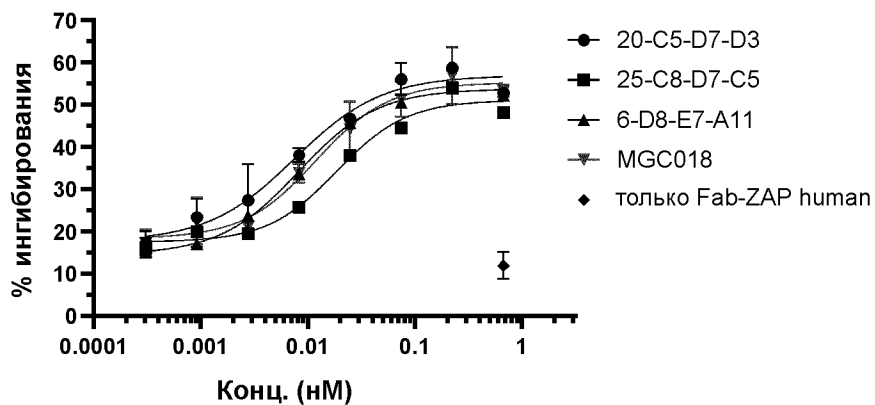
	20-A2-D10-G8	16-G3-D10-C10	25-C8-D7-C5	6-D8-E7-A11	MGC018	MGA271	MGA271-WT Fc
EC50	1.922	1.428	2.417	1.575	1.672	7.280	9.640

Фиг. 4



D

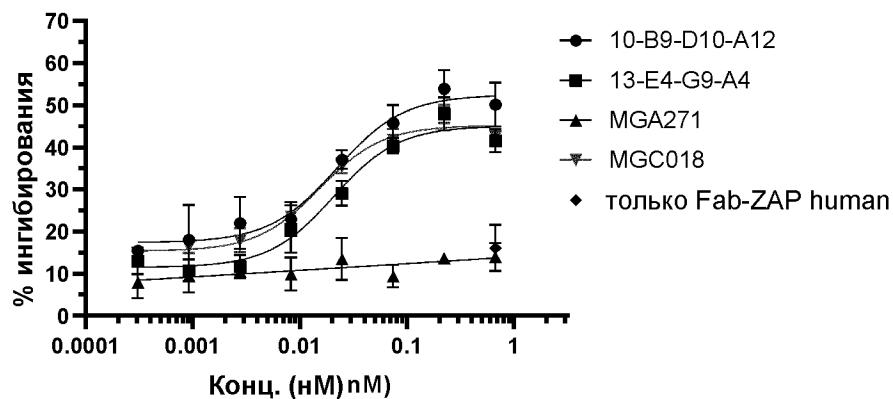
Анализ непрямой ADC
Fab-ZAP human=1 мкг/мл



	20-C5-D7-D3	25-C8-D7-C5	6-D8-E7-A11	MGC018
IC50	0.007500	0.01856	0.008119	0.01182

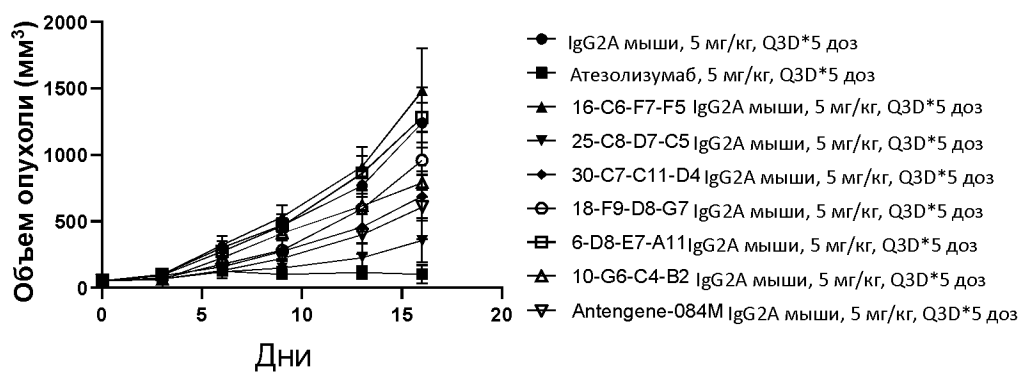
E

Анализ непрямой ADC
Fab-ZAP human=1 мкг/мл

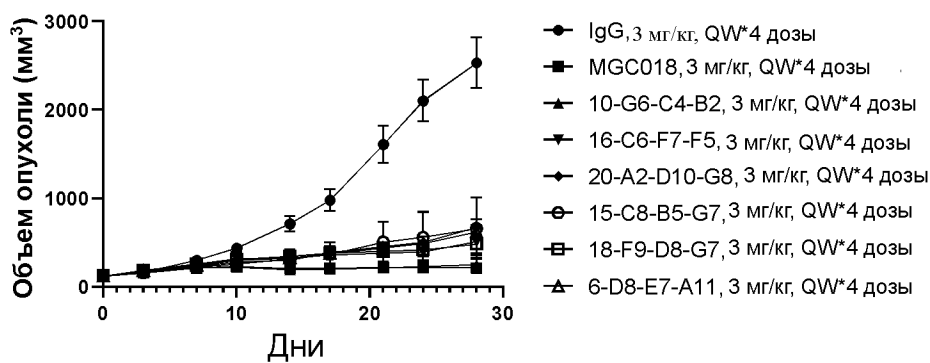


	10-B9-D10-A12	13-E4-G9-A4	MGA271	MGC018
IC50	0.02185	0.02053	2.114e+090	0.01522

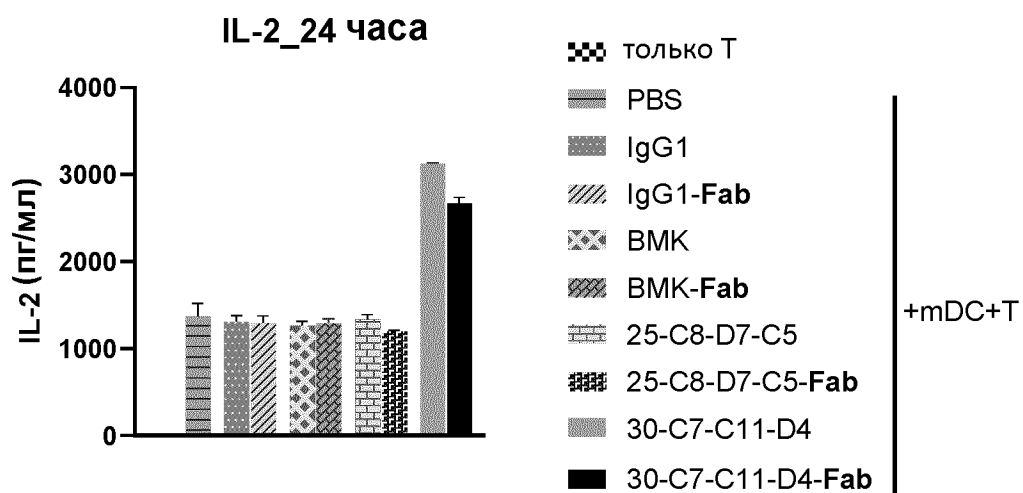
Фиг. 5



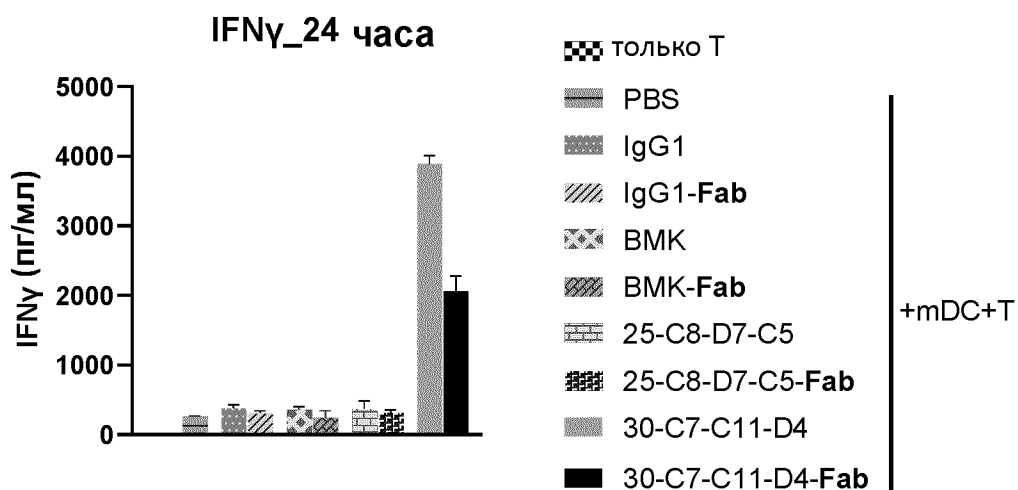
Фиг. 6



Фиг. 7



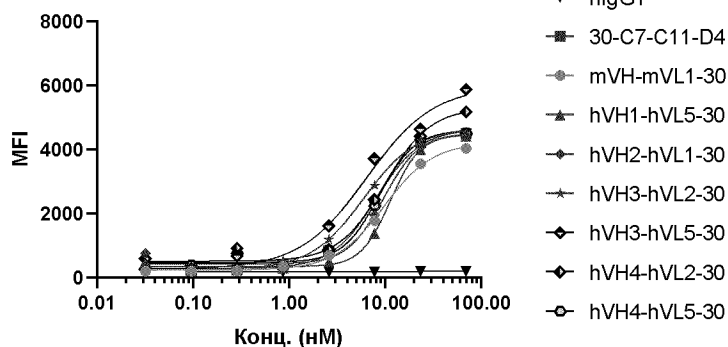
Фиг. 8



Фиг. 9

Аффинность связывания с линией клеток SKOV3

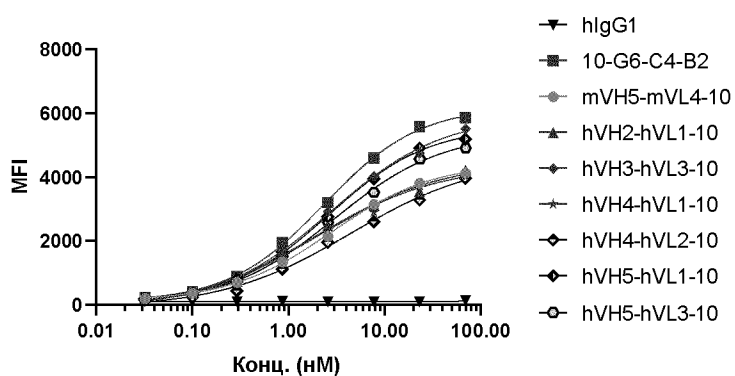
SKOV3



	mVH-mVL1-30	hVH1-hVL5-30	hVH2-hVL1-30	hVH3-hVL2-30	hVH3-hVL5-30	hVH4-hVL2-30	hVH4-hVL5-30	30-C7-C11-D4
EC50	9.636	11.26	9.508	5.932	6.365	9.773	8.516	7.978

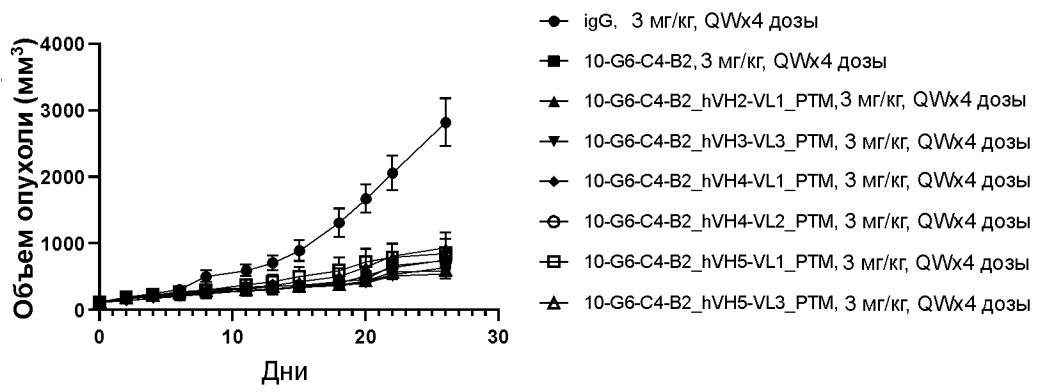
Фиг. 10

Аффинность связывания с линией клеток SKOV3



	mVH5-mVL4-10	hVH2-hVL1-10	hVH3-hVL3-10	hVH4-hVL1-10	hVH4-hVL2-10	hVH5-hVL1-10	hVH5-hVL3-10	10-G6-C4-B2
EC50	2.756	1.922	2.748	1.902	4.430	2.629	2.978	2.330

Фиг. 11



Фиг. 12