

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490487

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.20

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

(22) Дата подачи заявки
2022.09.16

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ D3 МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/CN2021/119011

(32) 2021.09.17

(33) CN

(86) PCT/CN2022/119334

(87) WO 2023/041041 2023.03.23

(71) Заявитель:

УСИ БАЙЛОДЖИКС АЙРЛЕНД
ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:

Чэнь Юньин, Чэн Юнцин, Ван Ся, Гу
Цзице (CN)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены связывающие D3 молекулы, включая антитела к D3, и их применение.

Антитела WT156-P3R2 Иллюстративные домены VH1

Kabat	1	10	22	31--35	40	50--a-----60---65
AbM	1	10	22	26-----35	40	50--a-----58 65
Chothia	1	10	22	26---32	40	a-55 65
Contact	1	10	22	30---35	40	47-----a---58 65
IMGT	1	23	27---38 41			56-----65 74
IC2	EVQLVESGGGLVQTGDSLRISCAAS GLTFSTATVGF WFRQAPGKERDLIA AIP-AYYSTYIYASVKG					
IC2-z102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GLTFSTATVGF WFRQAPGKERDLIA AIP-AYYSTYIYASVKG					
IC2-z109	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GLTFSTATVGF WFRQAPGKERDLIA AIP-AYYSTYIYASVKG					
IC9	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRITTSRYAMV WFRQAPGKEREFVQ GNSAHDGRSAYASVKG					
IH6	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRITTSRYAMV WFRQAPGKEREFVQ AISMIGGGTYIYASVKG					
IH6-z100	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRITTSRYAMV WFRQAPGKEREFVQ AISMIGGGTYIYASVKG					
IH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRITTSRYAMV WFRQAPGKEREFVQ GNSAHDGRSAYASVKG					
Kabat	70	80 abc	90	95-----102	110	
AbM	70	80 abc	90	95-----102	110	
Chothia	70	80 abc	90	96-----101	110	
Contact	70	80 abc	90	93-----101	110	
IMGT	75	89	105-----117			
IC2	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTQVTSS					
IC2-z102	RFTISRDNKNSVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTMVTSS					
IC2-z109	RFTISRDNKNSVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTMVTSS					
IC9	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTQVTSS					
IH6	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTQVTSS					
IH6-z100	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTMVTSS					
IH1	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPDDTAVYYCAA DDTSPSPSPFY---KH RGGQTQVTSS					

202490487

A1

A1

202490487

СВЯЗЫВАЮЩИЕ D3 МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по международной заявке на патент № PCT/CN2021/119011, поданной 17 сентября 2021 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Эта заявка включает посредством ссылки перечень последовательностей, представленный вместе с этой заявкой.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данная заявка в целом относится к молекулам, связывающим дельта-подобный канонический Notch-лиганд 3 (D3), включая антитела к D3, и их применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Дельта-подобный канонический Notch-лиганд 3 (D3 или DLL3) представляет собой трансмембранный белок типа I, принадлежащий к семейству Notch-лигандов DSL. Как правило, он экспрессируется исключительно на внутриклеточных мембранах, особенно в аппарате Гольджи. Дополнительные лиганды семейства Notch включают дельта-подобный канонический Notch-лиганд 1 (D1), дельта-подобный канонический Notch-лиганд 4 (D4), канонический Notch-лиганд Jagged 1 (J1) и канонический Notch-лиганд Jagged 2 (J2). За исключением D3, другие лиганды могут активировать сигналинг Notch. D3 действует как ингибитор сигналинга Notch, вмешиваясь в связывание Notch и его лигандов. D3 экспрессируется на высоком уровне на поверхности клеток опухолей легких, включая мелкоклеточный рак легкого (SCLC) и крупноклеточную нейроэндокринную карциному (LCNEC). Хотя D3, как правило, экспрессируется исключительно на внутриклеточных мембранах, он является потенциальной терапевтической мишенью для любых опухолей, экспрессирующих D3, включая SCLC и LCNEC.

Рак легкого является наиболее распространенной причиной смерти от рака, и каждый год в мире рак легкого диагностируется примерно у 2 миллионов человек; около 15% всех случаев рака легкого составляют SCLC, который является наиболее агрессивной формой рака легкого с очень ограниченными терапевтическими возможностями для лечения: хирургическим вмешательством, химиотерапией и лучевой терапией. В 2019 году FDA одобрило атезолизумаб (анти-PD-L1) в качестве первой линии лечения SCLC, а ограниченный 2-месячный эффект подчеркивает необходимость разработки дополнительных терапевтических средств.

По-прежнему существует потребность в поиске новых агентов, нацеленных на D3,

включая связывающие D3 молекулы, такие как моноклональные антитела, для применения, в том числе в качестве конъюгатов антител, таких как ADC, или биспецифических антител, а также для разработки терапии на основе CAR-T-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к соединениям, способам, композициям и промышленным изделиям, которые обеспечивают связывающие D3 молекулы с повышенной эффективностью. Преимущества, обеспечиваемые настоящим изобретением, широко применимы в области терапии и диагностики антителами и могут применяться в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как антитела, которые взаимодействуют с различными мишенями.

Настоящее изобретение относится к связывающим D3 молекулам, таким как моноклональные антитела, которые могут специфически связываться с D3 человека и перекрестно реагировать с D3 яванского макака и/или мыши. Такие связывающие D3 молекулы обеспечивают определенные преимущества по сравнению с агентами, композициями и/или способами, используемыми в настоящее время и/или известными в данной области техники. Эти преимущества включают эффективность интернализации, улучшенные терапевтические и фармакологические свойства, повышенную специфичность, улучшенный профиль безопасности, пониженную иммуногенность и другие полезные свойства, такие как улучшенная простота получения или более низкая стоимость продукции, более высокая стабильность, особенно по сравнению с потенциальными лекарственными средствами, уже известными в данной области техники.

В настоящем изобретении разработаны связывающие D3 молекулы, такие как моноклональные антитела к D3, которые можно использовать для лечения опухоли, сверхэкспрессирующей D3.

Настоящее изобретение относится к связывающим D3 молекулам, кодирующим их молекулам нуклеиновой кислоты, векторам экспрессии и клеткам-хозяевам, используемым для экспрессии связывающих D3 молекул, а также способам применения связывающих D3 молекул. Связывающие D3 молекулы по настоящему изобретению представляют собой мощные агенты для лечения множества злокачественных новообразований (включая рак легкого) посредством модуляции иммунной функции человека.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена связывающая D3 молекула, содержащая по меньшей мере один одиночный варибельный домен иммуноглобулина (например, домен VH), который специфически связывается с D3, таким как D3 человека, D3 яванского макака и/или DLL-3 мыши. В некоторых вариантах осуществления одиночный варибельный домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3, и при

этом:

CDR1 включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 4, 7 или 10;

CDR2 включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, 5, 8 или 11; и

CDR3 включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9.

В некоторых вариантах осуществления одиночный варибельный домен, описанный в данном документе, содержит:

(A) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 1; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 2; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 3;

(B) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 4; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 5; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 6;

(C) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 7; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 8; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 9; или

(D) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 10; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 11; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления одиночный варибельный домен, описанный в данном документе, содержит:

(A) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 27; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 28 или 56; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 29;

(B) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 38; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 39; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40; или

(C) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 49; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 50; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 51;

при этом нумерация CDR соответствует системе нумерации Contact.

В некоторых вариантах осуществления одиночный варибельный домен, описанный в данном документе, содержит:

(A) аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55;

(B) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55, однако специфическая аффинность связывания с D3 сохраняется (например, существенно сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере

95%); или

(С) аминокислотную последовательность с добавлением, удалением и/или заменой одной или более (например, 1, 2 или 3) аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55, однако специфическая аффинность связывания с D3 сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%).

В некоторых вариантах осуществления связывающие D3 молекулы, описанные в данном документе, имеют одну или более замен, добавлений и/или удалений аминокислот в каркасных областях, например, FRW1, FRW2, FRW3 и/или FRW4 одиночного переменного домена (например, VHH). В некоторых вариантах осуществления FRW1 на N-конце и/или FRW4 на C-конце одиночного переменного домена укорочена, например укорочена не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту(аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления одиночный переменный домен (например, VHH) содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55.

В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, дополнительно содержит один или более константных доменов IgG человека, таких как один или более константных доменов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константный домен IgG представляет собой константный домен IgG1 человека или его вариант. Пример аминокислотной последовательности константных доменов IgG1 указан в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула содержит вариант одного или более константных доменов IgG1 человека, например IgG1 Fc с заменами L234A/L235A, согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, имеет одно или более из следующих свойств:

(а) связывается с D3 человека, D3 яванского макака и/или D3 мыши с EC50 на уровне нМ по данным ELISA или FACS;

(b) демонстрирует дозозависимую эффективность интернализации в клетках, экспрессирующих D3 человека; и

(с) связывается с D3 человека с KD не более 0,1 нМ по данным SPR.

В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления

связывающая D3 молекула представляет собой димер.

В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, содержит один переменный домен, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55, и константные домены IgG, указанной в SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающую D3 молекулу, описанную в данном документе, такую как связывающая D3 молекула, содержащая одиночный переменный домен (например, VHH).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии или молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей связывающую D3 молекулу, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения связывающей D3 молекулы, который включает экспрессию связывающей D3 молекулы в клетке-хозяине, как описано в данном документе, и выделение связывающей D3 молекулы из клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу модуляции связывающего D3 иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту связывающей D3 молекулы, как описано в данном документе, так что модулируется связывающий D3 иммунный ответ у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения положительного по D3 или сверхэкспрессирующего D3 злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества связывающей D3 молекулы или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак легкого, включая, например, SCLC и LCNEC.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе, при производстве лекарственного препарата для диагностики, лечения или предотвращения положительного по D3 злокачественного новообразования.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена

связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, для применения в диагностике, лечении или предотвращении положительного по D3 злокачественного новообразования.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к наборам или устройствам и связанным с ними способам, в которых используется связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, или фармацевтические композиции, описанные в данном документе.

Вышеизложенное является кратким описанием сущности изобретения и, таким образом, по необходимости содержит упрощения, обобщения и упущения деталей; следовательно, специалисты в данной области техники поймут, что краткое описание сущности изобретения носит исключительно иллюстративный характер и не предназначено для каких-либо ограничений. Другие аспекты, особенности и преимущества связывающих молекул, способов, композиций и/или устройств и/или других объектов изобретения, описанных в данном документе, станут очевидными из изложенных в данном документе идей. Краткое описание сущности изобретения предоставлено для того, чтобы в упрощенной форме представить выбор концепций, которые дополнительно описаны ниже в подробном описании сущности изобретения. Настоящее краткое описание сущности изобретения не предназначено для указания ключевых или существенных признаков заявляемого объекта изобретения, а также его не следует рассматривать, как ограничивающее объем заявляемого объекта изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показаны иллюстративные результаты связывания антител с иммобилизованным WT115-hPro1.ECD.hi по данным ELISA.

На Фиг. 2a и 2b показаны иллюстративные результаты связывания антител с клетками WT115-293F.hPro1.2E5 по данным FACS.

На Фиг. 3a и 3b показаны иллюстративные результаты связывания антител с клетками WT115-Flpin293.cPro1.pool по данным FACS.

На Фиг. 4a и 4b показаны иллюстративные результаты связывания антител с иммобилизованным WT115-MBP-mPro1.ECD.hFc по данным ELISA.

На Фиг. 5a и 5b показаны иллюстративные результаты интернализации антител клетками WT115-293F.hPro1.2E5.

На Фиг. 6a-6d показаны иллюстративные результаты связывания эпитопов антителами на иммобилизованном WT115-hPro1.ECD.his с помощью ELISA. Фиг. 6a, специфическая сортировка на основе WT1156-P3R2-1C2-uIgG1; Фиг. 6b, специфическая сортировка на основе WT1156-P3R2-1H6-uIgG1; Фиг. 6c, специфическая сортировка на основе WT1156-P8R2-1H1-uIgG1; Фиг. 6d, специфическая сортировка на основе WT115-BMK1.

На Фиг. 7а показаны иллюстративные результаты связывания антител с растворимым WT115-hPro1.ECD.his или укороченными белками методом ELISA. На Фиг. 7b показано связывание антител с иммобилизованными WT115-hPro1.ECD.his или усеченными белками методом ELISA. На Фиг. 7с показаны диаграммы для укороченного белка.

На Фиг. 8 показаны иллюстративные результаты связывания антител с D1 человека и D4 человека в пределах семейства по данным ELISA.

На Фиг. 9 показаны иллюстративные результаты исследований на стабильность WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 в сыворотке.

На Фиг. 10 показано выравнивание иллюстративных одиночных варибельных доменов иммуноглобулина WT1156-P3R2-1C2 (1C2), WT1156-P3R2-1C2-z102 (1C2-z102), WT1156-P3R2-1C2-z109 (1C2-z109), WT1156-P3R2-1C9 (1C9), WT1156-P3R2-1H6 (1H6), WT1156-P3R2-1H6-z100 (1H6-z100), и WT1156-P8R2-1H1 (1H1). Границы CDR определены согласно нумерациям Kabat, AbM, Chothia, Contact, и IMGT.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хотя настоящее изобретение может быть осуществлено во многих различных формах, в данном документе описаны конкретные иллюстративные варианты его осуществления, которые иллюстрируют принципы изобретения. Следует подчеркнуть, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными проиллюстрированными вариантами осуществления. Более того, любые заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения.

Если здесь не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с данной заявкой, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Более конкретно, использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на «белок» включает множество белков; ссылка на «клетку» включает смеси клеток и т.п. В настоящей заявке использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, использование термина «содержащий», а также других форм, таких как «содержит» и «содержащий», не является ограничивающим. Кроме того, диапазоны, представленные в описании и прилагаемой формуле изобретения, включают как конечные точки, так и все точки между конечными точками.

В общем, номенклатура, используемая в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, а также гибридизацией и их методиками, описанными в данном документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Способы и методики по настоящему изобретению обычно выполняются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. См., например, Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th ed., W.B. Saunders Company (2010); Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); и Coligan *et al.*, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Номенклатура, используемая в связи с описанными в данном документе лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, хорошо известна и широко используется в данной области техники.

Определения

Для лучшего понимания данного изобретения ниже приводятся определения и пояснения соответствующих терминов.

Термины «антитело» (например, антитело к D3) и «антигенсвязывающая молекула» (например, связывающая D3 молекула) используются взаимозаменяемо в самом широком смысле и охватывают любую форму антитела, которая проявляет желаемую биологическую или связывающую активность. Оно охватывает, помимо прочего, гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела, химерные антитела и однодоменные антитела (sdAb, содержащие только одну цепь, которая, как правило, аналогична тяжелой цепи), а также фрагменты любого из вышеперечисленных антител, если они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность, включая, например, антитело, содержащее по меньшей мере один домен V_H. Стандартное антитело содержит тяжелую цепь(-и) и легкую цепь(-и). Тяжелые цепи можно разделить на μ , δ , γ , α и ϵ , которые определяют изотипы антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Тяжелая цепь может содержать переменную область тяжелой цепи (V_H) и константную область тяжелой цепи (C_H). Тяжелая цепь может содержать одну или более константных областей, например, 3

константные области (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Легкая цепь может содержать переменную область легкой цепи (V_L) и константную область легкой цепи (C_L). Область V_H и V_L можно дополнительно разделить на гиперпеременные области (называемые определяющими комплементарность областями (CDR)), которые разделены относительно консервативными областями (называемыми каркасными областями (FRW)). V_H и V_L могут содержать 3 CDR (определяющие комплементарность области) и 4 FR (каркасные области) в следующем порядке: FRW1, CDR1, FRW2, CDR2, FRW3, CDR3, FRW4 от N-конца к C-концу. Антитела могут относиться к различным изотипам антител, например, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или подтип IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Термин «область Fc» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, области Fc с нативной последовательностью, рекомбинантные области Fc и варианты областей Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут различаться, область Fc тяжелой цепи IgG человека часто определяют как участок от аминокислотного остатка в положении Cys226 (согласно системе нумерации EU) или от Pro230 (согласно системе нумерации EU) до его карбоксильного конца. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела.

«Функциональная область Fc» обладает «эффекторной функцией» области Fc с нативной последовательностью. Примеры «эффекторных функций» включают связывание C1q; комплементзависимая цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора, BCR) и т. д. Такие эффекторные функции, как правило, требуют, чтобы область Fc была объединена со связывающей областью или связывающим доменом (например, переменной областью или доменом антитела, включая домен VH1) и могут быть оценены с использованием различных анализов, как описано.

Область Fc с нативной последовательностью содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc природного происхождения, не подвергнутой манипуляции, модификации и/или изменению (например, выделению, очистке, отбору, включению или объединению с другими последовательностями, такими как последовательности переменной области) человеком. Области Fc человека с нативной последовательностью включают область Fc

человеческого IgG1 с нативной последовательностью (аллотипы не А и А); область Fc человеческого IgG2 с нативной последовательностью; область Fc человеческого IgG3 с нативной последовательностью; и область Fc человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

«Вариант области Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от области Fc с нативной последовательностью посредством по меньшей мере одной аминокислотной модификации (например, замены, добавления или удаления), предпочтительно одной или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариант области Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с областью Fc с нативной последовательностью или областью Fc исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в области Fc с нативной последовательностью или в области Fc исходного полипептида. Вариант области Fc может иметь по меньшей мере около 80% гомологии с нативной последовательностью области Fc и/или с областью Fc исходного полипептида, или по меньшей мере около 90% гомологии с ними, например, по меньшей мере около 95% гомологии с ними. Вариант области Fc, описанный в данном документе, может быть лишена эффекторной функции (например, сайлентная Fc).

Антитела, описанные в данном документе, включают, помимо прочего, синтетические антитела, моноклональные антитела, антитела, полученные рекомбинантным путем, полиспецифические антитела (например, включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, интратела, одноцепочечные Fv (scFv) (например, включая моноспецифические, биспецифические и т.д.), верблюжьи антитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных.

Термин «одиночный вариабельный домен иммуноглобулина», или «одиночный вариабельный домен», или «домен VHH», или «VHH», или «вариабельный домен антитела, содержащего только тяжелые цепи» может использоваться в данном документе взаимозаменяемо и относится к одноцепочечному антигенсвязывающему домену, который способен связываться с антигеном или эпитопом независимо от другого вариабельного домена. Домен VHH (например, вариабельный домен антитела, содержащего только тяжелые цепи) 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)). Домен VHH может представлять собой

человеческий домен, но также включает один домен других видов, например, домены V_HH грызунов, акулы-няньки и верблюдовых. V_HH верблюдовых представляет собой полипептиды с одиночным вариабельным доменом иммуноглобулина, полученные от таких видов, как верблюд, лама, альпака, дромедара и гуанако, которые продуцируют антитела, содержащие только тяжелые цепи, естественно лишённые легких цепей. Такие домены V_HH могут быть гуманизированы в соответствии со стандартными методами, доступными в данной области техники, и считаются «однодоменными антителами». В контексте данного документа V_HH включает домены V_HH верблюдовых и гуманизированные домены V_HH.

Термин «гуманизированное антитело» предназначен для обозначения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, лама или альпака, были трансплантированы в человеческие каркасные последовательности. В каркасных последовательностях человека могут быть произведены дополнительные модификации каркасных областей.

Термин «K_a» в контексте данного документа относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «K_d» в контексте данного документа относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Значения K_d для антител можно определить с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. В контексте данного документа термин «K_D» предназначен для обозначения константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, которая получается из отношения K_d к K_a (например, K_d/K_a) и выражается в виде молярной концентрации (M). Предпочтительным методом определения K_d антитела является применение поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно применение биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

В контексте данного документа термин «специфическое связывание» или «специфически связывается» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, например, между антителом и антигеном.

В контексте данного документа термин «высокая аффинность» относится к связывающей D3 молекуле, такой как антитело, имеющее K_D 1×10^{-7} M или менее, более предпочтительно 5×10^{-8} M или менее, еще более предпочтительно 1×10^{-8} M или менее, еще более предпочтительно 5×10^{-9} M или менее и еще более предпочтительно 1×10^{-9} M или менее в отношении целевого антигена.

В контексте данного документа термин «EC₅₀», который также называется «полумаксимальной эффективной концентрацией», относится к концентрации лекарственного средства, антитела или токсиканта, которая равна половине между

исходной и максимальной, после определенного времени экспозиции. В контексте данного документа EC_{50} выражается в единицах «нМ».

В контексте данного документа термин «эпитоп» относится к части антигена, с которой специфически связывается иммуноглобулин или антитело. «Эпитоп» также известен как «антигенная детерминанта». Эпитоп или антигенная детерминанта, как правило, содержат химически активные поверхностные группы молекулы, такие как аминокислоты, углеводы или боковые цепи сахаров, и, как правило, имеют специфическую трехмерную структуру и специфические зарядовые характеристики. Например, эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной стерической конформации, которая может быть «линейной» или «конформационной». См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все сайты взаимодействия между белком и молекулой взаимодействия (например, антителом) присутствуют линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе сайты взаимодействия охватывают аминокислотные остатки, которые в белке отделены друг от друга. Антитела можно подвергать скринингу в зависимости от конкурентоспособности связывания с одним и тем же эпитопом обычными методиками, известными специалисту в данной области техники. Например, исследования конкуренции или перекрестной конкуренции могут быть проведены для получения антител, которые конкурируют или перекрестно конкурируют друг с другом за связывание с антигенами. Высокопроизводительные способы получения антител, связывающихся с одним и тем же эпитопом, основанные на их перекрестной конкуренции, описаны в международной заявке на патент WO 03/48731.

В контексте данного документа термин «выделенное антитело» предназначен для обозначения антитела, которое по существу не содержит другие антитела, имеющие другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает белок D3, по существу не содержит антитела, которые специфически связывают антигены, отличные от белков D3). Однако выделенное антитело, которое специфически связывает белок D3 человека, может обладать перекрестной реактивностью к другим антигенам, таким как белки D3 других видов. Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

В контексте данного документа термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть встроен полинуклеотид. Если вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого встроенным в него полинуклеотидом,

такой вектор называют вектором экспрессии. Вектор может нести элементы генетического материала, экспрессируемые в клетке-хозяине путем трансформации, трансдукции или трансфекции в клетку-хозяина. Векторы хорошо известны специалисту в данной области техники, включая, помимо прочего, плазмиды, фаги, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или полученная из P1 искусственная хромосома (PAC); фаг, такой как фаг λ или фаг M13, и вирус животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, помимо прочего, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (такой как вирус простого герпеса), вирус оспы, бакуловирус, папилломавирус, паповавирус (например, SV40). Вектор может содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая, помимо прочего, последовательность промотора, последовательность инициации транскрипции, энхансерную последовательность, элемент селекции и репортерный ген. Кроме того, вектор может содержать точку начала репликации.

В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую может быть введен вектор, включая, помимо прочего, прокариотическую клетку, такую как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетку грибов, например, дрожжевую клетку или *Aspergillus*, клетку насекомого, например, клетку S2 *Drosophila* или Sf9, и клетку животного, например, фибробласт, клетку CHO, клетку COS, клетку NSO, клетку HeLa, клетку ВНК, клетку НЕК 293 или клетку человека.

В контексте данного документа термин «идентичность» относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или более молекул нуклеиновой кислоты, определяемой путем выравнивания и сравнения последовательностей. «Процент идентичности» означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих расчетов гэпы в выравнивании (если таковые имеются) предпочтительно устраняются с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (например, «алгоритма»). Способы, которые можно использовать для определения идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, описанные в *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G.,

1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; и Carillo et al, 1988, *SIAMJ. Applied Math.* 48:1073.

В контексте данного документа термин «иммуногенность» относится к способности стимулировать образование специфических антител или сенсibilизированных лимфоцитов в организмах. Она не только относится к свойству антигена стимулировать активацию, пролиферацию и дифференцировку конкретного иммуноцита с целью, в конечном итоге, образования иммунологической эффекторной субстанции, такого как антитело и сенсibilизированный лимфоцит, но также относится к специфическому иммунному ответу, когда антитела или сенсibilизированные Т-лимфоциты могут образовываться в иммунной системе организма после стимуляции организма антигеном. Иммуногенность представляет собой важное свойство антигена. То, сможет ли антиген эффективно индуцировать иммунный ответ у хозяина, зависит от нескольких факторов, включая свойства антигена, реактивность хозяина и средства иммунизации.

В контексте данного документа термин «трансфекция» или «трансфектировать» относится к процессу, посредством которого нуклеиновые кислоты вводятся в эукариотические клетки, особенно в клетки млекопитающих. Протоколы и методики трансфекции включают, помимо прочего, трансфекцию липидов, а также химические и физические методы, такие как электропорация. Ряд методик трансфекции хорошо известен в данной области техники и описан в данном документе. См., например, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al, 1981, *Gene* 13:197.

В контексте данного документа термин «SPR» или «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет проводить анализ биоспецифических взаимодействий в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция и Пискатауэй, штат Нью-Джерси). Дополнительные описания см. в разделе Пример и Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; и Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

В контексте данного документа термин «сортировка клеток с активированной флуоресценцией» или «FACS» относится к специализированному типу проточной цитометрии. Она представляет собой способ сортировки гетерогенной смеси

биологических клеток в два или более контейнеров, по одной клетке за раз, на основе специфического светорассеяния и флуоресцентных характеристик каждой клетки (FlowMetric. «Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting». Retrieved 2017-11-09.). Инструменты для проведения FACS известны специалистам в данной области техники и коммерчески доступны. Примеры таких инструментов включают инструменты FACS Star Plus, FACScan и FACSsort от Becton Dickinson (Фостер-Сити, штат Калифорния), Epics C от Coulter Epics Division (Хайалиа, штат Флорида) и MoFlo от Cytomation (Колорадо-Спрингс, штат Колорадо).

Термин «субъект» включает любого человека или животное, отличное от человека, предпочтительно человека.

В контексте данного документа термин «патологическое состояние, ассоциированное с D3» или «патологическое состояние, связанное с D3» относится к любому патологическому состоянию, которое вызвано, усугублено или иным образом связано с повышенной или пониженной (как правило, повышенной) экспрессией или активностью D3 (например, D3 человека).

В контексте данного документа термин «злокачественное новообразование» относится к любой опухоли или любому росту или пролиферации злокачественных клеток, первичному или опосредованному метастазами, включая солидные опухоли и несолитные опухоли, такие как лейкоз.

Термин «лечение», «процесс лечения» или «получавший лечение», используемый в данном документе в контексте лечения патологического состояния, как правило, относится к лечению или терапии, будь то человека или животного, при котором достигается некоторый желаемый терапевтический эффект, например, ингибирование прогрессирования патологического состояния и включает снижение скорости прогрессирования, остановку скорости прогрессирования, регресс патологического состояния, облегчение патологического состояния и излечение патологического состояния. Также включено лечение в качестве профилактической меры (например, профилактика, предотвращение). В случае злокачественного новообразования «лечение» может относиться к подавлению или замедлению роста, пролиферации или метастазирования опухоли или злокачественных клеток, или к некоторой их комбинации. Для опухолей «лечение» включает удаление всей опухоли или ее части, ингибирование или замедление роста опухоли и метастазирования, предотвращение или задержку развития опухоли или некоторую их комбинацию.

В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к тому количеству активного соединения или материала, композиции или

дозировки, включающей активное соединение, которое эффективно для получения некоторого желаемого терапевтического эффекта, соизмеримого с разумным соотношением польза/риск при введении в соответствии с желаемой схемой введения. Например, «терапевтически эффективное количество» связывающей D3 молекулы относится к количеству или концентрации, эффективной для лечения заболевания или патологического состояния, ассоциированного с D3 человека.

В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» относится к клетке с введением экзогенных полинуклеотидов.

В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, эксципиент и/или его соли химически и/или физически совместимы с другими ингредиентами в составе и физиологически совместимы с реципиентом.

В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент» относится к носителю, стабилизатору и/или эксципиенту, фармакологически и/или физиологически совместимому с субъектом и активным агентом, который хорошо известен в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), и включает, помимо прочего, регулятор pH, поверхностно-активное вещество, адъювант или усилитель ионной силы. Например, регулятор pH включает, помимо прочего, фосфатный буфер; поверхностно-активное вещество включает, помимо прочего, катионное, анионное или неионное поверхностно-активное вещество, например, Твин-80; усилитель ионной силы включает, помимо прочего, хлорид натрия. Носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для клеток или млекопитающих, подвергающихся их воздействию в используемых дозах и концентрациях. Часто носитель представляет собой водный pH-буференный раствор. Примеры носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (например, менее чем около 10 аминокислотных остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™. Термин «носитель» также может относиться к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному или неполному)), эксципиенту или наполнителю,

с которым вводят терапевтическое средство. Такие носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтяные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Вода является примером носителя, когда композицию (например, фармацевтическую композицию) вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие эксципиенты (например, фармацевтические наполнители) включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль воду, этанол и т. п. Композиция, при необходимости, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH-буферных агентов. Композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п. Пероральные композиции, включая составы, могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т.д. Примеры подходящих носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA. Композиции, включая фармацевтические соединения, могут содержать профилактически или терапевтически эффективное количество связывающего D3 агента (например, антитела к D3), например, в выделенной или очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения субъекту (например, пациенту). Состав должен соответствовать способу введения.

В контексте данного документа термин «адъювант» относится к неспецифическому иммуностимулятору, который может усиливать иммунный ответ на антиген или изменять тип иммунного ответа в организме, когда он вводится в организм вместе с антигеном или вводится в организм заранее. Существует множество адъювантов, включая, помимо прочего, алюминиевые адъюванты (например, гидроксид алюминия), адъюванты Фрейнда (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), *Corynebacterium parvum*, липополисахарид, цитокины и т.п. Адъювант Фрейнда является наиболее часто используемым адъювантом в экспериментах на животных. Адъювант в виде гидроксида алюминия чаще используется в клинических исследованиях.

Связывающие D3 молекулы

В некоторых аспектах данное изобретение относится к связывающим D3 молекулам.

Связывающая D3 молекула в общем смысле может включать любую молекулу, которая специфически связывается с D3. В некоторых случаях «связывающая D3 молекула» может включать «антагонист D3» и «антитело к D3». «Антагонист D3» относится к любому химическому соединению или биологической молекуле, которая блокирует активность D3. «Антитело к D3» включает, помимо прочего, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело или однодоменное антитело. Связывающая D3 молекула не ограничивается полипептидом или белком и может содержать другие компоненты, такие как нуклеотиды, гибриды, глюканы и их комбинации. Как показано в данном документе связывающая D3 молекула может представлять собой антитело к D3 или слитый белок к D3.

В некоторых вариантах осуществления связывающие D3 молекулы, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один VHH, который специфически связывается с D3. Кроме того, связывающая D3 молекула может представлять собой однодоменное антитело, содержащее один VHH. Например, однодоменное антитело способно селективно связываться со специфическим антигеном (например, D3). В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула содержит VHH, слитую с областью Fc иммуноглобулина, например, областью Fc IgG (например, IgG4 или IgG1). В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG1. Слияние VHH с областью Fc может быть более эффективным для включения эффекторных функций. Кроме того, слияние VHH с областью Fc может помочь связывающей D3 молекуле образовать димер, а также может способствовать продлению периода полужизни связывающей D3 молекулы *in vivo*.

Как известно в данной области техники, молекулы VHH, полученные из антител Camelidae, относятся к числу самых маленьких известных интактных антигенсвязывающих доменов (приблизительно 15 кДа, или в 10 раз меньше, чем обычный IgG) и, следовательно, хорошо подходят для доставки в плотные ткани и для доступа к ограниченному пространству между макромолекулами.

VHH, описанные в данном документе, могут быть изготовлены специалистом в соответствии со способами, известными в данной области техники, или любым будущим способом. Например, VHH можно получить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как иммунизация верблюда и получение из него гибридомы, или путем клонирования библиотеки VHH по настоящему изобретению с использованием методов молекулярной биологии, известных в данной области техники, и последующей селекции с использованием фагового дисплея.

Например, VHH можно получить путем иммунизации лам или альпак желаемым

антигеном и последующего выделения мРНК, кодирующей антитела, содержащие только тяжелые цепи. С помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции создается библиотека генов однодоменных антител, содержащая несколько миллионов клонов. Методики скрининга, такие как фаговый дисплей и рибосомный дисплей, помогают идентифицировать клоны, связывающие антиген. Одной из методик является фаговый дисплей, при котором на фагах синтезируют библиотеку антител (например, человеческих), библиотеку скринируют с использованием представляющего интерес антигена или его связывающей антитело части и выделяют фаг, который связывает антиген, из которого можно получить иммунореактивные фрагменты. Способы получения и скрининга таких библиотек хорошо известны в данной области техники, а наборы для создания библиотек фагового дисплея коммерчески доступны (например, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, кат. № 27-9400-01; и набор для фагового дисплея Stratagene SurfZAP™, кат. № 240612). Существуют также другие методы и реагенты, которые можно использовать при создании и скрининге дисплейных библиотек антител (см., например, Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991)).

Когда выявлены эффективные клоны, последовательность их ДНК оптимизируется, например, путем аффинного созревания или гуманизации. Гуманизация может предотвратить иммунологические реакции человеческого организма на антитела.

Соответственно, V_{HH} можно получить (1) путем выделения домена V_{HH} природного антитела, содержащего только тяжелые цепи; (2) путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей природный домен V_{HH}; (3) путем «гуманизации» (как описано ниже) природного домена V_{HH} или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой гуманизованный домен V_{HH}; (4) путем «верблюдизации» природного домена V_H любого вида животных, в частности вида млекопитающих, такого как человек, или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой верблюдизованный домен V_H; (5) путем «верблюдизации» «доменного антитела» или «Dab», как описано Ward *et al* (см. выше), или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой верблюдизованный домен V_H; (6) использования синтетических или полусинтетических методов получения белков, полипептидов или других аминокислотных последовательностей; (7) путем получения нуклеиновой кислоты, кодирующей V_{HH}, с использованием методов синтеза нуклеиновой кислоты с последующей экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты; (8) проведения созревания аффинности, мутагенеза (например, случайного мутагенеза или сайт-направленного мутагенеза) антител, содержащих только тяжелые цепи, или V_{HH} и/или любого другого способа(-ов) с целью повышения аффинности и/или специфичности V_{HH}; и/или (9) любой комбинации

вышеперечисленного. Подходящие способы и методики для выполнения вышеизложенного будут понятны специалисту на основе представленных в данном документе описаний и, например, включают способы и методики, описанные в данном документе более подробно.

Однодоменные антитела, как правило, получают путем ПЦР-клонирования репертуара переменных доменов из кДНК крови, лимфатического узла или селезенки, полученной от иммунизированных животных, в вектор фагового дисплея. Антигенспецифические однодоменные антитела, как правило, отбирают путем пэннинга фаговых библиотек на иммобилизованном антигене, например, антигене, нанесенном на пластиковую поверхность пробирки, биотинилированных антигенах, иммобилизованных на покрытых стрептавидином гранулах, или мембранных белках, экспрессируемых на поверхности клеток. Аффинность sdAb часто можно улучшить, имитируя эту стратегию *in vitro*, например, путем направленного мутагенеза областей CDR и дальнейших раундов пэннинга иммобилизованного антигена в условиях повышенной жесткости (более высокая температура, высокая или низкая концентрация соли, высокий или низкий pH и низкие концентрации антигена) (Wesolowski et al., Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* (2009) 198: 157-174).

Способы получения VHH, специфически связывающегося с антигеном или эпитопом, описаны в ссылках, например: R. van der Linden et al., *Journal of Immunological Methods*, 240(2000) 185-195; Li et al., *J Biol Chem.*, 287(2012)13713-13721; Deffar et al., *African Journal of Biotechnology* Vol. 8(12), pp.2645, 17 June, 2009 и WO 94/04678.

В некоторых вариантах осуществления VHH может быть укорочен на N-конце или C-конце, так что он содержит только частичную FRW1 и/или FRW4 или лишен одной или обеих этих каркасных областей, при условии, что VHH по существу сохраняет связывание антигена и специфичность (например, по существу сохраняет, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%).

Настоящее изобретение также относится к связывающим D3 молекулам с маскирующим фрагментом и/или расщепляемым фрагментом, в которых один или более связывающих D3 доменов связывающих D3 молекул замаскированы (например, посредством маскирующего фрагмента) и/или способны активироваться (например, через расщепляемый фрагмент). Технологии маскировки связывающей D3 молекулы (например, антитела) хорошо известны в данной области техники, включая технологию маскировки тела SAFE Body (см., например, US 2019/0241886) и технологию маскировки Probody (см., например, US 2015/0079088). Такие технологии можно использовать для создания связывающей D3 молекулы (например, антитела), которая маскируется и/или способна

активироваться. Такие замаскированные и/или активируемые связывающие D3 молекулы (например, антитела) применимы для получения конъюгатов, включая иммуноконъюгаты, конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), замаскированные ADC и активируемые конъюгаты антитело-лекарственное средство (AADC), содержащие любой из связывающих D3 молекул (например, антител) по настоящему изобретению, включая те, которые прямо или косвенно связаны с другим агентом, таким как лекарственное средство. Например, связывающие D3 молекулы по настоящему изобретению могут быть ковалентно связаны синтетическим линкером с одним или более агентами, такими как лекарственные средства.

При желании связывающую D3 молекулу связывают или конъюгируют (прямо или косвенно) с фрагментом, обладающим эффекторной функцией, такой как цитотоксическая активность (например, химиотерапевтический фрагмент или радиоизотоп) или активностью рекрутирования иммунных клеток. Фрагменты, которые связаны или конъюгированы (прямо или косвенно), включают лекарственные средства, которые являются цитотоксичными (например, токсины, такие как ауристатины) или нецитотоксичными (например, модуляторы сигнальной трансдукции, такие как киназы, или маскирующие фрагменты, которые маскируют один или более связывающих доменов связывающей D3 молекулы или расщепляемые фрагменты, которые позволяют активировать связывающую D3 молекулу путем расщепления расщепляемого фрагмента, чтобы демаскировать один или более связывающих доменов связывающей D3 молекулы в микроокружении опухоли, в форме замаскированных конъюгатов. Фрагменты, которые способствуют рекрутированию иммунных клеток, могут включать другие антигенсвязывающие агенты, такие как вирусные белки, которые селективно связываются с клетками врожденной иммунной системы. Альтернативно или в дополнение, связывающая D3 молекула необязательно связана или конъюгирована (прямо или косвенно) с фрагментом, который облегчает выделение из смеси (например, меткой), или фрагментом с репортерной активностью (например, обнаруживаемой меткой или репортерным белком). Следует понимать, что характеристики связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе, распространяются также на полипептид, содержащий фрагмент связывающей D3 молекулы.

В некоторых вариантах осуществления связывающие D3 молекулы, описанные в данном документе, могут быть связаны или конъюгированы (прямо или косвенно) с полипептидом, что может привести к образованию активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула связана или конъюгирована (прямо или косвенно) с агентом. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой

лекарственное средство, в результате которого образуются ADC или AADC, когда антитело ADC содержит маскирующий фрагмент и расщепляемый фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления связывающие D3 молекулы, описанные в данном документе, конъюгированы или рекомбинантно связаны (прямо или косвенно) с терапевтическим агентом (например, цитотоксическим агентом) или с диагностическим или обнаруживаемым агентом. Конъюгированные или рекомбинантно связанные антитела, включая замаскированные или активируемые конъюгаты, могут быть полезны, например, для лечения или предотвращения заболевания, нарушения или патологического состояния, такого как злокачественное новообразование или опухоль.

Диагностика и обнаружение могут быть осуществлены, например, путем связывания связывающей D3 молекулы с обнаруживаемыми субстанциями, включая, например: ферменты, включая, помимо прочего, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; простетические группы, включая, помимо прочего, стрептавидин/биотин или авидин/биотин; флуоресцентные материалы, включая, помимо прочего, умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, флуоресцеин дихлортриазиниламина, дансилхлорид, или фикоэритрин; люминесцентные материалы, включая, помимо прочего, люминол; биолюминесцентные материалы, включая, помимо прочего, люциферазу, люциферин или экворин; хемилюминесцентный материал, включая, помимо прочего, соединение на основе акридиния или HALOTAG; радиоактивные материалы, включая, помимо прочего, йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , и ^{121}I), углерод (^{14}C), серу (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga и ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , или ^{117}Sn ; металлы, излучающие позитроны, с использованием различных позитронно-эмиссионных томографий; и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов.

Конъюгаты антитела и агента, в том числе, где агент представляет собой лекарственное средство для получения ADC или AADC, могут быть получены с использованием различных бифункциональных белковых связывающих агентов, таких как BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон) бензоат). В настоящем изобретении дополнительно предполагается, что конъюгаты антител и агентов, в том числе, где агент представляет собой лекарственное средство для получения ADC или AADC, могут быть получены с использованием любых подходящих способов, описанных в данной области

техники (см., например, *Bioconjugate Techniques* (Hermanson ed., 2d ed. 2008)).

Традиционные стратегии конъюгации антител и агентов, в том числе, если агент является лекарственным средством для получения ADC или AADC, основаны на случайной конъюгации химических веществ с участием ϵ -аминогруппы остатков Lys или тиольной группы остатков Cys, что приводит к образованию гетерогенных конъюгатов. Недавно разработанные технологии позволяют осуществлять сайт-специфическую конъюгацию антител, что приводит к получению однородной нагрузки и отсутствию субпопуляций конъюгатов с измененным связыванием антигена или фармакокинетикой. К ним относятся разработка «thiomab», содержащих замены цистеина в положениях тяжелых и легких цепей, которые обеспечивают реакционноспособные тиольные группы и не нарушают фолдинг и сборку иммуноглобулина или не изменяют связывание антигена (см., например, Junutula et al., 2008, *J. Immunol. Meth.* 332: 41-52; и Junutula et al., 2008, *Nature Biotechnol.* 26:925-32). В еще одном методе селеноцистеин котрансляционно встраивают в последовательность антитела путем перекодирования стоп-кодона UGA от терминации до вставки селеноцистеина, что обеспечивает сайт-специфическую ковалентную конъюгацию нуклеофильной селенольной группы селеноцистеина в присутствии других природных аминокислот (см., например, Hofer et al., 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:12451-56; и Hofer et al., 2009, *Biochemistry* 48(50):12047-57).

Описанные в данном документе связывающие D3 молекулы могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или обладать большей полиспецифичностью. Такие агенты могут включать антитела. Полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере двух различных мишеней (например, антигенов) или двух различных эпитопов на одной и той же мишени (например, биспецифическое антитело, направленное против D3, с первым связывающим доменом для первого эпитопа D3 и вторым связывающим доменом для второго эпитопа D3). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические (например, биспецифические) антитела можно сконструировать на основе последовательностей антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела, описанные в данном документе, представляют собой биспецифические антитела. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела представляют собой мышиные, химерные, человеческие или гуманизированные антитела. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания полиспецифического антитела относится к D3, а другая — к любой другой мишени (например, антигену). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое (например, биспецифическое)

антитело может содержать более одного домена, связывающего мишень (например, антиген), в котором разные связывающие домены специфичны в отношении разных мишеней (например, первый связывающий домен, который связывается с D3, и второй связывающий домен, который связывается с другой мишенью (например, антигеном), например, регулятором иммунной контрольной точки (например, отрицательный регулятор контрольной точки). В некоторых вариантах осуществления молекулы полиспецифических (например, биспецифических) антител могут связывать более одного (например, двух или более) эпитопов на одной и той же мишени (например, антигене). В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания представляет собой D3, а другая представляет собой одно или более из цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена-4 (CTLA-4), CD80, CD86, белка программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), лиганда 1 белка программируемой клеточной гибели (PD-L1), лиганда 2 белка программируемой клеточной гибели (PD-L2), гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3; также известного как CD223), галектина-3, В- и Т-лимфоцитарного аттенуатора (BTLA), белка 3 Т-клеточной мембраны (TIM3), галектина-9 (GAL9), B7-H1, B7-H3, B7-H4, Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9), V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA), индуцированного глюкокортикоидами рецептора фактора некроза опухолей (GITR), медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM), OX40, CD27, CD28, CD137. CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15027, CGEN-15049, CGEN-15052, и CGEN-15092.

Способы получения полиспецифических антител известны в данной области техники, например, это коэкспрессия двух пар тяжелая цепь — легкая цепь иммуноглобулина, когда две тяжелые цепи имеют разную специфичность (см., например, Milstein and Cuello, 1983, Nature 305:537-40). Более подробную информацию о получении полиспецифических антител (например, биспецифических антител) см., например, в Bispecific Antibodies (Kontermann ed., 2011).

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, которые связывают D3. Различные способы гуманизации антител, не являющихся человеческими, известны в данной области техники. Например, гуманизированное антитело может иметь один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называются «импортными» остатками, которые, как правило, взяты из «импортного» переменного домена. Гуманизированные антитела, связывающие D3, можно получить с использованием методов, известных специалистам в данной области техники (например, Zhang et al., Molecular Immunology, 42(12): 1445-1451, 2005; Hwang et al., Methods, 36(1): 35-42, 2005;

Dall'Acqua et al., Methods, 36(1): 43-60, 2005; Clark, Immunology Today, 21(8): 397-402, 2000, и патенты США №№ 6180370; 6054927; 5869619; 5861155; 5712120; и 4816567).

В следующих разделах связывающая D3 молекула может быть описана как антитело к D3.

Антитела к D3 с функциональными свойствами

Антитела по настоящему изобретению, включая, например, антитела, содержащие по меньшей мере один домен VHH, характеризуются особыми функциональными особенностями или свойствами антител. В некоторых вариантах осуществления антитела обладают одним или более из следующих свойств:

(а) связываются с D3 человека, D3 яванского макака и D3 мыши с EC₅₀ на уровне нМ по данным ELISA или FACS;

(b) проявляют дозозависимую эффективность интернализации в клетках человека, сконструированных для экспрессии D3; и

(с) связываются с ВКД D3 человека с K_D не более 0,1 нМ по данным SPR.

Антитело по настоящему изобретению связывается с D3 клеточной поверхности с высокой аффинностью. Связывание антитела по настоящему изобретению с D3 можно оценить с помощью одного или более методов, хорошо известных в данной области техники, например, ELISA. Специфичность связывания антитела по настоящему изобретению также можно определить путем мониторинга связывания антитела с клетками, экспрессирующими белок D3, например, с помощью проточной цитометрии. Например, антитело можно протестировать с помощью анализа проточной цитометрии (например, FACS), в котором антитело взаимодействует с линией клеток, экспрессирующей D3 человека, такой как клетки CHO и клетки 293, которые были трансфицированы для экспрессии D3 на их клеточной поверхности. В дополнительном или альтернативном варианте связывание антитела, включая кинетику связывания (например, значение K_d), можно исследовать с помощью анализов связывания BIAcore. Другие подходящие анализы связывания включают анализы на основе ELISA, например, с использованием рекомбинантного белка D3. Например, антитело по настоящему изобретению связывается с белком D3 клеточной поверхности (например, ВКД D3 человека) с K_D 1 x 10⁻⁷ М или менее, 5 x 10⁻⁸ М или менее, 2 x 10⁻⁸ М или менее, 5 x 10⁻⁹ М или менее, 4 x 10⁻⁹ М или менее, 3 x 10⁻⁹ М или менее, 2 x 10⁻⁹ М или менее, 1 x 10⁻⁹ М или менее, 5 x 10⁻¹⁰ М или менее, или 1 x 10⁻¹⁰ М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с D3 яванского макаки или мыши при EC₅₀ не более или около 10 нМ, 9 нМ, 8

нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,09 нМ, 0,08 нМ, 0,07 нМ, 0,06 нМ, 0,05 нМ, 0,04 нМ, 0,03 нМ, 0,02 нМ или 0,01 нМ по данным FACS.

Антитела к D3, содержащие CDR VHH

В некоторых вариантах осуществления антитело к D3, описанное в данном документе, содержит по меньшей мере один одиночный вариабельный домен иммуноглобулина (например, VHH), при этом VHH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, и при этом CDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 4, 7 или 10, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, 5, 8 или 11, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR соответствует комбинации нумераций Kabat и AbM.

Протяженность каркасной области и CDR можно точно определить с использованием методологии, известной в данной области техники, например, с помощью определения Kabat, определения Chothia, определения AbM, определения Contact, определения IMGT (все из которых хорошо известны в данной области техники) и любых их комбинаций. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May, 63(1):78-85; и Martin and Allen, in «*Handbook of Therapeutic Antibodies*», chapter 5, 2007. См. также hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs. Соответствие или совпадения между нумерациями в соответствии с различными определениями можно найти, например, на сайте www.imgt.org/ (см. также Giudicelli V et al. IMGT, международную базу данных ImMunoGeneTics. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:206–11; и Lefranc MP et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol.* (2003) 27:55–77).

Как будет понятно специалистам в данной области техники, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться в разных системах нумерации. Однако следует понимать, что раскрытие последовательности вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой последовательности и/или последовательности VHH включает описание ассоциированных (характерных) CDR. Соответственно, описание каждой вариабельной области представляет собой описание CDR (например, CDR1, CDR2 и CDR3). Два антитела, имеющие одинаковые CDR VH, VL или VHH, означают, что их

CDR идентичны при определении с помощью одного и того же подхода (например, подходов нумерации Kabat, AbM, Chothia, Contact и IMGT, известных в данной области техники).

Вариабельные области и CDR в последовательности антитела можно идентифицировать в соответствии с общими правилами, разработанными в данной области техники (например, с помощью системы нумерации Kabat, AbM, Chothia, Contact и IMGT) или путем сопоставления последовательностей с базой данных известных вариабельных областей. Методы идентификации этих областей описаны в Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001 and Dinarello *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Иллюстративные базы данных последовательностей антител описаны и доступны через веб-сайт «Abysis» по адресу www.bioinf.org.uk/abs (поддерживается А.К. Мартином на факультете биохимии и молекулярной биологии Университетского колледжа Лондона, Лондон, Англия) и веб-сайт VBASE2 www.vbase2.org, как описано в Retter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 33 (Database issue): D671-D674 (2005). Предпочтительно последовательности анализируются с использованием базы данных Abysis, которая объединяет данные о последовательностях из Kabat, IMGT и банка данных белков (PDB) со структурными данными из PDB. См. главу книги доктора Эндрю К. Р. Мартина *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В: Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, также доступно на сайте bioinforg.uk/abs). Веб-сайт базы данных Abysis дополнительно включает общие правила, которые были разработаны для идентификации CDR, которые можно использовать в соответствии с идеями, изложенными в данном документе. На Фиг. 10 показано выравнивание иллюстративных одиночных вариабельных доменов иммуноглобулина, а границы CDR обозначены согласно нумерациям Kabat, AbM, Chothia, Contact и IMGT.

В некоторых вариантах осуществления связывающая D3 молекула, описанная в данном документе, содержит по меньшей мере один одиночный вариабельный домен иммуноглобулина (например, VHH), при этом VHH содержит FRW1-CDR1-FRW2-CDR2-FRW3-CDR3-FRW4, и при этом CDR1 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 4, 7 или 10, CDR2 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, 5, 8 или 11, и CDR3 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9. В некоторых вариантах осуществления FRW1 и FRW4 на N- и C-концах VHH, содержащихся в связывающей D3 молекуле, могут быть укорочены так, что они содержат только частичную FRW1 и/или FRW4, или в VHH отсутствует одна или обе эти каркасные области, при условии, что VHH в значительной степени сохраняет

связывание антигена и специфичность.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее один, два или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3), содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3) является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3) содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (например, однодоменное антитело) содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (например, однодоменное антитело) содержит CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 12. В других вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело) содержит CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело) содержит

CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело) содержит CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело) содержит CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (например, однодоменное антитело) содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 12. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3) является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 (такое как однодоменное антитело к D3) содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 13. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 13. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо

известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 14. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 14. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 15. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 15. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 16. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 16. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 17. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В

некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 18. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 18. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело, которое связывается с D3, имеющее следующую структуру: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, причем (i) CDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 34, SEQ ID

NO: 35, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, или SEQ ID NO: 54; (ii) CDR2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, или SEQ ID NO: 52; и/или (iii) CDR3 содержит аминокислотную последовательность, указанную SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1; CDR2 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2; и CDR3 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20; CDR2 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21; и CDR3 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23; CDR2 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2; и CDR3 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24; CDR2 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25; и CDR3 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27; CDR2 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID

NO: 28 или 56; и CDR3 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1; CDR2 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30; и CDR3 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4; CDR2 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5; и CDR3 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31; CDR2 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32; и CDR3 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34; CDR2 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5; и CDR3 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35; CDR2 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 36; и CDR3 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 38; CDR2 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39; и CDR3 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления

CDR1 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4; CDR2 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41; и CDR3 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; CDR2 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8; и CDR3 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42; CDR2 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 43; и CDR3 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; CDR2 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8; и CDR3 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 46; CDR2 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47; и CDR3 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49; CDR2 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50; и CDR3 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; CDR2 соответствует нумерации AbM и содержит

аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52; и CDR3 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10; CDR2 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11; и CDR3 содержит иллюстративную аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 53; CDR2 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32; и CDR3 соответствует нумерации IMGT и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34; CDR2 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11; и CDR3 соответствует нумерации Kabat и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 54; CDR2 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 36; и CDR3 соответствует нумерации Chothia и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 38; CDR2 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39; и CDR3 соответствует нумерации Contact и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CDR1 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10; CDR2 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41; и CDR3 соответствует нумерации AbM и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID

NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к D3 содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело дополнительно содержит одну или более каркасных областей WT1156-P3R2-1C2, WT1156-P3R2-1C9, WT1156-P8R2-1H1, WT1156-P3R2-1H6, WT1156-P3R2-1C2-z102, WT1156-P3R2-1C2-z109, и/или WT1156-P3R2-1H6-z100. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит один или более каркасов, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе однодоменное антитело представляет собой гуманизированное однодоменное антитело.

Каркасные области, описанные в данном документе, определяются на основе границ по системе нумерации CDR. Другими словами, если CDR определяются, например, IMGТ, Kabat, Chothia, Contact или AbM, то каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельной области в формате от N-конца к C-концу: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Например, FR1 определяется как

аминокислотные остатки, N-концевые по отношению к аминокислотным остаткам CDR1, как определено, например, по системе нумерации IMGT, системе нумерации Kabat, системе нумерации Chothia, системе нумерации Contact или системе нумерации AbM, FR2 определяется как аминокислотные остатки между аминокислотными остатками CDR1 и CDR2, как определено, например, по системе нумерации IMGT, системе нумерации Kabat, системе нумерации Chothia, системе нумерации Contact или системе нумерации AbM, FR3 определяется как аминокислотные остатки между аминокислотными остатками CDR2 и CDR3, как определено, например, в системе нумерации IMGT, системе нумерации Kabat, системе нумерации Chothia, системе нумерации Contact или системе нумерации AbM, и FR4 определяется как аминокислотные остатки, C-концевые по отношению к аминокислотным остаткам CDR3, как определено, например, по системе нумерации IMGT, системе нумерации Kabat, системе нумерации Chothia, системе нумерации Contact или системе нумерации AbM.

В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в

SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к D3, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55.

Антитела к D3, содержащие последовательности VHH

В некоторых вариантах осуществления антитела к D3 содержат по меньшей мере один одиночный вариабельный домен иммуноглобулина (например, VHH), где VHH содержит или состоит из следующего:

(A) аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55;

(B) аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55; или

(C) аминокислотной последовательности с добавлением, удалением и/или заменой одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислот по сравнению с любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который был включен в программу GAP из пакета программного обеспечения GCG (которое доступно по адресу: <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном или альтернативном варианте последовательности белка (например, антитела) по настоящему изобретению могут дополнительно использоваться в

качестве «искомой последовательности» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программы XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Белковый поиск BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, показатель = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам антитела по изобретению. Для получения выравнивания с внесенными в целях сравнения гэпами можно использовать BLAST с гэпами, как описано в Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и BLAST с гэпами можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. www.ncbi.nlm.nih.gov.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VHH может иметь по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления антитела к D3 могут содержать консервативную замену или модификацию аминокислот в переменных областях и/или константных областях. В данной области техники понятно, что можно осуществить определенную консервативную модификацию последовательности, которая не устраняет связывание антигена. См., например, Brummell et al. (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864- 26870; Hall et al. (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 и Beers et al. (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43.

Как описано выше, в контексте данного документа термин «консервативная замена» относится к аминокислотной замене, которая не оказывает неблагоприятного воздействия или не изменяет существенные свойства белка/полипептида, содержащего указанную аминокислотную последовательность. Например, консервативная замена может быть введена стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают замены, при которых аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, например, остатком, физически или функционально подобным (например, имеющим аналогичный размер, форму, заряд, химические свойства, включая способность образования ковалентной связи или водородной связи и т. д.) соответствующему аминокислотному остатку. Семейства аминокислотных

остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с щелочными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту), аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), аминокислоты с β -разветвленными боковыми цепями (такие как треонин, валин, изолейцин) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, соответствующий аминокислотный остаток предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации консервативных аминокислотных замен хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); и Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997), которые включены в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 содержит по меньшей мере один V_HH, а V_HH содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 содержит V_HH, который имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18.

В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 представляет собой химерное антитело, содержащее V_HH, слитый с областью Fc человеческого IgG1 или IgG4, причем V_HH содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 представляет собой химерное антитело, содержащее V_HH и область Fc человеческого IgG1. Такие антитела проиллюстрированы в данном документе как «WT1156-P3R2-1C2-uIgG1», «WT1156-P3R2-1H6-uIgG1», «WT1156-P8R2-1H1-uIgG1», и «WT1156-P3R2-1C9-uIgG1». В некоторых дополнительных вариантах осуществления антитело к D3 представляет собой гуманизированное антитело, содержащее V_HH и область Fc человеческого IgG1. В данном документе такие антитела представлены под условными обозначениями «WT1156-P3R2-1C2-z102-uIgG1», «WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1» и «WT1156-P3R2-1H6-z100-uIgG1».

В некоторых вариантах осуществления добавление, удаление и/или замена по меньшей мере одной из аминокислот в области V_HH происходит не в какой-либо из последовательностей CDR, а в каркасных последовательностях (FRW). Например, антитело

или его антигенсвязывающая часть, как описано выше, может содержать одну или более замен аминокислот в каркасных последовательностях, например, FRW1, FRW2, FRW3 и/или FRW4 области VHH.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, представленные в данном документе, содержат любые подходящие последовательности каркасной области (FRW), при условии, что антигенсвязывающие домены могут специфически связываться с D3.

Как описано выше, антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать модификацию одной или более аминокислот в переменных областях тяжелой цепи и/или легкой цепи, включая случаи, когда модификация представляет собой консервативную замену. В данной области техники понятно, что можно осуществить определенные консервативные модификации последовательности, которая не устраняет связывание антигена. См., например, Brummell et al. (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall et al. (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 и Beers et al. (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит домен VHH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55, и область Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19.

Антигенсвязывающий домен связывающей D3 молекулы не ограничивается формой VHH и может принимать множество других форматов, таких как, помимо прочего, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, молекулу одноцепочечного антитела (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент Fv с областью VH и областью VL в отдельных цепях, удерживаемых вместе тесными нековалентными взаимодействиями.

Область Fc, содержащая константные домены IgG

Антитела к D3 и антигенсвязывающие фрагменты, указанные в данном документе, дополнительно содержат область Fc, содержащую один или более константных доменов человеческого IgG. Константный домен IgG человека может представлять собой константный домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, предпочтительно константный домен IgG1 человека. Пример аминокислотной последовательности области Fc, содержащей константные области IgG1 человека, указан в SEQ ID NO: 19. В некоторых

вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG1, такую как область Fc дикого типа или вариант Fc, содержащий одну или более аминокислотных модификаций (например, Leu234Ala/Leu235Ala или LALA), которые изменяют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или другие эффекторные функции.

В некоторых вариантах осуществления модификация Fc включает мутацию LALA, например, мутации L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU, как в Kabat et al. Система нумерации Kabat часто используется при ссылке на остаток в переменном домене (приблизительно остатки 1–107 легкой цепи и остатки 1–113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или «индекс EU», как правило, используется для обозначения аминокислотного остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, представленный в Kabat et al., ранее). «Нумерация EU в соответствии с Kabat» или «индекс EU в соответствии с Kabat» относится к нумерации остатков человеческого антитела IgG1 по EU. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации EU.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела по настоящему изобретению

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающую D3 молекулу, описанную в данном документе, например, кодирующую одиночный переменный домен связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

Нуклеиновая кислота, кодирующая область V_HH, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей V_HH, с другой нуклеиновой кислотой, кодирующей одну или более константных областей тяжелой цепи (например, CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat et al. (1991), см. выше), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, такую как константная область IgG1.

После получения нуклеиновых кислот, кодирующих сегменты VHH, этими нуклеиновыми кислотами можно дополнительно манипулировать с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела. В этих манипуляциях нуклеиновая кислота, кодирующая VHH, функционально связывается с другой нуклеиновой кислотой, кодирующей другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. В контексте данного документа термин «функционально связанный» предназначен для обозначения того, что две или более нуклеиновые кислоты соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя или более нуклеиновыми кислотами, остаются в рамке считывания.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую одиночный варибельный домен (например, VHH) связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

(A) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует область VHH, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55;

(B) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты (A); и

(C) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементарной цепью последовательности нуклеиновой кислоты (A).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую однодоменное антитело к D3, содержащее аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления процент идентичности обусловлен вырожденностью генетического кода, а кодируемые белковые последовательности остаются неизменными.

Иллюстративные условия высокой жесткости включают гибридизацию при 45°C в 5X SSPE и 45% формамиде и конечную промывку при 65°C в 0,1X SSC. В данной области техники понятно, что условия эквивалентной жесткости могут быть достигнуты путем изменения температуры и буфера или концентрации соли, как описано в Ausubel, et al. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 to 6.4.10. Модификации условий гибридизации могут быть определены эмпирически или точно рассчитаны на основе длины и процентного содержания пары оснований гуанозина/цитозина (GC) в зонде. Условия гибридизации можно определить, как описано в Sambrook, et al. (Eds.), *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.

Клетки-хозяева

Клетки-хозяева, описанные в данном описании, могут представлять собой любую клетку, которая подходит для экспрессии антител по настоящему изобретению, например,

дрожжевые, бактериальные, растительные клетки и клетки млекопитающих. Клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии антител по настоящему изобретению включают яичники китайского хомячка (клетки CHO) (включая клетки CHO dhfr, описанные Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and PA Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), клетки 293F, миеломные клетки NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для использования с клетками миеломы NSO другой системой экспрессии является система экспрессии гена GS, описанная в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Также включены линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почек эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки 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 крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68); клетки MRC 5; клетки FS4; клетки миеломы мыши, такие как NSO (например, RCB0213, 1992, Bio/Technology 10:169) и клетки SP2/0 (например, клетки SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581); клетки миеломы крысы, такие как клетки YB2/0 (например, клетки YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, ATCC CRL 1662); клетки PER.C6; и линия гепатомы человека (Hep G2). Клетки CHO представляют собой одну из линий клеток, которые можно использовать в данном документе, при этом CHO-K1, DUK-B11, CHO-DP12, CHO-DG44 (Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555 (1986)) и Lec13 являются иллюстративными линиями клеток-хозяев. В случае клеток-хозяев CHO-K1, DUK-B11, DG44 или CHO-DP12 они могут быть изменены таким образом, что у них отсутствует способность фукозиллировать экспрессируемые в них белки. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева в данном документе выбраны из клеток CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NSO или лимфоцитарных клеток.

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

Bacilli, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

В дополнение к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, также являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов обычно доступны и применимы в данном документе, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева *Kluyveromyces* такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, например, *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

При введении рекомбинантных векторов экспрессии, кодирующих антитело, в клетки-хозяева млекопитающих, антитело получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела в клетках-хозяевах или секреции антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белка.

Фармацевтические композиции

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей связывающую D3 молекулу, описанную в данном документе, например, содержащую один переменный домен (например, VHH) связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающую D3 молекулу, описанную в данном документе, например, содержащую один переменный домен (например, VHH) связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку, экспрессирующую связывающую D3 молекулу, описанную в данном документе, например, содержащую один переменный домен (например, VHH) связывающей D3 молекулы, описанной в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Компоненты композиций

Фармацевтическая композиция может необязательно содержать один или более дополнительных компонентов, включая один или более фармацевтически активных ингредиентов, таких как другое антитело или лекарственное средство. Фармацевтические композиции по данному изобретению также можно вводить в составе комбинированной терапии, например, с другим иммуностимулирующим агентом, противораковым агентом, противовирусным агентом или вакциной, в том числе, если антитело к D3 усиливает иммунный ответ. Фармацевтически приемлемый носитель может включать, например, фармацевтически приемлемые жидкие, гелевые или твердые носители, водную среду, неводную среду, противомикробный агент, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, анестетики, суспендирующий/диспергирующий агент, хелатирующий агент, разбавитель, адъювант, эксципиент или нетоксичное вспомогательное вещество, другие известные в данной области техники различные комбинации компонентов или прочее.

Подходящие компоненты фармацевтической композиции могут включать, например, антиоксиданты, наполнители, связующие, разрыхлители, буферы, консерванты, смазывающие вещества, ароматизаторы, загустители, красители, эмульгаторы или стабилизаторы, такие как сахара и циклодекстрин. Подходящие антиоксиданты могут включать, например, метионин, аскорбиновую кислоту, ЭДТА, тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, меркаптоглицерин, тиогликолевую кислоту, меркаптосорбит, бутилметиланизол, бутилированный гидрокситолуол и/или пропилгаллат. Описанная в настоящем описании композиция может содержать антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, а также содержать один или более антиоксидантов, таких как метионин, для предотвращения или уменьшения снижения аффинности связывания, тем самым повышая стабильность антитела и увеличивая срок хранения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов и один или более антиоксидантов, таких как метионин. Настоящее изобретение дополнительно относится к различным способам, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент смешивают с одним или более антиоксидантами, такими как метионин, так что можно предотвратить окисление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, чтобы продлить их срок хранения и/или повысить активность.

В качестве дополнительной иллюстрации фармацевтически приемлемые носители могут включать, например, водные носители, например, растворы хлорида натрия для инъекций, инъекцию раствора Рингера, инъекцию изотонического раствора декстрозы,

инъекцию стерильной воды или инъекцию раствора Рингера с декстрозой и лактатом, неводные носители, например, нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло или арахисовое масло, противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, изотонические средства, например, хлорид натрия или декстрозу, буферы, например, фосфатный или цитратный буферы, антиоксиданты, например, бисульфат натрия, местные анестетики, например, прокаина гидрохлорид, суспендирующие и диспергирующие агенты, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу, или поливинилпирролидон, эмульгаторы, такие как полисорбат 80 (TWEEN-80), изолирующие или хелатирующие агенты, например, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) или ЭГТА (этиленгликольтетрауксусную кислоту), этиловый спирт, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту. Противомикробные средства, используемые в качестве носителей, могут быть добавлены в фармацевтические композиции в многодозовых контейнерах, которые включают фенолы или крезолы, ртуть, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловые и пропиловые эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Подходящие эксципиенты 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.

Применение, состав и дозировка

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, различными путями, включая, помимо прочего, пероральный, внутривенный, внутриартериальный, подкожный, парентеральный, интраназальный, внутримышечный, внутричерепной, внутрисердечный, внутрижелудочковый, внутритрахеальный, трансбуккальный, ректальный, внутрибрюшинный, внутрикожный, местный, чрескожный и интратекальный или иным путем с помощью имплантации или ингаляции. Рассматриваемые композиции могут быть приготовлены в виде препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах; в том числе, но без ограничения этим, таблеток, капсул, порошков, гранул, мазей, растворов, суппозиториях, клизм, инъекций, средств для ингаляции и аэрозолей. Соответствующий состав и путь введения могут быть выбраны в соответствии с предполагаемым применением и терапевтическим режимом.

Подходящие составы для энтерального введения включают твердые или мягкие желатиновые капсулы, пилюли, таблетки, включая покрытые оболочкой таблетки, настои, суспензии, сиропы или лекарственные формы для ингаляции и их формы с контролируемым высвобождением.

Составы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции), включают водные или неводные, изотонические, апирогенные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых активный ингредиент растворен, суспендирован или иным образом составлен (например, в липосомах или других микрочастицах). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатические агенты, суспендирующие агенты, загустители и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным с кровью (или другими соответствующими жидкостями организма) предполагаемого получателя. Примеры эксципиентов включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла и тому подобное. Примеры подходящих изотонических носителей для использования в таких составах включают раствор хлорида натрия для инъекции, раствор Рингера для инъекции или раствор Рингера с лактатом для инъекции. Аналогичным образом, конкретный режим дозирования, включая дозу, время и повторение, будет зависеть от конкретного человека и его истории болезни, а также от эмпирических соображений, таких как фармакокинетика (например, период полужизни, скорость клиренса и т. д.).

Частота введения может определяться и корректироваться в ходе терапии и основана на уменьшении количества пролиферативных или опухолевых клеток, поддержании сокращения таких неопластических клеток, уменьшении пролиферации неопластических клеток или задержке развития метастазов. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза может быть скорректирована или уменьшена для устранения потенциальных побочных эффектов и/или токсичности. В альтернативном варианте могут подходить составы с пролонгированным непрерывным высвобождением рассматриваемой терапевтической композиции.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящие дозировки могут варьироваться от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозировки обычно включает балансирование уровня терапевтического эффекта с любым риском или вредными побочными эффектами. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных факторов, включая, без ограничений, активность конкретного соединения, путь введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения, другие

лекарственные средства, соединения, и/или материалы, применяемые в комбинации, тяжесть состояния, и вид, пол, возраст, масса тела, патологическое состояние, общее состояние здоровья и предыдущая медицинская история пациента. Количество соединения и способ введения в конечном итоге будут определяться лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом, хотя обычно дозировка подбирается для достижения локальных концентраций в месте действия, которые достигают желаемого эффекта, не вызывая существенных вредных или отрицательных побочных явлений.

В общем, связывающую D3 молекулу по настоящему изобретению можно вводить в различных диапазонах. Они включают от около 5 мкг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела на дозу; от около 50 мкг/кг массы тела до около 5 мг/кг массы тела на дозу; от около 100 мкг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела на дозу; и любые значения в пределах диапазонов. Другие диапазоны включают от около 100 мкг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу и от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления дозировка составляет по меньшей мере около 100 мкг/кг массы тела, по меньшей мере около 250 мкг/кг массы тела, по меньшей мере около 750 мкг/кг массы тела, по меньшей мере около 3 мг/кг массы тела, по меньшей мере около 5 мг/кг массы тела, по меньшей мере около 10 мг/кг массы тела.

В любом случае антитело или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению предпочтительно вводят по мере необходимости субъектам, нуждающимся в этом. Определение частоты введения может быть выполнено специалистами в данной области техники, например, лечащим врачом на основании данных о патологическом состоянии, подлежащем лечению, возрасте субъекта, подлежащего лечению, степени тяжести патологического состояния, подлежащего лечению, общего состояния здоровья субъекта, подлежащего лечению, и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления курс лечения с использованием связывающей D3 молекулы по настоящему изобретению будет включать множество доз выбранного лекарственного препарата в течение периода времени, охватывающего недели или месяцы. Например, связывающую D3 молекулу по настоящему изобретению можно вводить один раз в день, один раз в два дня, один раз в четыре дня, один раз в неделю, один раз в десять дней, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в десять недель или один раз в три месяца. В этой связи следует отметить, что дозировки могут быть изменены или интервал может быть скорректирован в зависимости от реакции пациента и клинических рекомендаций.

Дозировки и режимы лечения также могут быть определены эмпирическим путем для описанных терапевтических композиций у индивидов, которым было назначено одно или

более введений. Например, индивидам можно давать возрастающие дозы терапевтической композиции, полученной, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления дозировка может быть постепенно увеличена или уменьшена, или сведена к минимуму, соответственно, на основании определенных эмпирическим путем или наблюдаемых побочных эффектов или токсичности. Для оценки эффективности выбранной композиции можно отслеживать маркер конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, как описано ранее. В случае злокачественного новообразования они включают прямое измерение размера опухоли посредством пальпации или визуального наблюдения, косвенное измерение размера опухоли с помощью рентгеновских лучей или других методов визуализации; улучшение, оцениваемое с помощью прямой биопсии опухоли и микроскопического исследования образца опухоли; измерение непрямого опухолевого маркера (например, PSA при раке предстательной железы) или онкогенного антигена, уменьшения боли или паралича; улучшение речи, зрения, дыхания или других нарушений, связанных с опухолью; повышенный аппетит; или повышение качества жизни, измеряемое общепринятыми тестами, или увеличение продолжительности жизни. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что дозировка будет варьироваться в зависимости от индивида, типа неопластического состояния, стадии неопластического состояния, начало ли неопластическое состояние метастазировать в другое место организма индивида, и используемых ранее и сопутствующих методов лечения.

Совместимые составы для парентерального введения (например, для внутривенной инъекции) могут содержать связывающую D3 молекулу, описанную в данном документе, в концентрациях от около 10 мкг/мл до около 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрации связывающей D3 молекулы (например, антитела или его антигенсвязывающей части) будут составлять 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 60 мкг/мл, 80 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл, 600 мкг/мл, 700 мкг/мл, 800 мкг/мл, 900 мкг/мл или 1 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрации связывающей D3 молекулы (например, антитела или его антигенсвязывающей части) будут составлять 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 8 мг/мл, 10 мг/мл, 12 мг/мл, 14 мг/мл, 16 мг/мл, 18 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл, 35 мг/мл, 40 мг/мл, 45 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антитела, композиции антител и способы по настоящему изобретению имеют множество полезных применений *in vitro* и *in vivo*, включая, например, обнаружение D3

или усиление иммунного ответа. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета в различных ситуациях. Иммунный ответ можно модулировать, например, усиливать, стимулировать или повышать.

Например, субъекты включают пациентов-людей, нуждающихся в усилении иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, страдающих нарушением, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, иммунного ответа, опосредованного Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления способы особенно подходят для лечения злокачественного новообразования *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета антитела к D3 можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном, или антиген может уже присутствовать в организме субъекта, подлежащего лечению (например, у субъекта, несущего опухоль или вирус). Если антитела к D3 вводят вместе с другим агентом, их можно вводить в любом порядке или одновременно.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы обнаружения присутствия человеческого антигена D3 в образце или измерения количества человеческого антигена D3, включающие приведение в контакт образца и контрольного образца, например, с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, которая специфически связывается с D3 человека, в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между антителом или его частью и D3 человека. Затем определяют образование комплекса, при этом разница в образовании комплекса между образцом и контрольным образцом свидетельствует о наличии в образце антигена D3 человека. Более того, антитела к D3 по настоящему изобретению можно использовать для очистки D3 человека посредством иммуноаффинной очистки.

Лечение заболеваний, включая злокачественные новообразования

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения или заболевания у млекопитающего, который включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества антитела к D3 или его антигенсвязывающей части, описанной в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу к D3 или его антигенсвязывающей части, описанной в данном документе, для применения при лечении заболевания или нарушения. В некоторых аспектах в данном документе предложено применение антитела к D3 или его антигенсвязывающей части, как описано в данном документе, для производства лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения. Нарушение или заболевание может представлять собой злокачественное новообразование.

Различные новообразования, при которых обнаруживается D3, будь то злокачественные или доброкачественные, первичные или вторичные, можно лечить или предотвращать с помощью способа, предусмотренного настоящим изобретением. Злокачественные новообразования могут включать, помимо прочего, рак легкого (включая различные подтипы, например, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого), надпочечников, печени, почек, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, яичников, шейки матки, матки, пищевода, колоректальный рак и рак предстательной железы, поджелудочной железы, щитовидной железы, карциномы, саркомы, глиобластомы и различные опухоли головы и шеи. Иллюстративные злокачественные новообразования включают, например, мелкоклеточный рак легкого, крупноклеточную нейроэндокринную карциному, глиобластому, саркому Юинга и злокачественные новообразования с нейроэндокринным фенотипом.

Антитела к D3, описанные в данном документе, можно использовать для лечения рака легкого, такого как бронхогенная карцинома, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак, мелкоклеточная карцинома, крупноклеточная карцинома и аденокарцинома, например аденокарцинома легкого. Злокачественные новообразования легкого могут быть рефрактерными, рецидивирующими или резистентными к агенту на основе платины (например, карбоплатину, цисплатину, оксалиплатину, топотекану) и/или таксану (например, доцетакселу, паклитакселу, ларотакселу или кабацитакселу).

Злокачественными новообразованиями, подлежащими лечению антителами к D3, как описано в данном документе, также могут быть крупноклеточная нейроэндокринная карцинома (LCNEC), медуллярный рак щитовидной железы, глиобластома, нейроэндокринный рак предстательной железы (NEPC), гастроэнтеропанкреатический рак высокой степени злокачественности (GEP) и злокачественная меланома. Антитела к D3, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения нейроэндокринных опухолей (как NET, так и pNET), возникающих в почках, мочеполовых путях (мочевой пузырь, предстательная железа, яичники, шейка матки и эндометрий), желудочно-кишечном тракте (толстая кишка, желудок), щитовидной железе (медуллярный рак щитовидной железы) и легких (мелкоклеточная карцинома легкого и крупноклеточная нейроэндокринная карцинома).

Как описано выше, антитела к D3 особенно эффективны при лечении рака легкого, включая следующие подтипы: мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого или плоскоклеточный мелкоклеточный рак легкого) и крупноклеточный нейроэндокринный рак.

Стимуляция иммунного ответа

В некоторых аспектах изобретение также относится к способу усиления (например, стимуляции) иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту связывающей D3 молекулы, например, антитела к D3 или его антигенсвязывающей части по настоящему изобретению таким образом, что иммунный ответ у субъекта усиливается. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу к D3 или его антигенсвязывающей части, как описано в данном документе, для применения в усилении (например, стимуляции) иммунного ответа у субъекта. В некоторых аспектах в данном документе предложено применение антитела к D3 или его антигенсвязывающей части, как описано в данном документе, в производстве лекарственного препарата для усиления (например, стимуляции) иммунного ответа у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Термин «усиление иммунного ответа» или его грамматические варианты означает стимуляцию, вызов, повышение, улучшение или усиление любого ответа иммунной системы млекопитающего. Иммунный ответ может быть клеточным ответом (например, клеточно-опосредованным, например, опосредованным цитотоксическими Т-лимфоцитами) или гуморальным ответом (например, опосредованным антителами), и может быть первичным или вторичным иммунным ответом. Примеры усиления иммунного ответа включают повышение активности CD4⁺ Т-хелперов и образование цитолитических Т-клеток. Усиление иммунного ответа можно оценить с помощью ряда измерений *in vitro* или *in vivo*, известных специалистам в данной области техники, включая, помимо прочего, анализы цитотоксических Т-лимфоцитов, высвобождение цитокинов (например, продукцию IL-2 или продукцию IFN- γ), регрессию опухолей, выживаемость животных с опухолями, продукцию антител, пролиферацию иммунных клеток, экспрессию маркеров клеточной поверхности и цитотоксичность. Например, способы по настоящему изобретению полезны для усиления иммунного ответа млекопитающего по сравнению с иммунным ответом не получавшего лечения млекопитающего или млекопитающего, не получавшего лечение с использованием способов, описанных в данном документе.

Связывающая D3 молекула может использоваться отдельно в качестве монотерапии или может использоваться в комбинации с химической терапией, лучевой терапией, таргетной терапией или клеточной иммунотерапией и т. д.

Совместное применение с химиотерапией

Связывающая D3 молекула (например, антитело к D3) может использоваться в комбинации с химиотерапией, включая, например, противораковый агент, цитотоксический агент или химиотерапевтический агент.

Термин «противораковый агент» или «антипролиферативный агент» означает любой агент, который можно использовать для лечения клеточного пролиферативного нарушения, такого как злокачественное новообразование, и включает, помимо прочего, цитотоксические агенты, цитостатические агенты, антиангиогенные агенты, циторедуктивные агенты, химиотерапевтические агенты, радиотерапию и радиотерапевтические агенты, таргетные противораковые агенты, BRM, терапевтические антитела, противораковые вакцины, цитокины, гормональную терапию, лучевую терапию и антиметастатические агенты и иммунотерапевтические агенты. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления, которые обсуждали выше, такие противораковые агенты могут содержать конъюгаты и могут быть связаны с описанными антителами к D3 перед введением. Например, в некоторых вариантах осуществления выбранные противораковые агенты будут связаны с неспаренными цистеинами сконструированных антител с получением сконструированных конъюгатов (например, конъюгатов антитело-лекарственное средство), как изложено в данном документе. Соответственно, такие разработанные конъюгаты явно входят в объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления описанные противораковые агенты будут вводиться в комбинации с конъюгатами против D3, содержащими другой терапевтический агент, как указано выше.

В контексте данного документа термин «цитотоксический агент» означает субстанцию, которая токсична для клеток и снижает или ингибирует функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. В некоторых вариантах осуществления субстанция представляет собой природную молекулу, полученную из живого организма. Примеры цитотоксических агентов включают, помимо прочего, низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактерий (например, дифтерийный токсин, эндотоксин и экзотоксин *Pseudomonas*, стафилококковый энтеротоксин А), грибов (например, α -сарцин, рестриктоцин), растений (например, абрин, рицин, модекцин, вискумин, противовирусный белок рябины, сапорин, гелонин, моморидин, трихосантин, ячменный токсин, белки *Aleurites fordii*, диантиновый белки, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митегеллин, рестриктоцин, феномицин, неомицин и трихотецены) или животные (например, цитотоксические РНКазы, такие как внеклеточные РНКазы поджелудочной железы; ДНКазы I, включая ее фрагменты и/или варианты).

Для целей настоящего изобретения «химиотерапевтический агент» включает химическое соединение, которое неспецифически снижает или ингибирует рост, пролиферацию и/или выживаемость раковых клеток (например, цитотоксические или

цитостатические агенты). Такие химические агенты часто направлены на внутриклеточные процессы, необходимые для роста или деления клеток, и поэтому особенно эффективны против раковых клеток, которые, как правило, быстро растут и делятся. Например, винкристин деполимеризует микротрубочки и, таким образом, препятствует вступлению клеток в митоз. В общем, химиотерапевтические агенты могут включать любой химический агент, который ингибирует или предназначен для ингибирования раковой клетки или клетки, которая может стать раковой или давать онкогенное потомство (например, Т1С). Такие агенты часто назначаются, и они часто наиболее эффективны в комбинации, например, в таких схемах, как CHOP или FOLFIRI.

Примеры противораковых агентов, которые можно использовать в комбинации со связывающими D3 молекулами (например, антителами к D3) по настоящему изобретению (либо в качестве компонента сайт-специфического конъюгата, либо в неконъюгированном состоянии), включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие агенты, алкилсульфонаты, азиридины, этиленимины и метиламеламины, ацетогенины, камптотecin, бриостатин, калистатин, СС-1065, криптофицины, доластатин, дуокармицин, элеутеробин, панкратистатин, саркодиктин, спонгистатин, азотистые иприты, антибиотики, эндиинового антибиотика, динемидин, бисфосфонаты, эсперамицин, хромофоры на основе хромопротеинов эндиинового антибиотика, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN[®], эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, эрлотиниб, вемурафениб, кризотиниб, сорафениб, ибрутиниб, энзалутамид, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пуринов, андрогены, средства, угнетающие функции надпочечников, наполнитель фолиевой кислоты, например, фролиновую кислоту, ацеллатон, альдофосфамидный гликозид, аминолевулиновую кислоту, энилурацил, амсакрин, бестрабуцил, бисантрон, эдатраксат, дефофамин, демеколцин, диазиквон, эльфорнитин, ацетат эллиптиния, эпотилон, этоглуцид, нитрат галлия, гидроксимочевину, лентинан, лонидаинин, майтанзиноиды, митогуазон, митоксантрон, мопиданмол, нитраэрин, пентостатин, фенамет, пирарубицин, лозоксантрон, подофиллиновую кислоту, 2-этилгидразид, прокарбазин, полисахаридный комплекс PSK[®] (JHS Natural Products, Юджин, штат Орегон), разоксан, ризоксин, сизофиран, спирогерманий, тенауазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А,

роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; тиотепу; таксоиды, хлорамбуцил; гемцитабин GEMZAR®; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорельбин NAVELBINE®; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; иринотекан (Camptosar, СРТ-11), ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин; ретиноиды; капецитабин; комбретастантин; лейковорин; оксалиплатин; ингибиторы РКС-альфа, Raf, H-Ras, EGFR и VEGF-A, которые уменьшают пролиферацию клеток, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного. В это определение также включены антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогенные препараты и селективные модуляторы рецепторов эстрогена, ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, и антиандрогенные препараты, а также троксацитабин (аналог 1,3-диоксоланового нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, rIL-2 PROLEUKIN®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; винорельбин и эсперамицины и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

Совместное применение с лучевой терапией

Настоящее изобретение также относится к сочетанию связывающей D3 молекулы с лучевой терапией (например, любым механизмом, вызывающим локальное повреждение ДНК в опухолевых клетках, таким как гамма-облучение, рентгеновские лучи, УФ-облучение, микроволны, электронные излучения и тому подобное). Также рассматривается комбинированная терапия с использованием направленной доставки радиоизотопов к опухолевым клеткам, и описанные связывающие D3 молекулы могут использоваться в сочетании с таргетным противораковым агентом или другими средствами таргетного воздействия. Как правило, лучевая терапия проводится в виде сеансов в течение периода времени от 1 до 2 недель. Лучевую терапию можно проводить субъектам, страдающим раком головы и шеи, в течение примерно 6-7 недель. Необязательно лучевую терапию можно проводить в виде однократной дозы или в виде нескольких последовательных доз.

Диагностика

В настоящем изобретении предложены способы обнаружения, диагностики или мониторинга пролиферативных нарушений *in vitro* и *in vivo*, а также способы скрининга клеток пациента для идентификации опухолевых клеток, включая туморогенные клетки.

Такие способы включают идентификацию индивида, имеющего злокачественное новообразование, для лечения или мониторинга прогрессирования злокачественного новообразования, включающие приведение пациента или образца, полученного от пациента (либо *in vivo*, либо *in vitro*), в контакт с антителом к D3, как описано в данном документе, и обнаружение присутствия или отсутствия или уровень ассоциации антитела со связанными или свободными целевыми молекулами в образце. В некоторых вариантах осуществления антитело к D3 будет содержать обнаруживаемую метку или репортерную молекулу, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления ассоциация антитела к D3 с конкретными клетками в образце может означать, что образец может содержать онкогенные клетки, тем самым указывая на то, что индивида, имеющего злокачественное новообразование, можно эффективно лечить антителом к D3, как описано в данном документе.

Образцы можно анализировать с помощью многочисленных анализов, например, радиоиммуноанализов, иммуноферментных анализов (например, ELISA), анализов конкурентного связывания, флуоресцентных иммуноанализов, иммуноблоттингов, вестерн-блоттинга и анализов методом проточной цитометрии. Совместимые терапевтические или диагностические анализы *in vivo* могут включать признанные в данной области техники методы визуализации или мониторинга, например, магнитно-резонансную томографию, компьютерную томографию (например, компьютерная томография), позитронную томографию (например, ПЭТ-сканирование), рентгенографию, ультразвук и т. д., как было бы известно специалистам в данной области техники.

Фармацевтические упаковки и наборы

Также предложены фармацевтические упаковки и наборы, содержащие один или более контейнеров, содержащих одну или более доз связывающей D3 молекулы. В некоторых вариантах осуществления предложена стандартная доза, при этом стандартная доза содержит заранее определенное количество композиции, содержащей, например, связывающую D3 молекулу, с одним или более дополнительными агентами или без них. В некоторых вариантах осуществления подобная стандартная доза предоставлена в одноразовом предварительно заполненном шприце для инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащаяся в стандартной дозе, может содержать физиологический раствор, сахарозу или тому подобное; буфер, например, фосфат или тому подобное; и/или быть составленной в пределах стабильного и эффективного диапазона pH. В альтернативном варианте в некоторых вариантах осуществления композиция может быть представлена в виде лиофилизованного порошка, который можно восстановить

добавлением соответствующей жидкости, например, стерильной воды или физиологического раствора. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одно или более веществ, которые ингибируют агрегацию белка, в том числе, но без ограничения этим, сахарозу и аргинин. Любая этикетка на контейнере(-ах) или связанная с ним(и) этикетка указывает на то, что прилагаемая композиция используется для лечения выбранного неопластического заболевания.

Настоящее изобретение также относится к наборам для получения однодозовых или многодозовых контейнеров D3-связывающей молекулы и, необязательно, одного или более противораковых агентов. Набор включает контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковку, которые находятся на контейнере или связаны с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик, и содержать фармацевтически эффективное количество описанных связывающих D3 молекул в конъюгированной или неконъюгированной форме. В некоторых вариантах осуществления контейнер(-ы) имеют порт стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Такие наборы, как правило, содержат в подходящем контейнере фармацевтически приемлемый состав связывающей D3 молекулы в конъюгированной или неконъюгированной форме и, необязательно, один или более противораковых агентов в одном или разных контейнерах. Наборы могут также содержать другие фармацевтически приемлемые составы либо для диагностики, либо для комбинированной терапии. Например, в дополнение к связывающей D3 молекуле по настоящему изобретению такие наборы могут содержать любой один или более противораковых агентов из ряда, таких как химиотерапевтические или радиотерапевтические препараты; антиангиогенные агенты; антиметастатические агенты; таргетные противораковые агенты; цитотоксические агенты; и/или другие противораковые агенты.

Например, наборы могут иметь один контейнер, содержащий связывающую D3 молекулу, с дополнительными компонентами или без них, или они могут иметь отдельные контейнеры для каждого желаемого агента. В тех случаях, когда для конъюгации предлагаются комбинированные терапевтические средства, один раствор может быть предварительно смешан либо в молярном эквиваленте, либо с избытком одного компонента по отношению к другому. Альтернативно, конъюгаты и любой необязательный противораковый агент набора можно хранить отдельно в отдельных контейнерах до введения пациенту. Наборы также могут включать второй/третий контейнер для

содержания стерильного фармацевтически приемлемого буфера или других разбавителей, таких как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), раствор Рингера и раствор декстрозы.

Если компоненты набора представлены в одном или более жидких растворах, жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор, например, стерильный водный или физиологический раствор. Однако компоненты набора могут поставляться в виде сухого порошка(-ов). Если реагенты или компоненты поставляются в виде сухого порошка, порошок можно восстановить путем добавления подходящего растворителя. Предполагается, что растворитель также может находиться в другом контейнере.

Как кратко указано выше, наборы могут также содержать средства для введения пациенту связывающей D3 молекулы и любых необязательных компонентов, например, одну или более игл, пакеты с раствором для внутривенного введения или шприцы или даже пипетки, пипетки или другие подобные устройства, с помощью которых состав можно инъецировать или вводить животному или наносить на пораженный участок тела. Наборы по настоящему изобретению также обычно включают средства для хранения флаконов и других компонентов в закрытом виде для коммерческой продажи, такие как, например, литые или выдувные пластиковые контейнеры, в которые помещаются и хранятся желаемые флаконы и другие устройства.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

К настоящей заявке прилагается перечень последовательностей, включающий ряд аминокислотных последовательностей. В следующих таблицах A-F представлено краткое описание включенных последовательностей. В настоящем описании иллюстративные антитела в целом называются «антителами WBPT1156».

Таблица А. Аминокислотные последовательности области CDR

VHН	CDR1	CDR2	CDR3
WT1156-P3R2-1C2 WT1156-P3R2-1C2-z102 WT1156-P3R2-1C2-z109 WT1156-P3R2-1C2-z109'	SEQ ID NO: 1 GLTFSTATVG	SEQ ID NO: 2 AIPAYYSTYY ASSVKG	SEQ ID NO: 3 DDTPSPSRSPF YKH
WT1156-P3R2-1C9	SEQ ID NO: 4 GRTTSRYSMV	SEQ ID NO: 5 GNSAHDGRS AYADSVKG	SEQ ID NO: 6 DTNPPYGPPW STPSEY EY
WT1156-P3R2-1H6 WT1156-P3R2-1H6-z100	SEQ ID NO: 7 GRTFRSYAMG	SEQ ID NO: 8 AISWIGGGTY	SEQ ID NO: 9 SSLLRHGHMF

		YADSVKKG	EESDY
WT1156-P8R2-1H1	SEQ ID NO: 10 GRTASRYSMV	SEQ ID NO: 11 GNSAHDGRS AYTDSVKG	SEQ ID NO: 6 DTNPPYGPPW STPSEYEY

Таблица В. Аминокислотные последовательности области VHH и области Fc тяжелой цепи IgG1 человека

	Аминокислотная последовательность области VHH	Аминокислотная последовательность области Fc IgG1 человека
WT1156-P3R2-1C2	SEQ ID No: 12 EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSC AASGLTFSTATVGFWRQAPGK ERDLIAAIPAYYSTYYASSVKG RFTISRDNANTVYVYLQMNLSLKP EDTGVVYYCAADDT PSPSRSPFY KHRGQGTQVTVSS	SEQ ID No: 19 DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
WT1156-P3R2-1C9	SEQ ID No: 13 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGRITTSRYSMVWFRQAPGQ EREFVGGNSAHDGRSAYADSV KGRFTFSRDNAKNTGYLQMSSL RPDDTAVYYCAADTNPPYGPP WSTPSEYEYWGHTQVTVSS	KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
WT1156-P3R2-1H6	SEQ ID No: 14 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGRITFRSYAMGWFRQAPGK EREFVAAISWIGGGTYADSV KGRFTISGDNAKNTLYLQMNLSL KPEDTAVYYCAASSLLRHGHM FEESDYWGQGTQVTVSS	
WT1156-P8R2-1H1	SEQ ID No: 15 EVDLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGRITASRYSMVWFRQAPGQ	

	<p>EREFVGGNSAHDGRSAYTDSV KGRFTFSRDNAKNTGYLQMNS LRPDDTAVYYCAADTNPPYGP PWSTPSEYEYWGHGTQVTVSS</p>
WT1156- P3R2-1C2- z102	<p>SEQ ID No: 16</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGLTFSTATVGVFRQAPGK GRELIAAIPAYYSTYYASSVKG RFTISRDNKNSVYLQMNSLRA EDTAVYYCAADDTPSPSRSPFY KHRGQGMVTVSS</p>
WT1156- P3R2-1C2- z109	<p>SEQ ID No: 17</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGLTFSTATVGVFRQAPGK GRELVAAIPAYYSTYYASSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRPE DTAVYYCAADDTPSPSRSPFYK HRGQGMVTVSS</p>
WT1156- P3R2-1H6- z100	<p>SEQ ID No: 18</p> <p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AASGRTFRSYAMGVFRQAPGK EREFVAAISWIGGGTYADSV KGRFTISGDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAASSLLRHGHM FEESDYWGQGMVTVSS</p>

Таблица С. Аминокислотные последовательности клонов антител WT1156-P3R2-1C2, WT1156-P3R2-1C2-z102, WT1156-P3R2-1C2-z109 и WT1156-P3R2-1C2-z109'

		Иллюстра тивная	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Посл ед. CDR	CDR 1 VH	GLTFSTA TVG (SEQ ID	GLTFSTA T (SEQ ID	TATVG (SEQ ID NO: 23)	GLTFSTA (SEQ ID NO: 24)	STATVG (SEQ ID NO: 27)	GLTFSTA TVG (SEQ ID

VHH	H	NO: 1)	NO: 20)				NO: 1)
	CDR 2	AIPAYYS TYYASSV KG (SEQ ID NO: 2)	IPAYYST (SEQ ID NO: 21)	AIPAYYST YYASSVK G (SEQ ID NO: 2)	AYY (SEQ ID NO: 25)	LIAAIPA YYSTY (SEQ ID NO: 28); или LVA AIPA YYSTY (SEQ ID NO: 56)	AIPAYYS TY (SEQ ID NO: 30)
	CDR 3	DDTPSPS RSPFYKH (SEQ ID NO: 3)	AADDTPS PSRSPFY KH (SEQ ID NO: 22)	DDTPSPSR SPFYKH (SEQ ID NO: 3)	DTPSPSR SPFYK (SEQ ID NO: 26)	AADDTP SPSRSPF YK (SEQ ID NO: 29)	DDTPSPS RSPFYKH (SEQ ID NO: 3)

Последовательность VHH WT1156-P3R2-1C2:

EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCAASGLTFSTATVGVWFRQAPGKERDLIAAIPAYYSTY
YASSVKGRFTISRDNANKNTVYLMNSLKPEDTGVYYCAADDTPSPSRSPFYKHRGQG
TQVTVSS (SEQ ID No: 12)

Последовательность VHH WT1156-P3R2-1C2-z102

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSTATVGVWFRQAPGKGRELIAAIPAYYSTY
YASSVKGRFTISRDNANKNSVYLMNSLRAEDTAVYYCAADDTPSPSRSPFYKHRGQG
TMVTVSS (SEQ ID No: 16)

Последовательность VHH WT1156-P3R2-1C2-z109:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSTATVGVWFRQAPGKGRELVA AIPAYYSTY
YASSVKGRFTISRDNANKNSLYLMNSLRPEDTAVYYCAADDTPSPSRSPFYKHRGQGT
MVTVSS (SEQ ID No: 17)

Последовательность VHH WT1156-P3R2-1C2-z109':

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSTATVGVWFRQAPGKGRELIAAIPAYYSTY
YASSVKGRFTISRDNANKNSLYLMNSLRPEDTAVYYCAADDTPSPSRSPFYKHRGQGT
MVTVSS (SEQ ID No: 55)

Таблица D. Аминокислотные последовательности клона антитела WT1156-P3R2-1C9

		Иллюстра тивная	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Пос лед. CD R VH H	CDR 1	GRTTSRY SMV (SEQ ID NO: 4)	GRTTSRYS (SEQ ID NO: 31)	RYSMV (SEQ ID NO: 34)	GRTTSRY (SEQ ID NO: 35)	SRYSMV (SEQ ID NO: 38)	GRTTSRY SMV (SEQ ID NO: 4)
	CDR 2	GNSAHD GRSAYA DSVKG (SEQ ID NO: 5)	NSAHDGR S (SEQ ID NO: 32)	GNSAHD GRSAYA DSVKG (SEQ ID NO: 5)	AHDG (SEQ ID NO: 36)	FVGGNSA HDGRSA (SEQ ID NO: 39)	GNSAHD GRSA (SEQ ID NO: 41)
	CDR 3	DTNPPYG PPWSTPS EYEY (SEQ ID NO: 6)	AADTNPP YGPPWSTP SEYEY (SEQ ID NO: 33)	DTNPPYG PPWSTPS EYEY (SEQ ID NO: 6)	TNPPYGP PWSTPSE YE (SEQ ID NO: 37)	AADTNPP YGPPWST PSEYE (SEQ ID NO: 40)	DTNPPYG PPWSTPS EYEY (SEQ ID NO: 6)
<p>Последовательность VHH WT1156-P3R2-1C9: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTTSTRYSMVWFRQAPGQEREFVGGNSAHDG RSAYADSVKGRFTFSRDNAKNTGYLQMSSLRPDDTAVYYCAADTNPPYGPWSTPSE YEYWGHTQVTVSS (SEQ ID No: 13)</p>							

Таблица E. Аминокислотные последовательности клонов антител WT1156-P3R2-1H6, WT1156-P3R2-1H6-z100

		Иллюстра тивная	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Посл ед. CDR VHH	CDR 1	GRTFRSY AMG (SEQ ID NO: 7)	GRTFRSY A (SEQ ID NO: 42)	SYAMG (SEQ ID NO: 45)	GRTFRSY (SEQ ID NO: 46)	RSYAMG (SEQ ID NO: 49)	GRTFRSY AMG (SEQ ID NO: 7)
	CDR 2	AISWIGG GTYYADS	ISWIGGG T	AISWIGG GTYYAD	WIGG (SEQ ID)	FVAAISW IGGGTY	AISWIGGG TY

	VH H	VKG (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 43)	SVKG (SEQ ID NO: 8)	NO: 47)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 52)
	CDR 3 VH H	SSLLRHG HMFEEED Y (SEQ ID NO: 9)	AASSLLR HGHEMFE ESDY (SEQ ID NO: 44)	SSLLRHG HMFEEED Y (SEQ ID NO: 9)	SLLRHGH MFEESD (SEQ ID NO: 48)	AASSLLR HGHEMFE ESD (SEQ ID NO: 51)	SSLLRHG HMFEEED Y (SEQ ID NO: 9)

Последовательность VHH WT1156-P3R2-1H6:

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFRSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWIGGG
 TYYADSVKGRFTISGDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAASSLLRHGHMFEESDY
 WGQGTQVTVSS (SEQ ID No: 14)

Последовательность VHH WT1156-P3R2-1H6-z100:

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRFTFRSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWIGGG
 TYYADSVKGRFTISGDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSLLRHGHMFEESDYW
 GQGTMTVTVSS (SEQ ID No: 18)

Таблица F. Аминокислотные последовательности клона антитела WT1156-P8R2-1H1

		Иллюстра тивная	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Пос лед. CD R VH H	CDR 1 VH H	GRTASRY SMV (SEQ ID NO: 10)	GRTASRYS (SEQ ID NO: 53)	RYSMV (SEQ ID NO: 34)	GRTASRY (SEQ ID NO: 54)	SRYSMV (SEQ ID NO: 38)	GRTASRY SMV (SEQ ID NO: 10)
	CDR 2 VH H	GNSAHD GRSAYT DSVKG (SEQ ID NO: 11)	NSAHDGR S (SEQ ID NO: 32)	GNSAHD GRSAYT DSVKG (SEQ ID NO: 11)	AHDG (SEQ ID NO: 36)	FVGGNSA HDGRSA (SEQ ID NO: 39)	GNSAHD GRSA (SEQ ID NO: 41)
	CDR 3 VH	DTNPPYG PPWSTPS EYEY	AADTNPP YGPWSTP SEYEY	DTNPPYG PPWSTPS EYEY	TNPPYGPP WSTPSEY E	AADTNPP YGPWST PSEYE	DTNPPYG PPWSTPS EYEY

	Н	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 6)
Последовательность VHH WT1156-P8R2-1H1: EVDLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASRYSMVWFRQAPGQEREFVGGNSAHDG RSAYTDSVKGRFTFSRDNAKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCAADTNPPYGPPWSTPSE YEYWGHTQVTVSS (SEQ ID No: 15)							

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение, описанное таким образом в общих чертах, будет легче понять при обращении к следующим примерам, которые представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Примеры не предназначены для демонстрации того, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными проведенными экспериментами.

ПРИМЕР 1

Получение антигенов, эталонных антител и линий клеток

1.1 Генерация антигенов

Последовательности ДНК, кодирующие последовательность внеклеточного домена (ВКД) D3 яванского макака (Uniprot № A0A2K5WSR4) и D3 мыши (Uniprot № O88516), синтезировали в Sangon Biotech (Шанхай, Китай), а затем субклонировали в модифицированные векторы экспрессии pcDNA3.3 с меткой MBP на N-конце и меткой AVI-His или меткой Fc человека на C-конце. D3 человека (Uniprot № Q9NYJ7) приобретали у AcroBiosystems (кат. DL3-H52H4).

Последовательности ДНК (как описано в WO 2017/021349), кодирующие укороченные изоформы D3 человека, синтезировали в Sangon Biotech (Шанхай, Китай), а затем субклонировали в модифицированные векторы экспрессии pcDNA3.3 с меткой MBP и меткой AVI-His на C-конце.

Клетки Expi293 (Invitrogen-A14527) трансфицировали очищенными векторами экспрессии. Клетки культивировали в течение 5 дней и супернатант собирали для очистки белка с использованием колонки Ni-NTA (GE Healthcare, кат. 175248) или колонки с белком А (GE Healthcare, кат. 175438). Полученный D3 мыши, D3 яванского макака и укороченный D3 человека анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и ЭХ, а затем хранили при -80°C.

D3 человека (ACRO DL3-H52H4) получил название WT115-hPro1.ECD.His.

Полученный D3 мыши получил название WT115-MBP-mPro1.ECD.hFc. Белок D3 человека характеризуется доменом Delta/Serrate/LAG-2 (DSL), шестью повторами, подобными эпидермальному фактору роста (EGF) (домен EGF), и трансмембранным доменом. Укороченные изоформы D3 человека получили название WT115-hPro1.V1.ECD.MBP.AVI.His (домен DSL+ домен EGF1-6 + мембрано-проксимальная область), WT115-hPro1.V2.ECD.MBP.AVI.His (домен EGF1-6 + мембрано-проксимальная область), WT115-hPro1.V3.ECD.MBP.AVI.His (домен EGF2-6 + мембрано-проксимальная область), WT115-hPro1.V4.ECD.MBP.AVI.His (домен EGF3-6 + мембрано-проксимальная область), WT115-hPro1.V5.ECD.MBP.AVI.His (домен EGF4-6 + мембрано-проксимальная область), WT115-hPro1.V6.ECD.MBP.AVI.His (домен EGF5-6 + мембрано-проксимальная область), WT115-hPro1.V7.ECD.MBP.AVI.His (домен EGF6 + мембрано-проксимальная область). Диаграммы укороченного белка показаны на Фиг. 7с.

1.2 Конструирование вектора экспрессии антител ВМК

Два антитела к D3 использовали в качестве эталонных антител и обозначали в данном документе как WT115-BMK1 и WT115-BMK2. Последовательности ДНК, кодирующие переменную область WT115-BMK1 (SEQ ID NO: 212 и SEQ ID NO: 213 в US 2019/0046656) и WT115-BMK2 (SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 в WO 2017/021349), синтезировали в Sangon Biotech (Шанхай, Китай), а затем субклонировали в модифицированные векторы экспрессии pcDNA3.3, кодирующие область Fc человеческого IgG1.

Плазмиду, содержащую ген VH и VL, совместно трансфицировали в клетки Expi293. Клетки культивировали в течение 5 дней и супернатант собирали для очистки белка с использованием колонки с белком А (GE Healthcare, 175438). Полученные антитела анализировали с помощью ДСН-ПААГ и ЭХ, а затем хранили при -80°C.

1.3 Создание стабильных линий клеток/пула клеток

Используя Lipofectamine 2000, клетки 293F трансфицировали вектором экспрессии, содержащим ген, кодирующий полноразмерный D3 человека (UniProt, Q9NYJ7-1). Клетки Flpin293 трансфицировали вектором экспрессии, содержащим ген, кодирующий полноразмерный D3 яванского макака. Клетки культивировали в среде, содержащей соответствующий маркер селекции. Линия стабильных клеток с высокой экспрессией D3 человека (WT115-293F.hPro1.2E5) была отобрана после ограниченного разведения, а пул стабильных клеток с высокой экспрессией D3 яванского макака (WT115.Flpin293.cPro1.pool) с использованием соответствующих выбранных антибиотиков.

1.4 Биотинилирование антител

Для NHS-PEO4-биотинилирования антитела (IgG) в концентрации 1–10 мг/мл инкубировали с 20-кратным молярным избытком реагента NHS-PEO4-биотин при 25 °С в течение 75 минут в металлической бане или на льду в течение двух часов. Затем избыток биотина удаляли с помощью центрифужной колонки для обессоливания и образец очищенного белка собирали из проточного раствора. Уровень включения биотина в белок определяли с помощью анализа НАВА: биотинилированный образец разбавляли в 10 раз раствором НАВА/авидин и измеряли поглощение смешанного раствора при A500. Моли биотина на моль белка рассчитывали на основе значения A500.

ПРИМЕР 2

Получение VHH-содержащих антител WBPT1156

2.1 Получение VHH к D3

VHH к D3 были получены путем иммунизации животных семейства Camelidae и с помощью технологии фагового дисплея. Вкратце, альпак (*Vicugna pacos*) подкожно иммунизировали меченым hFc человеческим белком ВКД D3 (ACRO, DL3-H5255). После иммунизации собирали периферическую кровь для создания фаговой библиотеки, экспонирующей фрагменты VHH. После биопэннинга с соответствующими целевыми белками ВКД были отобраны положительные клоны VHH, связывающиеся с D3.

2.2. Последовательность VHH

Положительные клоны *E. coli*, отобранные с помощью ELISA и FACS с использованием супернатантов *E. coli*, были отправлены в Biosune (Шанхай, Китай) для секвенирования нуклеотидов гена VHH. Результаты секвенирования анализировали с использованием CLC Main Workbench (Qiagen, Хильден, Германия). Последовательности 4 уникальных положительных клонов VHH: WT1156-P3R2-1C2, WT1156-P3R2-1C9, WT1156-P3R2-1H6 и WT1156-P8R2-1H1 показаны в таблицах А и В.

2.3 Получение слитых с Fc антител человека, содержащих VHH

4 уникальных положительных клона VHH были преобразованы в слитые антитела VHH-Fc (hIgG1). Вкратце, гены VHH были амплифицированы с помощью ПЦР из векторов pET-bac с использованием VHH-специфичных праймеров для клонирования, содержащих соответствующие сайты рестрикции, а затем клонированы путем слияния в модифицированный вектор экспрессии человеческого hIgG1 pcDNA3.3 для создания соответствующих клонов химерного антитела VHH-Fc (hIgG1). Клетки 293F или Expi293 транзientно трансфицировали векторами для экспрессии антител. Супернатанты культур

клеток, содержащие антитела, собирали и очищали с помощью хроматографии на основе белка А. Полученные антитела получили названия «WT1156-P3R2-1C2-uIgG1», «WT1156-P3R2-1C9-uIgG1», «WT1156-P3R2-1H6-uIgG1» и «WT1156-P3R2-1H1-uIgG1», соответственно. Полученные антитела анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и ВЭЖХ-ЭХ, а затем хранили при -80°C.

2.4 Гуманизация

Гуманизацию VHH проводили с использованием подхода «Best Fit». Вкратце, аминокислотные последовательности каркасных областей VHH подвергали анализу с использованием Blast по базе данных V-генов зародышевой линии человека, а гуманизированные последовательности VHH получали путем замены последовательностей CDR человека в лучшем совпадении с последовательностями CDR VHH с использованием определения CDR по Kabat. Затем ключевые остатки в каркасе, играющие важную роль в аффинности или возможности разработки антител, были обратно мутированы к исходным остаткам по отдельности или в комбинации. Варианты были кодон-оптимизированы для экспрессии у млекопитающих, а затем синтезированы компанией GENEWIZ (Сучжоу, Китай). Сконструированные варианты VHH и исходные белки VHH клонировали в векторы экспрессии IgG1 человека для создания конструкций IgG1 человека. Антитела получали в клетках HEK293 и очищали с помощью хроматографии на основе белка А. Варианты с желаемой аффинностью были в конечном итоге выбраны в качестве перспективных гуманизированных вариантов.

Последовательности трех уникальных гуманизированных антител к D3, WT1156-P3R2-1C2-z102-uIgG1, WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 и WT1156-P3R2-1H6-z100-uIgG1 также показаны в таблицах А и В.

ПРИМЕР 3

Характеристика связывающих D3 антител

3.1 Связывание D3 человека с помощью ELISA

Планшеты предварительно покрывали 1 мкг/мл, 100 мкл на лунку WT115-hPro1.ECD.His при 4°C в течение ночи. Антиген разводили в покрывающем буфере (0,02 М Na₂CO₃ и 0,18 М NaHCO₃, pH 9,2) из исходного раствора. На следующий день планшеты промывали один раз с использованием 1×PBST (PBS, содержащий 0,05% Твин-20) и блокировали путем добавления 200 мкл 1×PBS/2% BSA. Антитела серийно разводили (5-кратное серийное разведение от 20 нМ до 0,00128 нМ) в блокирующем буфере. После 1-часового блокирования планшеты промывали 1×PBST 3 раза, а затем к планшетам

добавляли антитела и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Связывание антител с иммобилизованным D3 человека обнаруживали с помощью меченного HRP вторичного антитела (Bethyl, A80-304P), которое разводили в 1×PBS/2% BSA в концентрации 1:10000. После инкубации планшеты промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявляли добавлением 100 мкл субстрата TMB, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2M HCl. Поглощение измеряли при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. Антитела к D3 человека WT115-BMK1 и WT115-BMK2 использовали в качестве положительного контроля. Человеческое антитело изотипа IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля. Все образцы были протестированы в двух повторностях.

Как показано на Фиг.1 и в таблице 1, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1, WT1156-P3R2-1C9-uIgG1, WT1156-P3R2-1H6-uIgG1 и WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 могут сильно связываться с иммобилизованным D3 человека, что сопоставимо с WT115-BMK1 и WT115-BMK2. EC50 антител WT1156 находится в диапазоне от 0,013 нМ до 0,026 нМ. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 0,0094 нМ и 0,011 нМ, соответственно.

Таблица 1. Сводная характеристика антител WBPT1156.

Название антитела	D3 человека ELISA связывания (EC50, нМ)	D3 человека FACS связывания (EC50, нМ)	D3 яванского макака FACS связывания (EC50, нМ)	Интернализация (EC50, нМ)	Связывающий домен
WT1156-P3R2-1C2-uIgG1	0,013	0,15	0,14	0,65	EGF1-EGF2
WT1156-P3R2-1H6-uIgG1	0,014	0,52	0,25	0,95	N-конец
WT1156-P8R2-1H1-uIgG1	0,021	0,45	0,21	0,47	N-DSL-EGF1
WT1156-P3R2-1C9-uIgG1	0,026	0,25	0,07	0,46	N-конец
WT115-BMK1	0,0094	0,019	нд	0,19	DSL
WT115-BMK2	0,011	0,54	нд	0,58	EGF3

нд: значение EC50 не было установлено.

3.2 Связывание D3 человека с помощью FACS

Клетки WT115-293F.hPro1.2E5 (1×10^5 клеток/лунка) инкубировали с различными концентрациями антител (5-кратное серийное разведение от 200 нМ до 0,0128 нМ) при 4 °С в течение 1 часа. После промывания $1 \times$ PBS/1% BSA добавляли вторичное антитело, меченное R-PE козлийное антитело к IgG человека (1:150, Jackson ImmunoResearch, 109-115-098), и инкубировали с клетками при 4°С в темноте в течение 1 часа. Антитела к D3 человека WT115-ВМК1 и WT115-ВМК2 использовали в качестве положительного контроля. Человеческое антитело изотипа IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки промывали и ресуспендировали в 4% параформальдегиде. MFI клеток измеряли с помощью проточного цитометра и анализировали с помощью FlowJo.

Как показано на Фиг. 2а и в таблице 1, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1, WT1156-P3R2-1C9-uIgG1, WT1156-P3R2-1H6-uIgG1 и WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 могут связываться с клетками, экспрессирующими D3 человека, что сопоставимо с WT115-ВМК2. EC50 антител WT1156 находится в диапазоне от 0,15 нМ до 0,52 нМ. EC50 WT115-ВМК1 и WT115-ВМК2 составляет 0,019 нМ и 0,54 нМ, соответственно.

Как показано на Фиг. 2b, WT1156-P3R2-1C2-z102-uIgG1 и WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 могут сильно связываться с клеткой, экспрессирующей D3 человека, с EC50 0,088 нМ и 0,14 нМ, соответственно. EC50 WT115-ВМК1 и WT115-ВМК2 составляет 0,03 нМ и 0,52 нМ, соответственно. Данные WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG и двух антител ВМК также обобщены в таблице 2.

Таблица 2. Сводная характеристика WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1.

Название антитела	FACS связывания D3 человека (EC50, нМ)	D3 яванского макака FACS связывания (EC50, нМ)	D3 мыши ELISA связывания (EC50, нМ)	Интернализация (EC50, нМ)
WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1	0,14	0,096	0,0075	12,2
WT115-ВМК1	0,03	0,019	0,0039	3,47
WT115-ВМК2	0,52	0,20	0,014	14,4

3.3 Связывание D3 яванского макака с помощью FACS

Клетки пула WT115-Flpin293.cPro1. (1×10^5 клеток/лунка) инкубировали с различными

концентрациями антител (4-кратное серийное разведение от 10 нМ до 0,00061 нМ) при 4 °С в течение 1 часа. После промывки 1×PBS/1% BSA вторичное антитело, меченное Alexa Fluor 647, козлийное антитело к IgG человека (1:150, Jackson ImmunoResearch, 109-605-098) добавляли и инкубировали с клетками при 4 °С в темноте в течение 1 часа. Антитела к D3 человека WT115-BMK1 и WT115-BMK2 использовали в качестве положительного контроля. Человеческое антитело изотипа IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки промывали 1×PBS/1% BSA, ресуспендировали в 4% параформальдегиде и инкубировали с клетками при 4°С в темноте в течение 0,5 часа. Затем замените буфер на 1×PBS/1% BSA и отфильтруйте клетки. MFI клеток измеряли с помощью проточного цитометра и анализировали с помощью FlowJo.

Как показано на Фиг. 3а и в таблице 1, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1, WT1156-P3R2-1C9-uIgG1, WT1156-P3R2-1H6-uIgG1 и WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 могут связываться с клеткой, экспрессирующей D3 яванского макака, что сопоставимо с WT115-BMK1 и WT115-BMK2. EC50 антител WT1156 находится в диапазоне от 0,12 нМ до 0,44 нМ. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 0,019 нМ и 0,20 нМ, соответственно.

Как показано на Фиг. 3b, WT1156-P3R2-1C2-z102-uIgG1, WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 и WT1156-P3R2-1H6-z100-uIgG1 могут сильно связываться с клеткой, экспрессирующей D3 яванского макака, с EC50 0,083 нМ, 0,096 нМ и 0,42 нМ, соответственно. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 0,019 нМ и 0,20 нМ, соответственно. Данные WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG и двух ВМК также обобщены в таблице 2.

3.4 Связывание D3 мыши с помощью ELISA

Планшеты предварительно покрывали 1 мкг/мл, 100 мкл на лунку WT115-MBP-mPro1.ECD.hFc при 4°С в течение ночи. Антиген разводили в покрывающем буфере из исходного раствора. На следующий день планшеты один раз промывали 1×PBST и блокировали добавлением 200 мкл 1×PBS/2% BSA. Антитела серийно разводили (5-кратное серийное разведение от 20 нМ до 0,000256 нМ) в блокирующем буфере. После 1-часового блокирования планшеты промывали 1×PBST 3 раза, а затем к планшетам добавляли антитело и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. В качестве положительного контроля использовали антитела к D3 человека WT115-BMK1-биотин и WT115-BMK2-биотин. Антитело WT114-BMK1-биотин использовали в качестве отрицательного контроля. Связывание антител с иммобилизованным D3 мыши обнаруживали с помощью вторичного антитела, меченого HRP, (Invitrogen, SNN1004), которое разводили в 1×PBS/2% BSA в концентрации 1:30000. После инкубации планшеты

промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявляли добавлением 100 мкл субстрата TMB, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2М HCl. Поглощение измеряли при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. Все образцы были протестированы в двух повторностях.

Как показано на Фиг. 4а, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1 может сильно связываться с D3 мыши, что сопоставимо с WT115-BMK1. EC50 WT1156-P3R2-1C2-uIgG1 составляет 0,0092 нМ. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 0,0039 нМ и 0,014 нМ, соответственно.

Как показано на Фиг. 4b, WT1156-P3R2-1C2-z102-uIgG1 и WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 могут сильно связываться с белком D3 мыши с EC50 0,0067 нМ и 0,0075 нМ, соответственно. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 0,0039 нМ и 0,014 нМ, соответственно. Данные WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG и двух ВМК также обобщены в таблице 2.

3.5 Интернализация

Клетки WT115-293F.hPro1.2E5 (4×10^4 клеток/лунка) высевали в 96-луночный планшет и среду удаляли из планшета после центрифугирования. Приготовили 1× конечную максимальную концентрацию первичных антител (5-кратное серийное разведение от 40 нМ до 0,00256 нМ или 5-кратное серийное разведение от 200 нМ до 0,0128 нМ) и разведения меченных pHrodo (реакционноспособный к амину, Thermo Fisher, P36011) вторичных антител (козьего фрагмента F(ab')₂ Affinipure к IgG человека, Jackson ImmunoResearch, 109-006-098, соотношение = 1:1 молекулы) добавляли в планшеты со средой для культивирования клеток и инкубировали при 37°C в течение 5 часов. Антитела к D3 человека WT115-BMK1 и WT115-BMK2 использовали в качестве положительного контроля. Человеческое антитело изотипа IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля. После инкубации клетки окрашивали реагентом (ядро клетки – Hoechst33342, 1000 нг/мл; цитоплазма – кальцеин АМ, разведение 1:2000 в DPBS) и инкубировали в планшете при 37°C в течение 15 минут. Наконец, клетки фотографировали с помощью Operatta CLS и анализировали эндоцитоз антител по параметру «Пятна на клетку».

Как показано на Фиг. 5а и в таблице 1, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1, WT1156-P3R2-1C9-uIgG1, WT1156-P3R2-1H6-uIgG1 и WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 продемонстрировали дозозависимую эффективность интернализации клетками, экспрессирующими D3 человека, что сопоставимо с WT115-BMK1 и WT115-BMK2. EC50 антител WT1156 находится в диапазоне от 0,46 нМ до 0,95 нМ. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 0,19 нМ и 0,58 нМ, соответственно.

Как показано на Фиг. 5b и в таблице 2, WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 продемонстрировали дозозависимую эффективность интернализации клетками, экспрессирующими D3 человека, с EC50 12,2 нМ. EC50 WT115-BMK1 и WT115-BMK2 составляет 3,47 нМ и 14,4 нМ, соответственно.

3.6 Кинетическая аффинность связывания антител к D3

Аффинность связывания антител к D3 с белком ВКД D3 человека определяли с помощью анализа методом SPR с использованием Biacore T200. Каждое протестированное антитело было зафиксировано на сенсорном чипе CM5 (GE) с иммобилизованным антителом к Fc IgG человека. WT115-hPro1.ECD.His в различных концентрациях вводили через сенсорный чип со скоростью потока 30 мкл/мин в течение фазы ассоциации 180 с, с последующей диссоциацией 3600 с. Чип регенерировали 10 mM глицином (pH 1,5) после каждого цикла связывания.

Как показано в таблице 3, экспериментальные данные для D3 человека аппроксимировали с помощью модели аффинности в стационарном состоянии. Экспериментальные данные WT-115-BMK1 к D3 человека аппроксимировали с помощью модели гетерогенного лиганда. Остальные экспериментальные данные аппроксимировали с помощью модели 1:1 с использованием анализа Ленгмюра. Сенсограммы пустой поверхности и буферного канала вычитали из исследуемых сенсограмм. Молекулярную массу 34 кДа использовали для расчета молярной концентрации аналита. Аффинность исследуемых антител к D3 человека показано в таблице 3.

Таблица 3. Кинетика связывания антител WBPT1156.

Название антитела	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (M)
WT1156-P3R2-1C2-uIgG1	1,92E+05	1,28E-05	6,68E-11
WT1156-P3R2-1H6-uIgG1	1,08E+05	<1,00E-05	<9,26E-11
WT1156-P8R2-1H1-uIgG1	2,00E+05	5,14E-05	2,57E-10
WT1156-P3R2-1C9-uIgG1	1,80E+05	2,38E-04	1,32E-09
WT1156-P3R2-1C2-z102-uIgG1	1,83E+05	1,78E-05	9,77E-11
WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1	1,85E+05	3,06E-05	1,65E-10
WT1156-P3R2-1H6-z100-uIgG1	8,02E+04	1,74E-05	2,17E-10
WT115-BMK1 (гетерогенный лиганд)	2,10E+06	2,65E-03	1,26E-09

	1,73E+06	1,50E-04	8,67E-11
WT115-BMK2	4,04E+05	3,98E-05	9,87E-11

3.7 Эпитоп-специфическая сортировка с помощью конкурентного ELISA

Планшеты предварительно покрывали 1 мкг/мл, 100 мкл на лунку WT115-hPro1.ECD.His при 4°C в течение ночи. Антиген разводили в покрывающем буфере (0,02 М Na₂CO₃ и 0,18 М NaHCO₃, pH 9,2) из исходного раствора. На следующий день планшеты один раз промывали 1×PBST и блокировали с использованием 200 мкл 1×PBS/2% BSA. Антитела VHH серийно разводили (5-кратное серийное разведение от 10 нМ до 0,00013 нМ) в блокирующем буфере и предварительно смешивали с постоянной концентрацией полных антител IgG (0,02 нМ). После 1-часового блокирования планшеты промывали 1×PBST 3 раза, а затем к планшетам добавляли смесь антитела VHH/полного антитела IgG и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Связывание полных антител IgG с иммобилизованным D3 человека обнаруживали с помощью меченого HRP вторичного антитела (Bethyl, A80-304P), которое разводили в 1×PBS/2% BSA в концентрации 1:10000. После инкубации планшеты промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявляли добавлением 100 мкл субстрата TMB, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2М HCl. Поглощение измеряли при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. Все образцы были протестированы в двух повторностях.

Как показано на Фиг. 6а, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1 не конкурирует с другими 3 антителами WBPT1156 за связывание с белком ВКД D3 человека, проверенным с помощью ELISA. И, как показано на Фиг. 6б, WT1156-P3R2-1H6-uIgG1 может конкурировать с WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 и WT1156-P3R2-1C9-uIgG1 за связывание с белком ВКД D3 человека. На Фиг. 6с показано, что WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 может конкурировать с WT1156-P3R2-1C9-uIgG1. Как показано на Фиг. 6д, антитела WBPT1156 4 не конкурируют с WT115-BMK1.

3.8 Связывание с помощью ELISA с укороченными белками D3

Связывающие эпитопы антител WT1156 тестировали с помощью ELISA с укороченными белками D3, как описано в 1.1 и на Фиг. 7с. Тесты ELISA проводили путем предварительного покрытия планшетов антителами или антигенами. Результаты показаны на Фиг. 7а и 7б, соответственно.

Для ELISA с предварительно нанесенными антителами на планшеты для ELISA предварительно наносили антитела в количестве 2 мкг/мл, по 100 мкл на лунку, при

температуре 4 °С в течение ночи. Антитело разводили в покрывающем буфере (0,02 М Na₂CO₃ и 0,18 М NaHCO₃, pH 9,2) из исходного раствора. На следующий день планшеты один раз промывали 1×PBST и блокировали 200 мкл 1×PBS/2% BSA. Затем добавляли постоянную концентрацию полноразмерного белка ВКД DLL (WT115-hPro1.ECD.His) (3 мкг/мл) или укороченных белков D3 (3 мкг/мл или 6 мкг/мл), разведенных в блокирующем буфере. После 1-часового блокирования планшеты промывали 1×PBST 3 раза, затем к планшетам добавляли антиген и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Связывание антигена с иммобилизованными антителами WBPT1156 детектировали с помощью меченого HRP вторичного антитела (GenScript, A00612), которое разводили в 1×PBS/2% BSA в концентрации 1:2000. После инкубации планшеты промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявлялся путем нанесения 100 мкл субстрата ТМВ. Цветную реакцию останавливали 2 М HCl и измеряли поглощение при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. Все образцы были протестированы в двух повторностях. Результаты показаны на Фиг. 7а.

Для ELISA с предварительно нанесенными антигенами на планшеты для ELISA наносили по 100 мкл на лунку WT115-hPro1.ECD.His (2 мкг/мл) или укороченных белков D3 (2 мкг/мл или 5 мкг/мл) при 4 °С в течение ночи. Антиген разводили в покрывающем буфере (0,02 М Na₂CO₃ и 0,18 М NaHCO₃, pH 9,2) из исходного раствора. На следующий день планшеты один раз промывали 1×PBST и блокировали с использованием 200 мкл 1×PBS/2% BSA. Постоянную концентрацию антитела (2 мкг/мл) разводили в блокирующем буфере. После 1-часового блокирования планшеты промывали 1×PBST 3 раза, затем к планшетам добавляли антитела и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Связывание антител с иммобилизованным D3 человека обнаруживали с помощью меченого HRP вторичного антитела (Bethyl, A80-304P), которое разводили в 1×PBS/2% BSA в концентрации 1:10000. После инкубации планшеты промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявляли добавлением 100 мкл субстрата ТМВ, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2М HCl. Поглощение измеряли при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. Все образцы были протестированы в двух повторностях. Результаты показаны на Фиг. 7б.

Как показано на Фиг. 7а и 7б, WT1156-P3R2-1C2-uIgG1 связывается с WT115-hPro1.V1.ECD.MBP.AVI.His, WT115-hPro1.V2.ECD.MBP.AVI.His и частично с WT115-hPro1.V3.ECD.MBP.AVI.His, но не по отношению к другим изоформам, что указывает на то, что его связывающий эпитоп расположен в EGF1-2. WT1156-P3R2-1C9-uIgG1 и WT1156-P3R2-1H6-uIgG1 связываются с WT115-hPro1.ECD.His, но не с укороченными изоформами

D3, что указывает на то, что связывающий эпитоп этих двух антител расположен на N-конце. Для WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 при тестировании с помощью ELISA с предварительно нанесенными антителами показано связывание с WT115-hPro1.ECD.His, но не с укороченными изоформами D3 (Фиг. 7а); при тестировании с помощью ELISA с предварительно нанесенными антигенами, как показано на Фиг. 7b, WT1156-P8R2-1H1-uIgG1 демонстрирует связывание с WT115-hPro1.V1.ECD.MBP.AVI.His и WT115-hPro1.V2.ECD.MBP.AVI.His, но не для других изоформ, что указывает на то, что его связывающий эпитоп, вероятно, расположен в N-term-DSL-EGF-1. Результаты связывания ELISA демонстрируют, что WT115-BMK1 связывается с доменом DSL, а WT115-BMK2 связывается с доменом EGF-3, что согласуется с результатами, приведенными в патентах США 2019/0046656 и WO 2017/021349, соответственно.

3.9 Связывание в пределах семейства для антител к D3 человека

Планшеты предварительно покрывали 1 мкг/мл, 100 мкл на лунку, WT115-hPro1.ECD.His, WT115-hPro2.ECD.His (D1 человека, SinoBiological, кат.: 11635-H08H) или WT115-hPro3.ECD.His (D4 человека, SinoBiological, кат.: 10171-H08H) при 4 °C в течение ночи. Антиген разводили в покрывающем буфере (0,02 М Na₂CO₃ и 0,18 М NaHCO₃, pH 9,2) из исходного раствора. На следующий день планшеты промывали один раз с использованием 1×PBST (PBS, содержащий 0,05% Твин-20) и блокировали путем добавления 200 мкл 1×PBS/2% BSA на лунку. Во время блокирования антитела BMK и WT1156 разводили до 10 нМ в блокирующем буфере и WT115-cAb (WT115-cAb1 — антитело к D1, приобретенное у SinoBiological, кат.: 11635-MM07; WT115-cAb2 — антитело к D4, приобретенное у SinoBiological, кат.: 10171-MM15) разбавляли в 1000 раз. После 1-часового блокирования планшеты промывали 1×PBST 3 раза, а затем к планшетам добавляли разбавленные антитела и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Связывание антител с иммобилизованным D3 человека обнаруживали с помощью кросс-адсорбированного конъюгированного с HRP козьего антитела к фрагменту Fc IgG человека (Bethyl, A80-304P) и конъюгированного с HRP кросс-адсорбированного антитела к фрагменту Fc IgG мыши (Bethyl, A90-231P), которые были разбавлены смесью 1×PBS/2% BSA в соотношении 1:10000. После инкубации планшеты промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявляли добавлением 100 мкл субстрата TMB, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2М HCl. Поглощение измеряли при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. WT115-cAb1 и cAb2 использовали в качестве положительного контроля против человеческих D1 и D4, соответственно. Человеческое антитело изотипа IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля. Все образцы

были протестированы в двух повторностях.

Как показано на Фиг. 8, антитела WBPT1156 не связываются с D1 человека или D4 человека.

3.10 Стабильность в человеческой сыворотке

Человеческую сыворотку получали из свежесывороточного материала здоровых доноров путем центрифугирования. Образцы разбавляли сывороткой, и объем сыворотки составлял более 90% от общего объема. Пять аликвот образца инкубировали при 37°C. Затем образцы собирали на 0 день, 1 день, 4 день, 7 день и 14 день, соответственно, и быстро замораживали до проведения анализа.

Стабильность образцов исследовали путем связывания с D3 человека с помощью ELISA. Вкратце, планшеты предварительно покрывали 100 мкл/лунку 1 мкг/мл WT115-hPro1.ECD.His при 4°C в течение ночи. На следующий день планшеты промывали один раз с использованием 1×PBST (PBS, содержащий 0,05% Твин-20) и блокировали путем добавления 200 мкл 1×PBS/2% BSA на лунку. Во время блокирования в планшеты добавляли исследуемые антитела в различных концентрациях (4-кратные серийные разведения от 3 нМ до 0,00018 нМ). Планшеты инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Связывание антител с иммобилизованным D3 человека обнаруживали с помощью кросс-адсорбированного конъюгированного с HRP козьего антитела к фрагменту Fc IgG человека (Bethyl, A80-304P) и конъюгированного с HRP кросс-адсорбированного антитела к фрагменту Fc IgG мыши (Bethyl, A90-231P), которые были разбавлены смесью 1×PBS/2% BSA в соотношении 1:5000. После инкубации планшеты промывали 1×PBST 6 раз. Цвет проявляли добавлением 100 мкл субстрата TMB, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2M HCl. Поглощение измеряли при 450 нм и 540 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра. Человеческое антитело изотипа IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля. Все образцы были протестированы в двух повторностях.

Как показано на Фиг. 9, после инкубации в сыворотке человека при 37°C в течение 14 дней профиль связывания WT1156-P3R2-1C2-z109-uIgG1 с белком D3 человека не изменился.

Специалисты в данной области техники также поймут, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не отступая от его сути или основных характеристик. Поскольку в приведенном выше описании настоящего изобретения описаны только иллюстративные варианты его осуществления, следует понимать, что возможны и

другие варианты осуществления, не выходящие за рамки объема настоящего изобретения. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, которые были подробно описаны в данном документе. Более того, рекомендуется обращаться к прилагаемой формуле изобретения в качестве указания на объем и содержание изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая D3 молекула, содержащая одиночный варибельный домен иммуноглобулина, причем одиночный варибельный домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VHH, как указано в SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 55 или 18.
2. Связывающая D3 молекула по п. 1, в которой CDR1, CDR2 и CDR3 соответствуют Kabat, Chothia, AbM, Contact, IMGT или любой их комбинации.
3. Связывающая D3 молекула по п. 1, в которой (i) CDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 4, 7 или 10; (ii) CDR2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, 5, 8 или 11; и (iii) CDR3 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9.
4. Связывающая D3 молекула по п. 1, в которой связывающая D3 молекула содержит:
 - (A) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 1; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 2; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 3;
 - (B) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 4; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 5; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 6;
 - (C) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 7; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 8; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 9; или
 - (D) CDR1, указанную в SEQ ID NO: 10; CDR2, указанную в SEQ ID NO: 11; и CDR3, указанную в SEQ ID NO: 6.
5. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–4, в которой одиночный варибельный домен содержит:
 - (A) аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55;
 - (B) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55, но сохраняющую специфическую аффинность связывания с D3; или
 - (C) аминокислотную последовательность с добавлением, удалением и/или заменой одной или более (например, 1, 2 или 3) аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55.
6. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–5, содержащая одну или более замен,

добавлений и/или удалений аминокислот в каркасных областях, например FRW1, FRW2, FRW3 и/или FRW4 одиночного варибельного домена.

7. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–6, в которой одиночный варибельный домен содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55.

8. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–7, дополнительно содержащая константный домен человеческого IgG.

9. Связывающая D3 молекула по п. 8, в которой константный домен человеческого IgG представляет собой константный домен человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, такой как константный домен человеческого IgG1 или его вариант.

10. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–9, которая обладает одним или более из следующих свойств:

(а) связывается с D3 человека, D3 яванского макака и/или D3 мыши с EC50 на уровне нМ по данным ELISA или FACS;

(b) демонстрирует дозозависимую эффективность интернализации в клетках, экспрессирующих D3 человека; и

(с) связывается с D3 человека с KD не более 0,1 нМ по данным SPR.

11. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–10, в которой связывающая D3 молекула представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

12. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–11, которая содержит одиночный варибельный домен, указанный в любой из SEQ ID NO: 12–18 и 55, и константный домен IgG, указанный в SEQ ID NO: 19.

13. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–12, которая представляет собой димер.

14. Слитый белок, содержащий связывающую D3 молекулу, по любому из пп. 1–13, слитую с гетерологичным пептидом, таким как антигенсвязывающий домен, нацеленный на другой антиген.

15. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую одиночный вариабельный домен связывающей D3 молекулы, определенной в любом из пп. 1–13.

16. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 15.

17. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 16.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну связывающую D3 молекулу, по любому из пп. 1–13, и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ получения связывающей D3 молекулы, по любому из пп. 1–13, включающий стадии:

- экспрессии связывающей D3 молекулы в клетке-хозяине по п. 15; и
- выделения связывающей D3 молекулы из клетки-хозяина.

20. Способ модуляции связанного с D3 иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту связывающей D3 молекулы по любому из пп. 1–13, или фармацевтической композиции по п. 18, так что у субъекта модулируется иммунный ответ.

21. Способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение эффективного количества связывающей D3 молекулы, по любому из пп. 1–13, или фармацевтической композиции по п. 18 субъекту, при этом злокачественное новообразование является положительным по D3 или сверхэкспрессирующим D3.

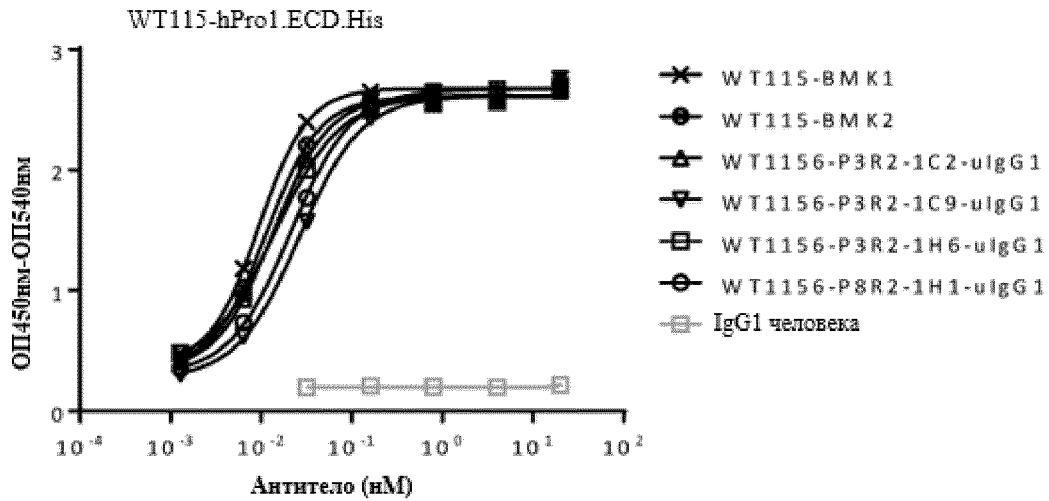
22. Способ по п. 21, в котором злокачественное новообразование выбрано из рака легкого и нейроэндокринной карциномы.

23. Способ по п. 22, в котором рак представляет собой SCLC или LCNEC.

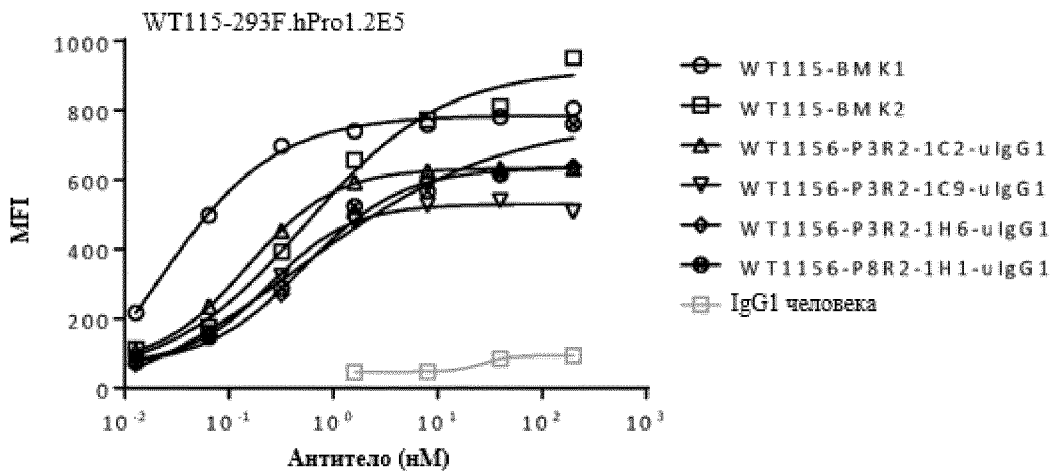
24. Применение связывающей D3 молекулы, по любому из пп. 1–13, при производстве лекарственного препарата для диагностики, предотвращения или лечения положительного по D3 рака.

25. Связывающая D3 молекула по любому из пп. 1–13 для применения в лечении или предотвращении положительного по D3 рака.

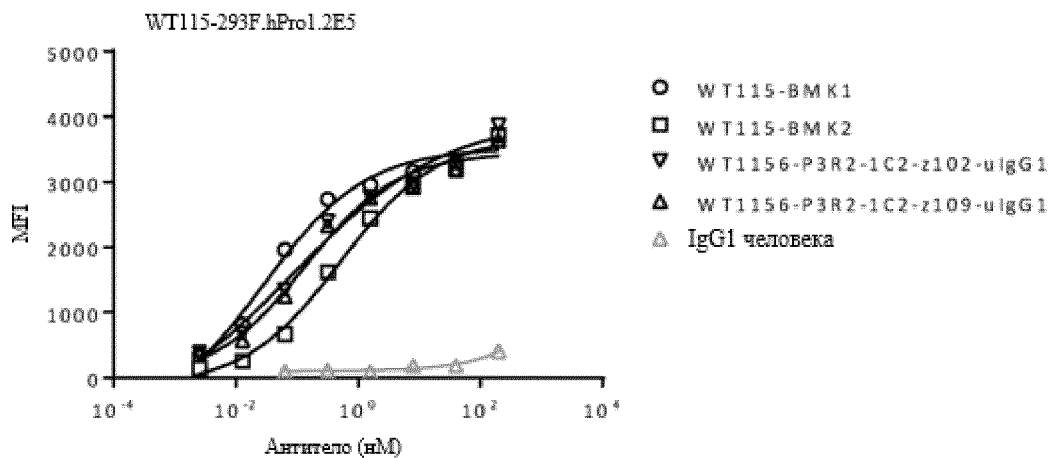
26. Набор для лечения или диагностики рака, содержащий контейнер, содержащий связывающую D3 молекулу, по любому из пп. 1–13.



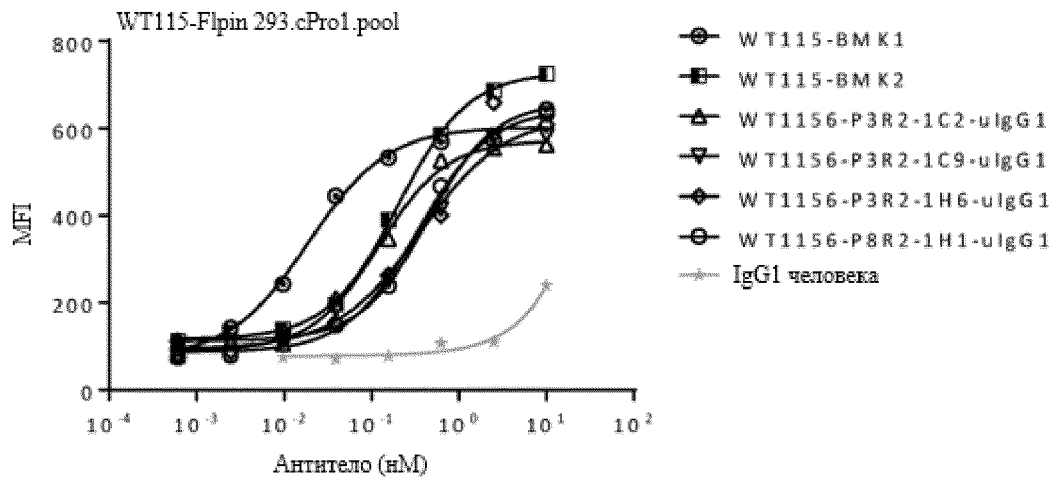
Фиг. 1



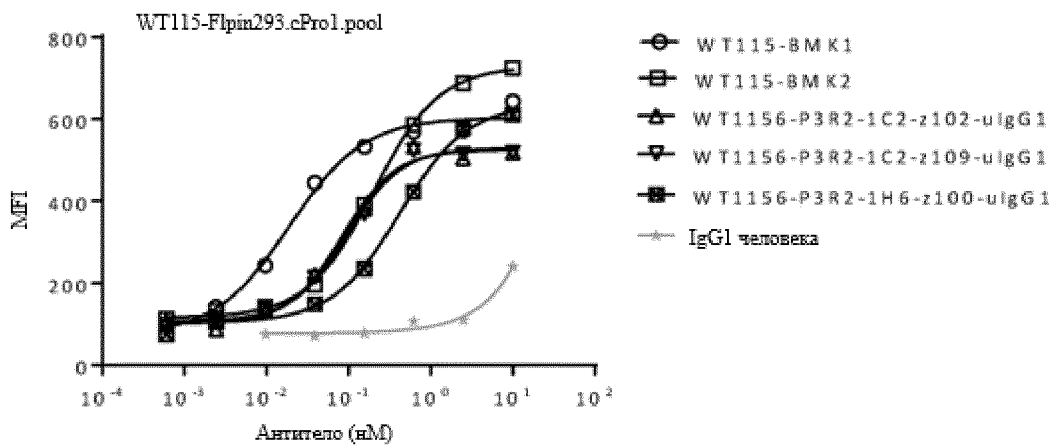
Фиг. 2а



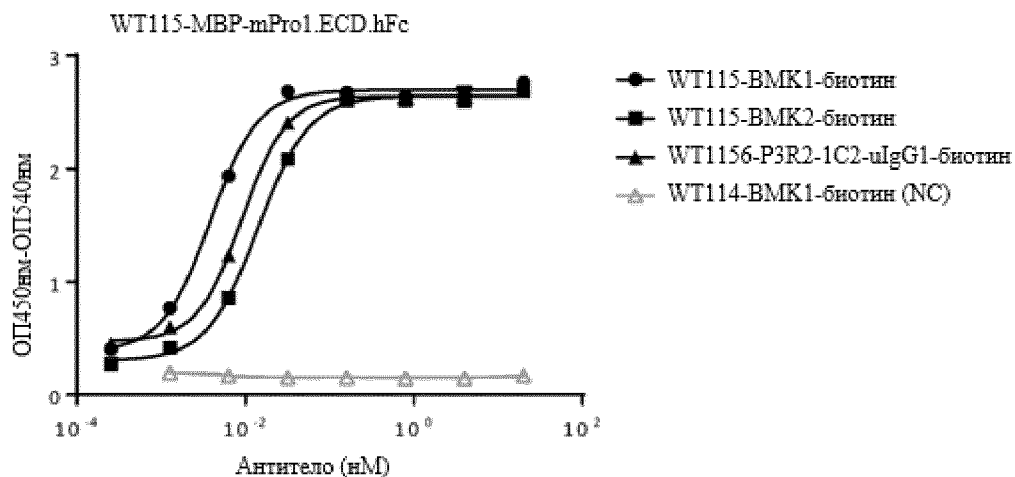
Фиг. 2b



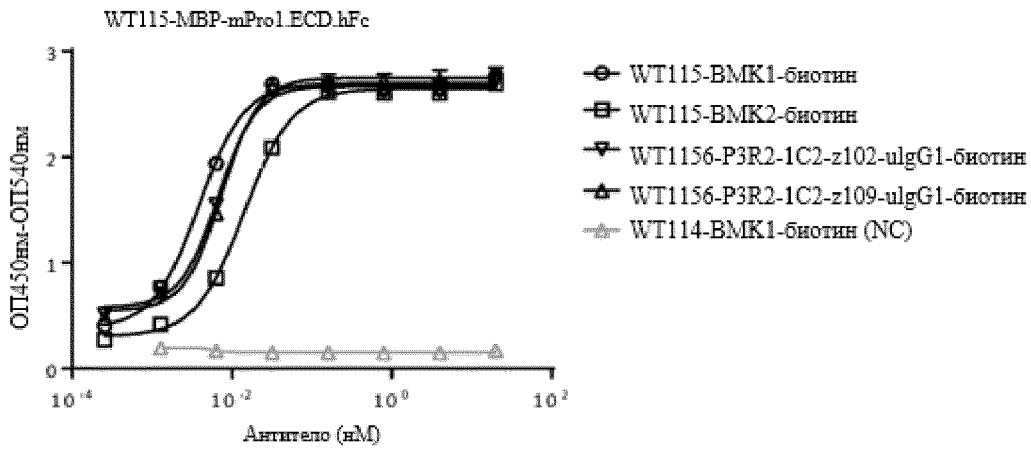
Фиг. 3а



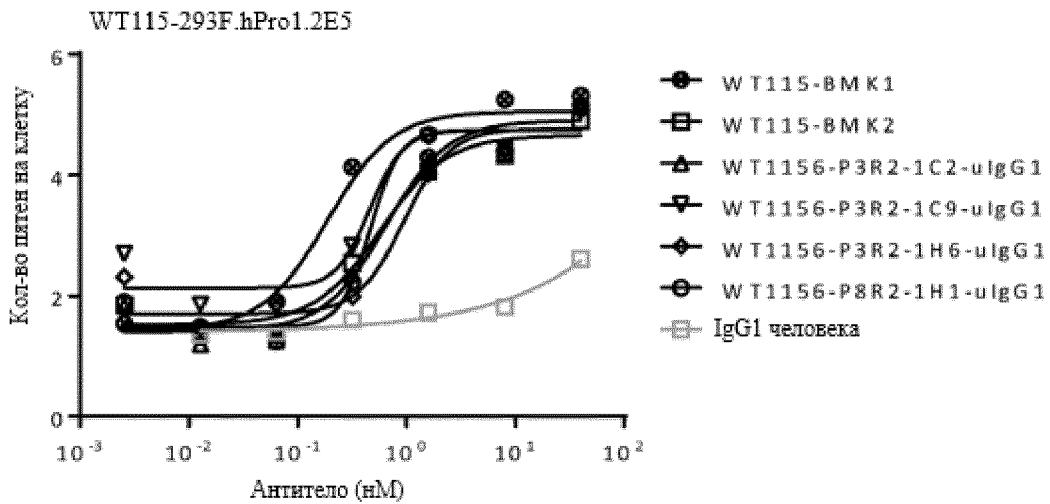
Фиг. 3b



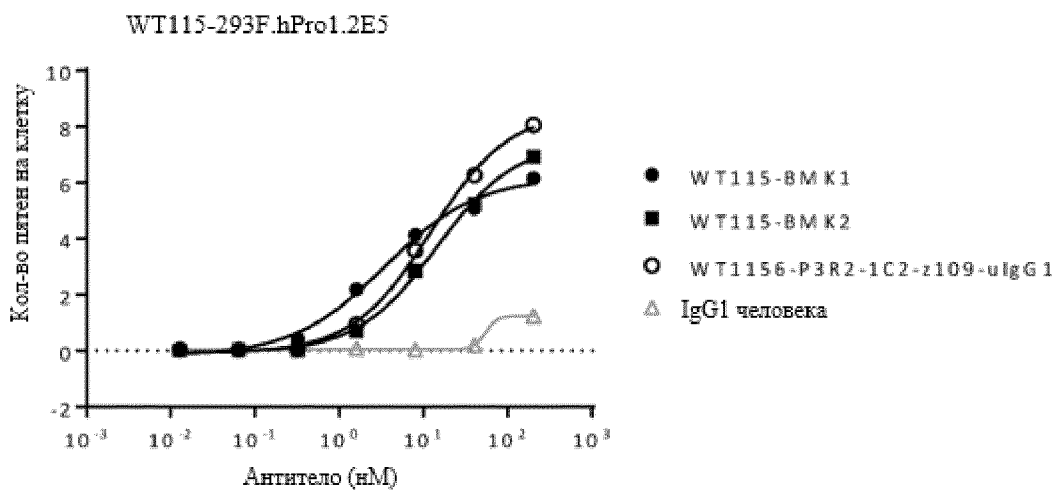
Фиг. 4а



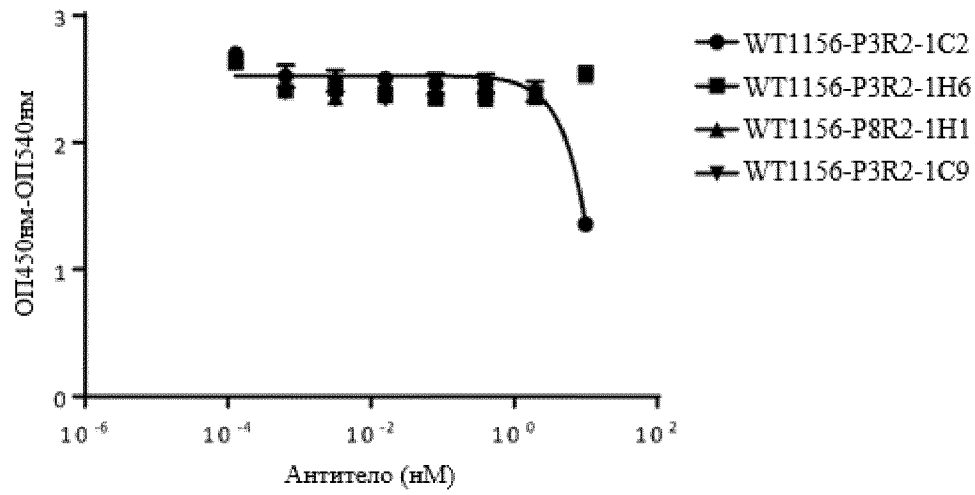
Фиг. 4b



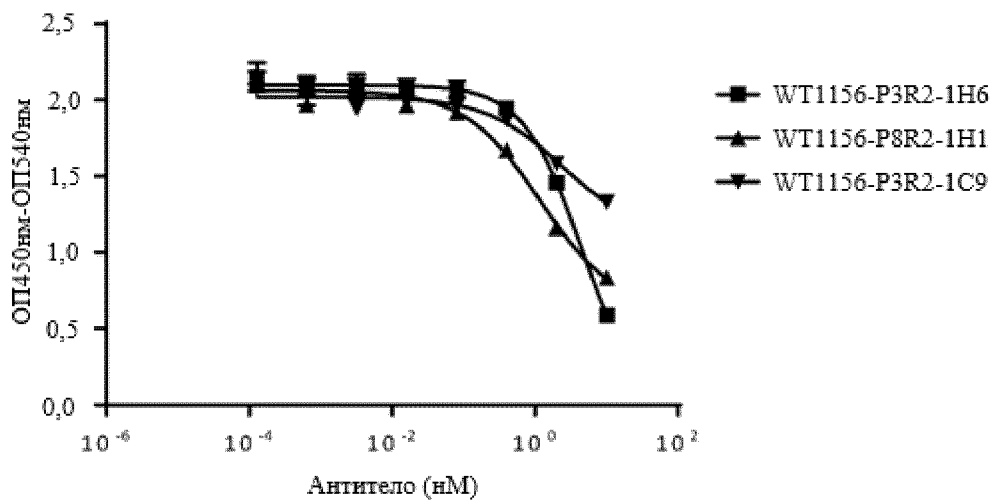
Фиг. 5а



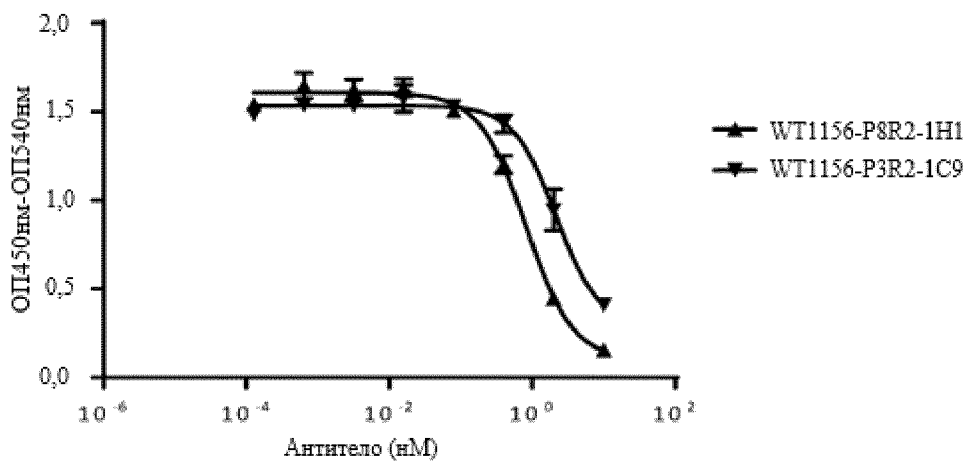
Фиг. 5b



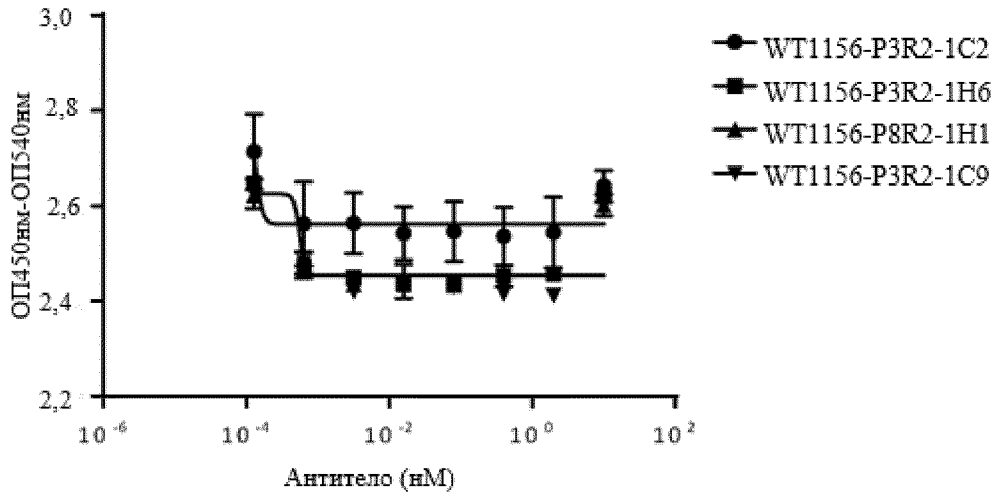
Фиг. 6а



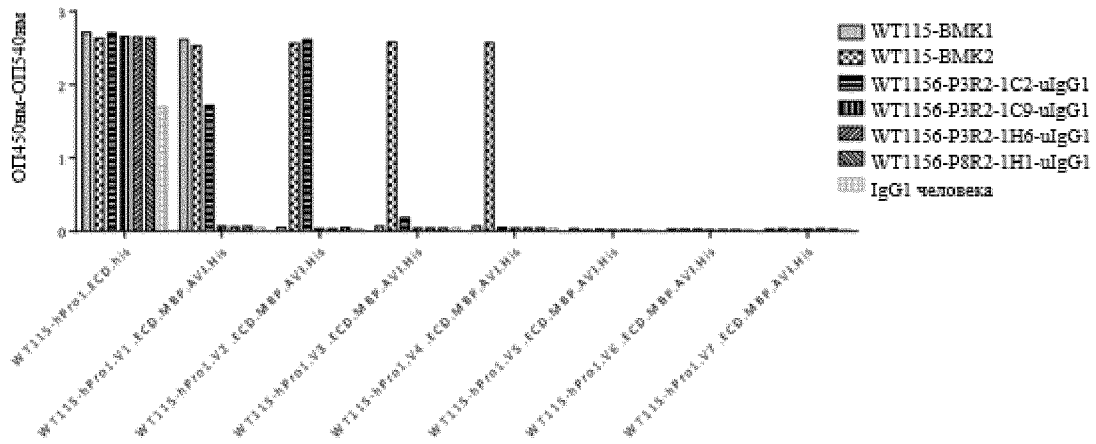
Фиг. 6б



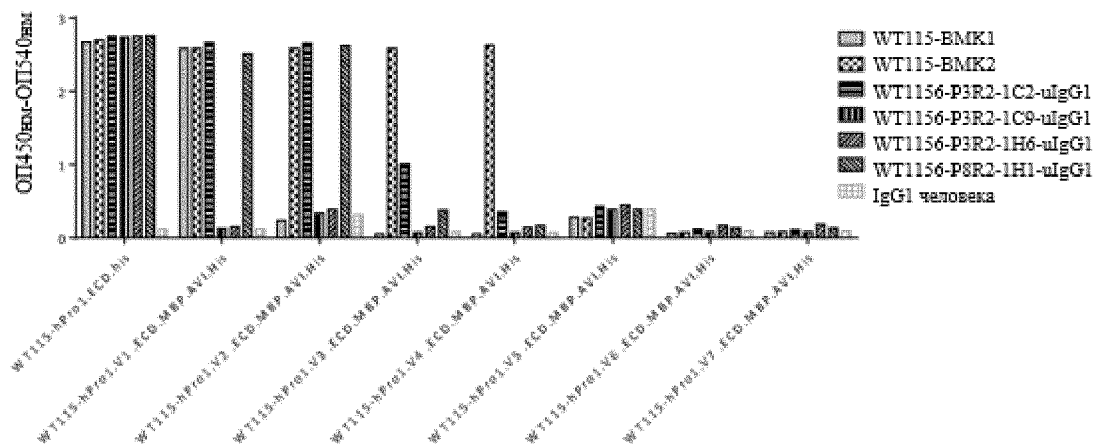
Фиг. 6с



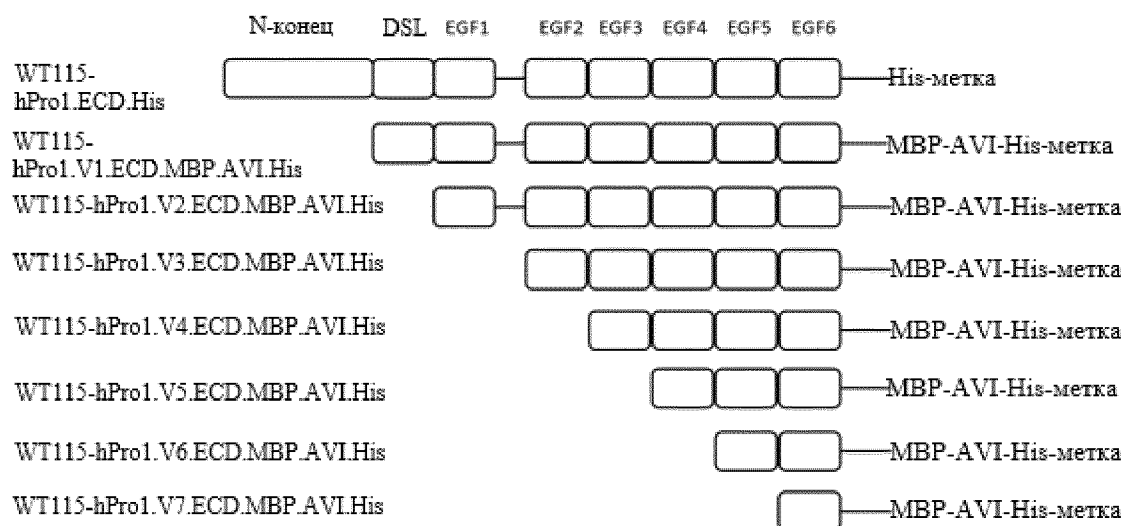
Фиг. 6d



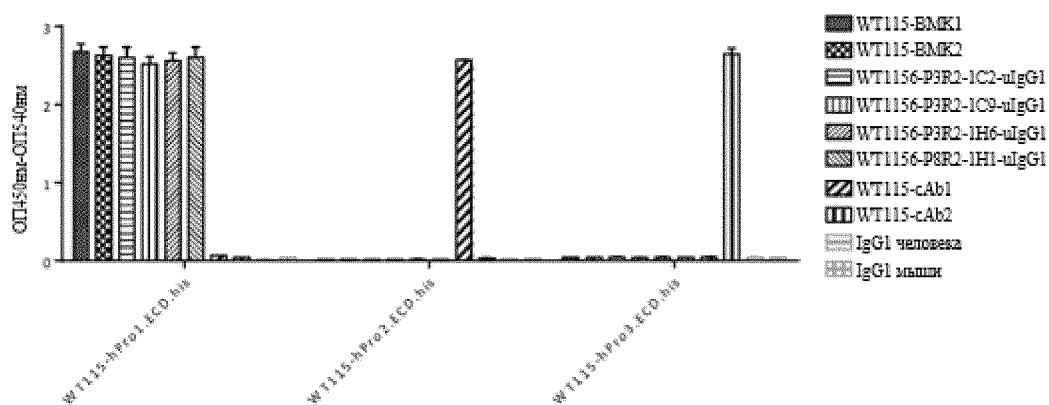
Фиг. 7a



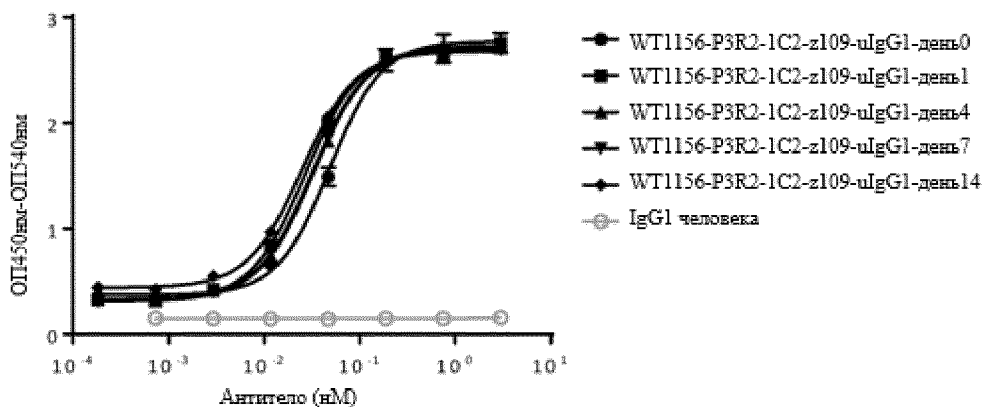
Фиг. 7b



Фиг. 7с



Фиг. 8



Фиг. 9

Антитела WT1156-P3R2 Иллюстративные домены VHH

Kabat	1	10	22	31--35	40	50--a-----60---65
AbM	1	10	22	26-----35	40	50--a-----58 65
Chothia	1	10	22	26----32	40	a-55 65
Contact	1	10	22	30---35	40	47-----a----58 65
IMGT	1		23	27-----38 41		56-----65 74
1C2	EVQLVESGGGLVQTDGSLRRLSCAAS GLTFSTATVG WFRQAPGKERDLIA AIP-AYYSTYYASSVKG					
1C2-z102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GLTFSTATVG WFRQAPGKGRELIA AIP-AYYSTYYASSVKG					
1C2-z109	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GLTFSTATVG WFRQAPGKGRELVA AIP-AYYSTYYASSVKG					
1C9	QVQLVESGGGLVQAGGSLRRLSCAAS GRTTSRYSMV WFRQAPGQEREFVG GNSAHDGRSAYADSVKG					
1H6	QVQLVESGGGLVQAGGSLRRLSCAAS GRTFRSYAMG WFRQAPGKEREFVA AISWIGGGTYADSVKG					
1H6-z100	QVQLVESGGGVVQPGGSLRRLSCAAS GRTFRSYAMG WFRQAPGKEREFVA AISWIGGGTYADSVKG					
1H1	EVDLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GRTASRYSMV WFRQAPGQEREFVG GNSAHDGRSAYTDSVKG					

Kabat	70	80	abc	90	95-----102	110
AbM	70	80	abc	90	95-----102	110
Chothia	70	80	abc	90	96-----101	110
Contact	70	80	abc	90	93-----101	110
IMGT	75	89			105-----117	
1C2	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAA DDTPSPSRSPFY----KH RGQGTQVTVSS					
1C2-z102	RFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA DDTPSPSRSPFY----KH RGQGTMTVTVSS					
1C2-z109	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCAA DDTPSPSRSPFY----KH RGQGTMTVTVSS					
1C9	RFTFSRDNAKNTGYLQMSSLRPDDTAVYYCAA DTNPPYGPPWSTPSEY EY WGHGTQVTVSS					
1H6	RFTISGDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SLLLRHGHMFEES---DY WGQGTQVTVSS					
1H6-z100	RFTISGDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA SLLLRHGHMFEES---DY WGQGTMTVTVSS					
1H1	RFTFSRDNAKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCAA DTNPPYGPPWSTPSEY EY WGHGTQVTVSS					

Фиг. 10