



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114478** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

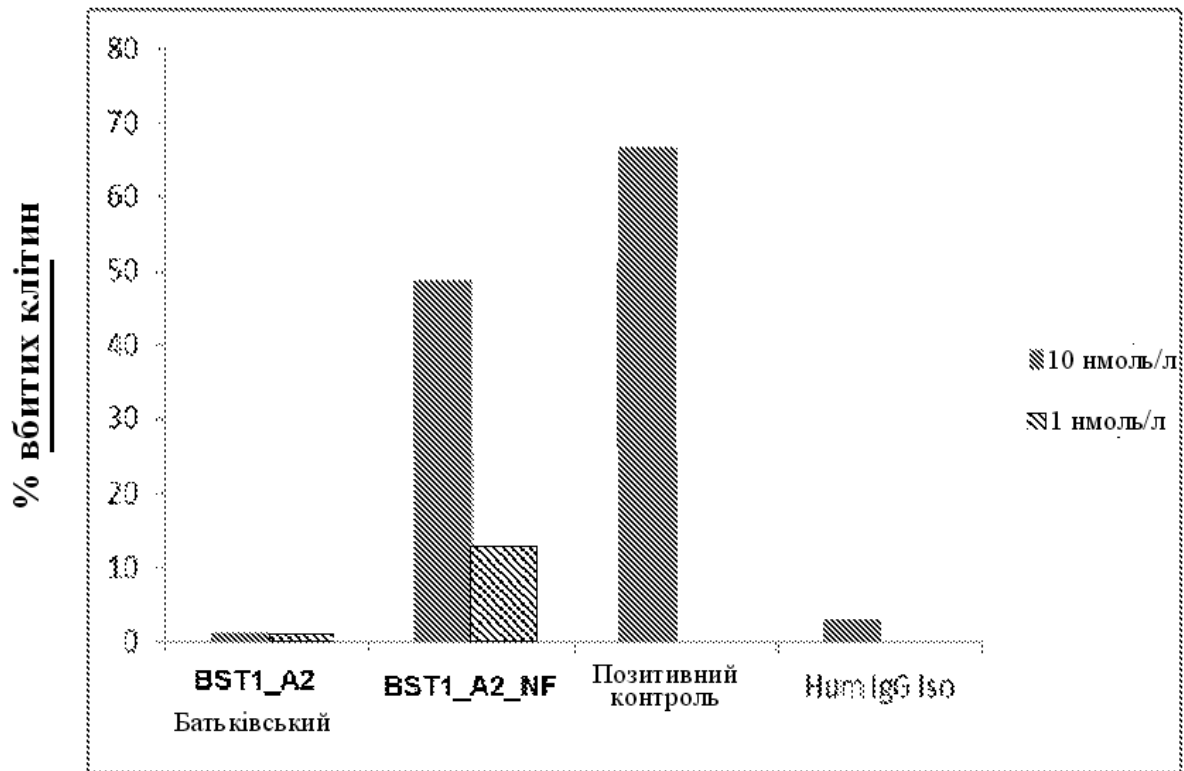
- (21) Номер заявки: **а 2014 00704**
- (22) Дата подання заявки: **28.06.2012**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.06.2017**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/502,167, PCT/US2012/044451**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **28.06.2011, 27.06.2012**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.04.2014, Бюл.№ 7**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.06.2017, Бюл.№ 12**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2012/044703, 28.06.2012**
- (72) Винахідник(и):  
**Рольфф Крістіан (DE/GB),  
Террітт Джонатан Александер (GB/US)**
- (73) Власник(и):  
**БЕРЛІН-ХЕМІ АГ,  
Glienicke Weg 125-127, 12489 Berlin, Germany (DE)**
- (74) Представник:  
**Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
JP 2005 295921 A, 27.10.2005.  
Sposato P. Analysis of human CD157 by murine monoclonal antibodies (MoAbs) / P. Sposato // Tissue antigens. - Vol. 55. - No. Supplement 1. - 2000. - P. 71 (abstract).  
Purified anti-mouse CD157 receptor monoclonal antibody // Cedarlane laboratories limited. 10 October 2008 (2008-10-10). [retrieved from the internet] URL: <http://www.cedarlanelabs.com> (retrieved on 2013-04-18).  
Ishihara K. BST-1/CD157 regulates the humoral immune responses in vivo / K. Ishihara [et. al.] // Chemical immunology 2000. - Vol. 75. - 2000. - P. 235-255.  
Kaisho T. Bst-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth / T. Kaisho [et. al.] // Proceedings of the national academy of sciences, USA. - Vol. 91. - June 1994. - P. 5325-5329.  
Okuyama Y. Human BST-1 expressed on myeloid cells functions as a receptor molecule / Y. Ocuyama [et. al.] // Biochemical and biophysical research communications. - Vol. 228. - No. 3. - 1996. - P. 838-845.  
M. Seki An immature rat lymphocyte marker CD157: striking differences in the expression between mice and rats / Seki M. [et. al.] // Immunology. - Vol. 203. - No. 5. - 2001. - P. 725-742.  
McNagny K. BP-3 alloantigen. A cell surface glycoprotein that marks early B lineage cells in mice / K. McNagny [et. al.] // The journal of immunology. - Vol. 141. - No. 8. - 1988. - P. 2551-2556.  
Ortolan E. Functional role and prognostic significance of CD157 in ovarian carcinoma // E. Ortolan [et. al.] // JNCI journal of the national cancer institute. - Vol. 102. - No. 15. - 2010. - P. 1160-1177.  
Lo Buono N. The CD157-integrin partnership controls transendothelial migration and adhesion of human monocytes // N. Lo Buono [et. al.] // Journal of biological chemistry. - Vol. 286. - No. 21. - 2011. - P. 18681-18691.  
Funaro A. CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration / A. Funaro [et al.] // Blood. - Vol. 104. - No. 13. - 2004. - P. 4269-4278.  
Todd The modulated expression of Mo5, a human myelomonocytic plasma membrane antigen / Todd [et. al.] // Blood. - Vol. 65. - No. 4. - 1985. - P. 964-973.  
Malavasi F. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology // F. Malavasi [et. al.] // Physiological reviews. - Vol. 88. - No. 3. - 2008. - P. 841-886.

UA 114478 C2

**(54) АНТИТИЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З BST1****(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла або його антигензв'язуючої частини, що специфічно зв'язується з BST1, нуклеїнової кислоти, що його кодує, клітини-хазяїна, що містить вказану нуклеїнову кислоту, способу одержання антитіла. Винахід також стосується способу лікування захворювання за допомогою даного антитіла, де вказаним захворюванням є рак, включаючи гостру мієлоїдну лейкемію (AML), В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію, рак молочної залози, рак кишечника, рак нирки, рак голови та шиї, рак легені, рак яєчників та рак підшлункової залози.

**Fig. 8a**

## ВСТУП

Представлений винахід, в цілому, відноситься до галузі імунології та молекулярної біології. Більш конкретно, передбаченими в даному документі є антитіла та інші терапевтичні протеїни, спрямовані проти ADP-рибозилциклази 2, нуклеїнових кислот, які кодують такі антитіла та

5 терапевтичні протеїни, способи одержання моноклональних антитіл та інших терапевтичних протеїнів, та способи лікування захворювань, таких як рак, опосередкований експресією/активністю ADP-рибозилциклази 2 та/або асоційований з аномальною експресією/активністю, відповідно лігандів.

## ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

10 ADP-рибозилциклаза 2 (також відома, як стромальний антиген кісткового мозку 1 (BST1) або CD157) є ліпід-фіксованим, біфункціональним ектоферментом, який каталізує рибонуклеотидну циклізацію та гідроліз. Вона генерує нуклеотидні вторинні месенджери циклічної ADP-рибози та ADP-рибози, які є здатними до активації вивільнення кальцію та фосфорилювання протеїну (FEBS Lett. 1994, 356(2-3):244-8). Це може підтримувати ріст В-клітин-попередників в

15 паракринному способі, можливо шляхом генерації NAD + метаболітів (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91:5325-5329; J Biol Chem. 2005, 280:5343-5349).

ADP-рибозилциклаза 2 та її гомолог, CD38, викликає, щоб діяти, як рецептори, що генерують метаболіти вторинного месенджера, що включає внутрішньоклітинне вивільнення Ca<sup>2+</sup> за допомогою ріанодинового рецептору (Biochem Biophys Res Commun. 1996, 228(3):838-

20 45). Крім того, вона може діяти через CD11b інтегрин, щоб впливати на вивільнення Ca<sup>2+</sup> через шлях PI-3 кінази (J Biol Regul Homeost Agents. 2007;21(1-2):5-11). Раніше не повідомлялось, що BST1 походить з мембран клітин гострої мієлоїдної лейкемії (AML), раку молочної залози, раку кишечника, раку нирки, раку легень або раку підшлункової залози та представляє собою протеїн нового терапевтичного та діагностичного значення. Крім того, показано, що BST1 експресується

25 на моноцитах та гранулоцитах, обидва з яких можуть бути асоційованими та активовані в захворюваннях, таких як астма, подагра, Крона, вовчак та діабет. Моноцити, крім того, є включеними в розвиток атеросклеротичних бляшок.

## КОРОТКИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

Представлене розкриття передбачає антитіла, спрямовані проти BST1, нуклеїнові кислоти, що кодують такі антитіла, та терапевтичні протеїни, способи одержання анти-BST1 антитіл та інших терапевтичних протеїнів, та способи лікування захворювань, таких як розлади опосередковані BST1, наприклад, рак людини, включаючи гостру мієлоїдну лейкемію (AML), В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію, рак молочної залози, рак кишечника, рак нирки, рак голови та шиї, рак легень, рак яєчників, рак підшлункової залози, та запальні захворювання людини, включаючи астму, подагру, Крона, вовчак, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит,

35 псоріаз, діабет та атеросклероз, надалі, називатимуться як "захворювання за винаходом".

Таким чином, представлене розкриття передбачає виділені антитіла, зокрема мишачі, химерні, гуманізовані та повністю людські моноклональні антитіла, які зв'язуються з BST1, та демонструють одну або більше бажану функціональну властивість. Такі властивості включають,

40 наприклад, високу афінність специфічного зв'язування з BST1. Крім того, передбаченими є способи лікування ряду захворювань, опосередкованих BST1, використовуючи антитіла, протеїни та композиції за представленим винаходом.

В одному варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має:

а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить:

45 i) першу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 10;  
ii) другу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 51;

iii) третю CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 14;

та

50 b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить:

i) першу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 16;  
ii) другу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 18;  
iii) третю CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 20.

В наступному варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має:

55 а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить:

i) першу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 9;  
ii) другу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 11;  
iii) третю CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 13;

та

60 b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить:

i) першу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 15;  
 ii) другу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 17;  
 iii) третю CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 19.  
 В наступному варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має:

5 а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить:  
 i) першу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 56;  
 ii) другу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 57;  
 iii) третю CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 58;

та

10 б) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить:  
 i) першу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 59;  
 ii) другу CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 60;  
 iii) третю CDR, яка містить послідовність, щонайменше, на 80 % ідентичну до SEQ ID NO: 61.  
 Епітоп(и), що розпізнаються антитілами за винаходом, є виявленими в поліпептидній  
 15 послідовності SEQ ID NO: 44.

В наступному варіанті втілення, антитіла за винаходом містять варіабельні CDR в порівнянні з батьківськими антитілами, описаними в даному документі. Таким чином, винахід передбачає варіантні антитіла, що містять варіантні варіабельні ділянки батьківського антитіла, де батьківське антитіло містить першу *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:10, другу *vh*CDR, яка містить послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 12 та SEQ ID NO: 51, третю *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:14, першу *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:16, другу *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO: 18; та третю *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:20, та, де варіантне антитіло має 1, 2, 3, 4, 5 або 6 амінокислотних заміщень разом в серії першої *vh*CDR, другої *vh*CDR, третьої *vh*CDR, першої *vl*CDR, другої *vl*CDR та третьої *vl*CDR, з від 1 до 4 заміщень для  
 20 конкретного застосування, та де антитіло зберігає специфічне зв'язування з BST1. Аналогічним чином, батьківське антитіло може містити першу *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:9, другу *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:11, третю *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:13; першу *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:15, другу *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO: 17, та третю *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:19. Крім того, батьківське антитіло може містити першу *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:56,  
 30 другу *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO: 57, третю *vh*CDR, яка містить SEQ ID NO:58, першу *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:59, другу *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:60, та третю *vl*CDR, яка містить SEQ ID NO:61.

В наступному варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 2, та послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 4.

В іншому варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 45, та послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 49.

В іншому варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 1, та послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 3.

В наступному варіанті втілення, виділене анти-BST1 антитіло має послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 52, та послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, як представлено в SEQ ID NO: 53.

45 В одному варіанті втілення, будь-які попередні антитіла мають Fc домен. В деяких варіантах втілення Fc домен є людським. В інших варіантах втілення, Fc домен є варіантним людським Fc доменом.

В іншому варіанті втілення, будь-які попередньо описані антитіла представляють собою моноклональні антитіла.

50 В одному варіанті втілення, будь-які попередньо описані антитіла додатково містять кон'югуючий агент. В деяких варіантах втілення кон'югуючий агент представляє собою цитотоксичний агент. В інших варіантах втілення кон'югуючий агент представляє собою полімер. В іншому варіанті втілення, полімером є поліетиленгліколь (ПЕГ). В іншому варіанті втілення, ПЕГ представляє собою похідну ПЕГ.

55 В одному варіанті втілення, виділене антитіло представляє собою антитіло, яке конкурує з будь-якими антитілами-попередниками за зв'язування з BST1.

В іншому варіанті втілення описаним є спосіб одержання будь-яких антитіл-попередників, де відповідно до способу одержують клітину-господар, яка містить одну або більше молекул нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіла-попередники, ріст клітини-господаря в культурі клітини-господаря, забезпечуючи умови для культури клітини-господаря, де експресується одна або  
 60

більше молекул нуклеїнової кислоти, та відновлення антитіла з клітини-господаря або культури клітини-господаря.

В одному варіанті втілення, будь-яке з описаних анти-BST1 антитіл передбачається в фармацевтичній композиції.

5 В іншому варіанті втілення, передбачається спосіб лікування або попередження захворювання, асоційованого з BST1, спосіб, за яким суб'єкту, який потребує цього, вводять ефективну кількість будь-якого з антитіл-попередників.

Представлений винахід передбачає виділене моноклональне антитіло, або його антиген-зв'язуючу частину, фрагмент антитіла або антитіло-міметик, які зв'язують епітоп на людському BST1, який розпізнається антитілом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO, яка вибрана з групи, що складається з 2, 1 та 52, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO, яка вибрана з групи, що складається з 4, 3, 54 та 55. В деяких варіантах втілення, виділене антитіло представляє собою повнорозмірне антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 ізотипу.

15 В деяких варіантах втілення, антитіло за представленим винаходом вибирають з групи, що складається з: цілого антитіла, фрагменту антитіла, гуманізованого антитіла, антитіла з одинарним ланцюгом, імунокон'югату, дефукозильованого антитіла та біспецифічного антитіла. Фрагмент антитіла може бути вибраним з групи, що складається з: частини-носія юнітіла, домену антитіла та нанотіла. В деяких варіантах втілення, імунокон'югати за винаходом містять терапевтичний агент. В іншому аспекті за винаходом, терапевтичний агент представляє собою цитотоксин або радіоактивний ізотоп.

В деяких варіантах втілення, антитіло за представленим винаходом вибирають з групи, що складається з: афібоді, DARPin, антикаліну, авімеру, версатіла та дуокаліну.

25 В альтернативних варіантах втілення, композиції за представленим винаходом містять виділене антитіло або його антиген-зв'язуючу частину та фармацевтично прийнятний носій.

В інших аспектах, антитіло за представленим винаходом представляє собою композицію, яка містить виділене антитіло або його антиген-зв'язуючу частину у відповідності з винаходом та фармацевтично прийнятний носій.

30 В деяких варіантах втілення, винахід включає молекулу виділеної нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий або легкий ланцюг виділеного антитіла або його антиген-зв'язуючої частини, яка зв'язується з епітопом на BST1 людини. Інші аспекти за винаходом включають вектори, які експресують, що містять такі молекули нуклеїнової кислоти, та клітини-господарі, що містять такі вектори, які експресують.

35 В деяких варіантах втілення, представлений винахід передбачає спосіб одержання анти-BST1 антитіла, де зазначений спосіб включає стадії: одержання клітини-господаря, яка містить одну або більше молекул нуклеїнової кислоти, які кодують антитіло за винаходом; ріст клітини-господаря в культурі клітини-господаря; забезпечення умов для культури клітини-господаря, за яких експресують одна або більше молекул нуклеїнової кислоти; та відновлення антитіла з клітини-господаря або з культури клітини-господаря.

40 В інших варіантах втілення, винахід стосується способів лікування або попередження захворювання, асоційованого з клітинами-мішенями, що експресують BST1, де зазначений спосіб включає стадію введення суб'єкту анти-BST1 антитіла, або його антиген-зв'язуючої частини, в кількості ефективній для лікування або попередження захворювання. В деяких аспектах, захворювання, яке лікують або попереджують за допомогою антитіл або їх антиген-зв'язуючої частини за винаходом, представляє собою рак людини. В деяких варіантах втілення, захворювання, які лікують або попереджують за допомогою антитіл за представленим винаходом, включають захворювання за винаходом.

45 В інших варіантах втілення, винахід стосується способів лікування або попередження захворювання, асоційованого з клітинами-мішенями, що експресують BST1, де зазначений спосіб включає стадію введення суб'єкту анти-BST1 антитіла, або його антиген-зв'язуючої частини, в кількості ефективній для лікування або попередження захворювання. В деяких аспектах, захворювання, яке лікують або попереджують за допомогою антитіл або його антиген-зв'язуючої частини за винаходом, представляє собою рак людини. В деяких варіантах втілення, захворювання, які лікують або попереджують за допомогою антитіл за представленим винаходом, представляють собою захворювання за винаходом.

50 В інших варіантах втілення, винахід стосується анти-BST1 антитіла, або його антиген-зв'язуючої частини, для застосування в лікуванні або попередженні захворювання, асоційованого з клітинами-мішенями, що експресують BST1. В деяких аспектах, захворювання, яке лікують або попереджують за допомогою антитіл, або їх антиген-зв'язуючої частини за

винаходом, представляє собою рак людини. В деяких варіантах втілення, захворювання, які лікують або попереджують за допомогою антитіл за представленим винаходом, представляють собою захворювання за винаходом.

В інших варіантах втілення, винахід стосується застосування анти-BST1 антитіла, або його антиген-зв'язуючої частини для виробництва лікарського засобу для застосування в лікуванні або попередженні захворювання, асоційованого з клітинами-мішенями, що експресують BST1. В деяких аспектах, захворювання, яке лікують або попереджують за допомогою лікарського засобу за винаходом, представляє собою рак людини. В деяких варіантах втілення, захворювання, які лікують або попереджують за допомогою лікарського засобу за представленим винаходом, представляють собою захворювання за винаходом.

В інших варіантах втілення, представлений винахід представляє собою виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, фрагмент антитіла, або антитіло-міметик, які зв'язують епітоп на BST1 людини, який розпізнається антитілом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, та варіабельної ділянки легкого ланцюга амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 4; варіабельної ділянки важкого ланцюга амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1, та варіабельної ділянки легкого ланцюга амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 3; варіабельної ділянки важкого ланцюга амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 52, та варіабельної ділянки легкого ланцюга амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 53. В наступних аспектах, антитіло вибирають з групи, що складається з: цілого антитіла, фрагменту антитіла, гуманізованого антитіла, антитіло з одинарним ланцюгом, імунокон'югату, дефукозильованого антитіла та біспецифічного антитіла. В наступних аспектах за винаходом, фрагмент антитіла вибирають з групи, що складається з: юнітіла, домену антитіла та нанотіла. В деяких варіантах втілення, антитіло-міметик вибирають з групи, що складається з: афібоді, DARPIn, антикаліну, авімеру, версатіла та дуокаліну. В наступних варіантах втілення, композиція містить виділене антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, та фармацевтично прийнятний носій.

В деяких варіантах втілення, представлений винахід представляє собою молекулу виділеної нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий або легкий ланцюг виділеного антитіла або його антиген-зв'язуючу частину антитіла за винаходом, та, в наступних аспектах, можуть включати вектор, що експресує, який містить такі нуклеїнові кислоти, та клітини-господарі, що містять такі вектори, які експресують.

Інший варіант втілення за представленим винаходом представляє собою гібридому, яка експресує антитіло або його антиген-зв'язуючу частину будь-якого одного з антитіл за винаходом.

Інші аспекти за винаходом стосуються способів одержання антитіл за винаходом, які включають стадії:

- імунізації тваринного BST1 пептидом;
- відновлення мРНК з В клітин вказаного тваринного;
- перетворення вказаної мРНК в кДНК;
- експресування вказаної кДНК в фагах, таким чином, що анти-BST1 антитіла, кодовані вказаною кДНК, є присутніми на поверхні вказаних фагів;
- відбір фагів, які відтворюють анти-BST1 антитіла;
- відновлення молекул нуклеїнової кислоти з вказаних виділених фагів, які кодують вказані анти-BST1 імуноглобуліни;
- експресування вказаних відновлених молекул нуклеїнової кислоти в клітині-господарі; та
- відновлення антитіла з вказаної клітини-господаря, яке зв'язується з BST1.

В деяких аспектах за винаходом, виділене моноклональне антитіло, або його антиген-зв'язуюча частина, зв'язують епітоп на BST1 поліпептиді, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, яка розпізнається антитілом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: вибрану з групи, яка складається з 2, 1 або 52, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: вибрану з групи, яка складається з 4, 3 або 53.

Інші особливості та переваги представленого винаходу будуть розкриті з наступного детального опису та прикладів, які не повинні бути витлумачені як обмеження. Сутність всіх посилок, запису Genbank, патентів та опублікованих заявок на патент, які цитуються впродовж всієї даної заявки, певно включені в даний документ у вигляді посилання.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1a показує вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR1 ділянок A1 важкого ланцюга (SEQ ID NO:21) з нуклеотидами 138392-138424 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-80 (SEQ ID NO:33); вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR1 ділянок A2 важкого ланцюга (SEQ ID NO:22) з нуклеотидами 153362-153394 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-39 (SEQ ID NO:35).

Фігура 1b показує вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR2 ділянок A1 важкого ланцюга (SEQ ID NO:23) з нуклеотидами 138461-138511 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-80 (SEQ ID NO:34); вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR2 ділянок A2 важкого ланцюга (SEQ ID NO:24) з нуклеотидами 153431-153481 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-39 (SEQ ID NO:36).

Фігура 2a показує вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR1 ділянок A1 легкого ланцюга (SEQ ID NO:27) з нуклеотидами 496-531 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-74 (SEQ ID NO:37); вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR1 ділянок A2 легкого ланцюга (SEQ ID NO:28) з нуклеотидами 523-552 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-55 (SEQ ID NO:40).

Фігура 2b показує вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR2 ділянок A1 легкого ланцюга (SEQ ID NO:29) з нуклеотидами 577-597 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-74 (SEQ ID NO:38); вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR2 ділянок A2 легкого ланцюга (SEQ ID NO:30) з нуклеотидами 598-618 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-55 (SEQ ID NO:41).

Фігура 2c показує вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR3 ділянок A1 легкого ланцюга (SEQ ID NO:31) з нуклеотидами 691-718 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-74 (SEQ ID NO:39); вирівнювання нуклеотидних послідовностей CDR3 ділянок A2 легкого ланцюга (SEQ ID NO:32) з нуклеотидами 715-739 нуклеотидної послідовності мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-55 (SEQ ID NO:42).

Фігура 3a та 3b показують результати проточного цитометричного аналізу BST1 на A549 та H226 клітинах.

Фігура 4a та 4b показують інтерналізацію анти-BST1 моноклональних антитіл A549 та H226 клітинами, використовуючи MabZAP аналіз.

Фігура 5 показує вирівнювання залишків 21-137 SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 45), гуманізованого V<sub>H</sub> ланцюга з CDR ділянками (виділені товстим шрифтом) SEQ ID NO: 2, перенесеними у відповідні положення зародкової лінії людини BF238102 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 46), із зародковою лінією людини BF238102 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 47). Залишки, які демонструють значний контакт з CDR ділянками, заміщеними відповідними людськими залишками. Дані заміщення (підкреслені) виконували в положеннях 30, 48, 67, 71 та 100.

Фігура 6 показує вирівнювання залишків 22-128 SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 48), гуманізованого V<sub>L</sub> ланцюга з CDR ділянками (виділені товстим шрифтом) SEQ ID NO: 4, перенесеними у відповідні положення зародкової лінії людини X72441 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 49) із зародковою лінією людини X72441 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 50). Залишки, які демонструють значний контакт з CDR ділянками, заміщеними відповідними людськими залишками. Дане заміщення (підкреслене) виконували в положення 71.

Фігура 7 показує вирівнювання CDR2 ділянки A2 важкого ланцюга (SEQ ID NO: 12) з можливими амінокислотними заміщеннями (SEQ ID NO: 51) без втрати антиген-зв'язуючої афінності.

Фігура 8 показує BST1\_A2 та BST1\_A2\_NF вибір антитіла в залежності від відповіді на клітинну цитотоксичність (ADCC) в присутності ефektorних клітин.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Представлене розкриття стосується виділених антитіл, включаючи, але не обмежуючись цим, моноклональні антитіла, наприклад, які специфічно зв'язують BST1 з високою афінністю, як описано в даному документі. В певних варіантах втілення, антитіла, що передбачаються, мають специфічні структурні особливості, такі як CDR ділянки з певними амінокислотними послідовностями. Дане розкриття передбачає виділені антитіла (які, як описано нижче, включає широку різноманітність добре відомих структур, похідних, міметиків та кон'югатів), способи створення вказаних молекул та фармацевтичні композиції, що містять вказані молекули та фармацевтичний носій. Дане розкриття, крім того, стосується способів застосування молекул, таких як детектування BST1, а також лікування захворювань, асоційованих з експресією BST1, таких як BST1 експресовані на пухлинах та при запальних захворюваннях, включаючи захворювання за винаходом.

Для того, щоб представлене розкриття могло бути більш легко зрозумілим, спочатку визначають деякі терміни. Додаткові визначення наведені по всьому детальному опису.

Гуманізовані та мишачі антитіла за даним розкриттям можуть, в певних випадках, перехресно реагують з BST1 від інших видів, ніж людина. В певних варіантах втілення, антитіла можуть бути повністю специфічними для одного або більше людського BST1, та не можуть демонструвати види або інші типи нелюдської перехресної реактивності.

Термін "імунна відповідь" стосується дії, наприклад, лімфоцитів, антигену, що є присутнім в клітинах, фагоцитарних клітин, гранулоцитів та розчинних макромолекул, що продукуються клітинами, описаними вище, або печінкою (включаючи антитіла, цитокіни та комплемент), що в результаті призводить до селективного пошкодження, руйнуванню або видаленню з тіла людини, враженого патогенами, клітинами або тканинами, інфікованими патогенами, раковими клітинами або, у випадках аутоімунності або патологічного запалення, нормальних людських клітин або тканин.

Термін "сигнальний шлях трансдукції" стосується біохімічного взаємозв'язку між різними молекулами сигнальної трансдукції, які приймають участь в передачі сигналу від однієї частини клітини до іншої частини клітини. Як використовується в даному документі, вираз "клітинний поверхневий рецептор" включає, наприклад, молекули та комплекси здатні до отримання сигналу та передачі такого сигналу через плазмову мембрану клітини. Прикладом "клітинного поверхневого рецептору" є BST1.

Термін "антитіло", як згадується в даному документі, включає, як мінімум, антиген-зв'язуючий фрагмент (тобто "антиген-зв'язуючу частину") імуноглобуліну.

Визначення "антитіло" включає, але не обмежується цим, повнорозмірні антитіла, фрагменти антитіл, антитіла з одинарним ланцюгом, біспецифічні антитіла, мінітіла, домени антитіл, синтетичні антитіла (іноді, називають в даному документі як "антитіла-міметики"), химерні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла злиття (іноді, які називають, як "антитіла-кон'югати") та фрагменти та/або похідні кожного, відповідно. Як правило, повнорозмірне антитіло (іноді, які називають, як "цілі антитіла") стосується глікопротеїну, який може містити, щонайменше, два важких (H) ланцюга та два легких (L) ланцюга взаємозв'язаних за рахунок дисульфідних зв'язків. Кожен важкий ланцюг міститься в варіабельній ділянці важкого ланцюга (скорочено в даному документі, як  $V_H$ ) та константній ділянці важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга міститься в трьох доменах,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  та  $C_{H3}$ . Кожен легкий ланцюг міститься в варіабельній ділянці легкого ланцюга (скорочено в даному документі, як  $V_L$  або  $V_K$ ) та константній ділянці легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга міститься в одному домені,  $C_L$ .  $V_H$  та  $V_L/V_K$  ділянки, крім того, можуть бути підрозділені на ділянки гіперваріабельності, термінованої комплементарності визначаючих ділянок (CDR), розсіяних з ділянками, які є більш збереженими, термінованими структурними ділянками (FR). Кожна  $V_H$  та  $V_L/V_K$  міститься в трьох CDR та чотирьох FR, впорядкованих від аміно-кінця до карбокси кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні ділянки важких та легких ланцюгів містять зв'язуючий домен, який взаємодіє з антигеном. Константні ділянки антитіла можуть бути посередниками зв'язування імуноглобуліну з тканинами господаря або факторами, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) та перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

В одному варіанті втілення, антитіло представляє собою фрагмент антитіла. Специфічні фрагменти антитіл включають, але не обмежуються цим, (i) Fab фрагмент, який складається з  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  та  $C_{H1}$  доменів, (ii) Fd фрагмент, який складається з  $V_H$  та  $C_{H1}$  доменів, (iii) Fv фрагмент, який складається з  $V_L$  та  $V_H$  доменів одного антитіла, (iv) dAb фрагмент, який складається з одного варіабельного домену, (v) виділені CDR ділянки, (vi)  $F(ab')_2$  фрагменти, бівалентний фрагмент, який містить два зв'язаних Fab фрагмента, (vii) молекули з одинарним ланцюгом Fv (scFv), де  $V_H$  домен та  $V_L$  домен є зв'язаними за рахунок пептидного лінкеру, який дозволяє двом доменам зв'язуватися з утворенням антиген-зв'язуючого сайту, (viii) біспецифічні димери з одинарним ланцюгом Fv, та (ix) "діатіла" або "триотіла", мультівалентні або мультиспецифічні фрагменти, сконструйовані за рахунок генного злиття. Фрагменти антитіл можуть бути модифіковані. Наприклад, молекули можуть бути стабілізовані за рахунок включення дисульфідних зв'язків в зв'язування  $V_H$  та  $V_L$  доменів. Приклади форматів та архітектур антитіла описані в Holliger & Hudson (2006) Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, та Carter (2006) Nature Reviews Immunology 6:343-357, та посилання, які цитуються в даному документі, всі повністю включені у вигляді посилання.

Представлене розкриття передбачає аналоги антитіла. Такі аналоги можуть містити багато структур, включаючи, але не обмежуючись цим, повнорозмірні антитіла, фрагменти антитіл, біспецифічні антитіла, мінітіла, домени антитіл, синтетичні антитіла (іноді, які називають, в даному документі як "антитіла-міметики"), антитіла злиття, антитіла-кон'югати, та фрагменти з кожного, відповідно.

В одному варіанті втілення, імуноглобулін містить фрагмент антитіла. Специфічні фрагменти антитіл включають, але не обмежуються цим, (i) Fab фрагмент, який складається з VL, VH, CL та CH1 доменів, (ii) Fd фрагмент, який складається з VH та CH1 доменів, (iii) Fv фрагмент, який складається з VL та VH доменів одного антитіла; (iv) dAb фрагмент, який складається з одного варіабельного, (v) виділені CDR ділянки, (vi) F(ab')<sub>2</sub> фрагменти, бівалентний фрагмент, яка містить два зв'язаних Fab фрагмента, (vii) молекули з одинарним ланцюгом Fv (scFv), де VH домен та VL домен є зв'язаними за рахунок пептидного лінкеру, який дозволяє двом доменам зв'язуватися з утворенням антиген-зв'язуючого сайту, (viii) біспецифічні димери з одинарним ланцюгом Fv, та (ix) "діатіла" або "триотіла", мультівалентні або мультиспецифічні фрагменти, сконструйовані за рахунок генного злиття. Фрагменти антитіл можуть бути модифіковані. Наприклад, молекули можуть бути стабілізовані за рахунок включення дисульфідних зв'язків в зв'язування VH та VL доменів. Приклади форматів та архітектур антитіла описані в Holliger & Hudson, 2006, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136, та Carter 2006, *Nature Reviews Immunology* 6:343-357 та посилання, які цитуються в даному документі, всі повністю включені у вигляді посилання.

Імуноглобулінові гени, що розпізнаються, наприклад, у людей, включають каппа (κ), лямбда (λ), та генетичні локуси важкого ланцюга, які разом містять різноманітні гени варіабельної ділянки, та гени мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), сигма (σ) та альфа (α) константної ділянки, які кодують IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, та IgG4), IgE, та IgA (IgA1 та IgA2) ізотипи, відповідно. Мається на увазі, що антитіло в даному документі включає повнорозмірні антитіла та фрагменти антитіл, та може відноситись до природного антитіла з будь-якого організму, сконструйованого антитіла або антитіла, створеного рекомбінантно для експериментальних, терапевтичних або інших цілей.

В одному варіанті втілення, антитіло, розкрите в даному документі, може бути мультиспецифічним антитілом, та, зокрема, біспецифічним антитілом, також, яке іноді називають, як "діатіло". Існують антитіла, які зв'язують два (або більше) різних антигени. Діатіла можуть бути отримані різними шляхами, відомими в даній галузі з рівня техніки, наприклад, одержані з хімічних або з гібридних гібридом. В одному варіанті втілення, антитіло представляє собою мінітіло. Мінітіла представляють собою мінімізовані антитіло-подібні протеїни, що містять scFv, зв'язані з C<sub>H</sub>3 доменом. В деяких випадках, scFv можуть бути зв'язаними з Fc ділянкою, та можуть включати декілька або всі шарнірні ділянки. Для опису мультиспецифічних антитіл, дивись Holliger and Hudson (2006) *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 та посилання, які цитуються в даному документі, всі повністю включені у вигляді посилання.

Під "CDR", як використовується в даному документі, мають на увазі "ділянку, що визначає комплементарність" варіабельного домену антитіла. Систематична ідентифікація залишків, включених в CDR, розроблена Кабатом (Kabat) (Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) та альтернативно Чотія (Chothia) [Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883; Al-Lazikani et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948]. Для цілей за представленим винаходом, CDR визначають, як ненабагато менший набір залишків, ніж CDR, визначений Чотія (Chothia). Визначено, що в даному документі V<sub>L</sub> CDR включають залишки в положеннях 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2) та 91-97 (CDR3), де нумерація представлена у відповідності з Чотія. Так як V<sub>L</sub> CDR, як визначено за Чотія та Кабатом, є ідентичними, нумерація положень даного V<sub>L</sub> CDR також представлена у відповідності з Кабатом. Визначено, що в даному документі V<sub>H</sub> CDRs включають залишки в положеннях 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2), та 95-102 (CDR3), де нумерація представлена у відповідності з Чотія. Дані V<sub>H</sub> CDR положення відповідають положенням Кабата 27-35 (CDR1), 52-56 (CDR2), та 95-102 (CDR3).

Як буде оцінено кваліфікованим спеціалістом в даній галузі, CDR, розкриті в даному документі, можуть, крім того, включати варіанти, наприклад, при обернено мутуючих CDR, розкритих в даному документі, в різних структурних ділянках. Як правило, ідентичність нуклеїнових кислот між індивідуальними варіантами CDR становить, щонайменше, 80 % до послідовностей, описаних в даному документі, та більш типово з переважно зростаючими ідентичностями, щонайменше, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % та майже 100 %. Аналогічним чином, "відсоток (%) ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти" по відношенню до послідовності нуклеїнової кислоти, що зв'язує протеїни, ідентифікованих в даному документі, визначають як відсоток нуклеотидних залишків в кандидатну послідовність, яка є ідентичною за нуклеотидними залишками в кодуючій послідовності антиген-зв'язуючого протеїну. Специфічний спосіб використовує BLASTN модуль WU-BLAST-2 набору значених параметрів за замовчуванням, з перекриттям меж та

перекриттям набору фрагментів 1 та 0,125, відповідно, та без вибраних фільтрів.

Як правило, ідентичність послідовності нуклеїнової кислоти між нуклеотидними послідовностями, які кодують індивідуальний варіант CDR, та нуклеотидними послідовностями, описаними в даному документі, становить, щонайменше, 80 %, та більш типово з переважно зростаючими ідентичностями, щонайменше, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % та майже 100 %.

Таким чином, "варіант CDR" представляє собою одну з специфікованою гомологією, подібністю або ідентичністю до батьківської CDR за винаходом, та біологічна функція участі, включає, але не обмежуючись цим, щонайменше, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % специфічність та/або активність батьківського CDR.

В той час як, сайт або ділянка для введення варіації амінокислотної послідовності є наперед визначеною, мутація сама по собі не має потреби бути наперед визначеною. Наприклад, для того, щоб оптимізувати здійснення мутації на заданому сайті, довільний мутагенез може бути проведений на кодоні-мішені або ділянці-мішені, та експресовані варіанти антиген-зв'язуючого протеїну CDR скринінгували для оптимальної комбінації бажаної активності. Технології для створення мутацій заміщення на попередньо визначених сайтах в ДНК, які мають відому послідовність, є добре відомими, наприклад, M13 мутагенез праймер та PCR мутагенез. Скринінг мутантів роблять, використовуючи аналізи активності антиген-зв'язуючого протеїну, як описано в даному документі.

Амінокислотні заміщення, як правило, представляють собою одиночні залишки; інсерції, як правило, будуть складати приблизно від близько одного (1) до близько двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча може бути допустимим значно більше інсерцій. Ряд делецій становить від приблизно одного (1) до приблизно двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча в деяких випадках делецій може бути набагато більше.

Заміщення, делеції, інсерції або будь-які їх комбінація може бути використана, щоб досягти кінцевої похідної або варіанта. Як правило, такі зміни роблять на декількох амінокислотах, щоб мінімізувати зміну молекули, зокрема, імуногенність та специфічність антиген-зв'язуючого протеїну. Однак, більшість змін можуть бути толерантними в певних умовах.

Під "Fab" або "Fab ділянкою", як використовується в даному документі, мають на увазі поліпептид, який містить  $V_H$ ,  $C_H1$ ,  $V_L$ , та  $C_L$  імуноглобулінові домени. Fab може мати відношення до даної ділянки при виділенні, або даної ділянки в контексті повнорозмірного антитіла, фрагменту антитіла або Fab гібридного протеїну, або будь-якого іншого варіанту здійснення антитіла, як описано в даному документі.

Під "Fv", або "Fv фрагментом", або "Fv ділянкою", як використовується в даному документі, мають на увазі поліпептид, який містить  $V_L$  та  $V_H$  домени одного антитіла.

Під "структурою", як використовується в даному документі, мають на увазі ділянку варіабельного домену антитіла, що обмежує ті ділянки, визначені, як CDR. Структура варіабельного домену кожного антитіла, крім того, може бути підрозділена на суміжні ділянки, розділені за рахунок CDR (FR1, FR2, FR3 та FR4).

Термін "антиген-зв'язуюча частина" антитіла (або просто "частина антитіла"), як використовується в даному документі, стосується одного або декількох фрагментів антитіла, який зберігає здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, BST1). Показано, що антиген-зв'язуюча функція антитіла може бути здійснена фрагментами повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язуючих фрагментів, який охоплює термін "антиген-зв'язуюча частина" антитіла, включає (i) Fab фрагмент, моновалентний фрагмент, який складається з  $V_L/V_H$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  та  $C_H1$  доменів; (ii)  $F(ab')_2$  фрагмент, бівалентний фрагмент, яка містить два Fab фрагмента, зв'язаних дисульфідним містком в шарнірній ділянці; (iii) Fab" фрагмент, який, по суті, представляє собою Fab з частиною шарнірної ділянки (дивись, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) Fd фрагмент, який складається з  $V_H$  та  $C_H1$  доменів; (v) Fv фрагмент, який складається з  $V_L$  та  $V_H$  доменів одного плеча антитіла; (vi) dAb фрагмент [Ward et al. (1989) Nature 341:544-546], який складається з  $V_H$  домену; (vii) виділену ділянку, яка визначає комплементарність (CDR); та (viii) нанотіло, варіабельна ділянка важкого ланцюга, яка містить один варіабельний домен та два константних домени. Більш того, незважаючи на те, що два домени Fv фрагменту,  $V_L/V_H$  та  $V_H$ , кодуються окремими генами, вони можуть бути зв'язані, використовуючи рекомбінантні способи, за рахунок синтетичного лінкеру, який дає можливість їм бути зробленими як одиночний протеїновий ланцюг, в якому  $V_L/V_H$  та  $V_H$  ділянки паруються з утворенням моновалентних молекул (відомий як одинарний ланцюг Fv (scFv); дивись, наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; та Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Мається на увазі, що такі антитіла з одинарним ланцюгом також є

охопленими терміном "антиген-зв'язуюча частина" антитіла. Дані фрагменти антитіл одержують, використовуючи традиційні методи, відомі кваліфікованому спеціалісту в даній галузі з рівня техніки, та фрагменти піддають скринінгу для застосування за тим самим способом, як інтактні антитіла.

Мається на увазі, що "виділене антитіло", як використовується в даному документі, стосується антитіла, яке, по суті, є вільним від інших антитіл, що мають різні антигенні специфічності (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з BST1, по суті, є вільним від антитіл, які специфічно зв'язують антигени інші, ніж BST1). Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з BST1, однак, може мати перехресну реактивність до інших антигенів, таких як BST1 молекули з інших видів. Крім того, та/або альтернативно виділене антитіло може бути, по суті, вільним від іншого клітинного матеріалу та/або хімічних речовин, які знаходяться в формі, яка зазвичай не зустрічається в природі.

В деяких варіантах втілення, антитіла за винаходом представляють собою рекомбінантні протеїни, виділені протеїни або, по суті, чисті протеїни. "Виділений" протеїн є таким, що не супроводжується, щонайменше, деякими з матеріалів, з якими він, зазвичай, асоційований в його природному стані, наприклад, які складають, щонайменше, приблизно 5 %, або, щонайменше, приблизно 50 % за масою від загального протеїну в наданому зразку. Мається на увазі, що виділений протеїн може становити від 5 до 99,9 % за масою від загального протеїну, де вміст залежить від умов. Наприклад, протеїн може бути створений в значно більш високій концентрації внаслідок застосування індукованого промотору або високо експресованого промотору, таким чином, протеїн створюють при зростаючих рівнях концентрації. У випадку рекомбінантних протеїнів, визначення включає продукуючі антитіла в широкій множині організмів та/або клітин-господарів, які відомі в даній галузі з рівня техніки, в якій не продукується природним чином.

Терміни "моноклональне антитіло" або "композиція моноклонального антитіла", як використовується в даному документі, відноситься до отримання молекул антитіла одиничної молекулярної композиції. Композиція моноклонального антитіла демонструє одиничну зв'язуючу специфічність та афінність для певного епітопу. Як використовується в даному документі, "поліклональне антитіло" стосується антитіла, яке продукується декількома клонами В-лімфоцитів, як повинно б бути в цілій тварині.

Як використовується в даному документі, "ізотип" стосується класу антитіла (наприклад, IgM або IgG), який кодується генами константної ділянки важкого ланцюга.

Вирази "антитіло, що розпізнає антиген" та "антитіло специфічне для антигену" використовують взаємозамінно в даному документі з терміном "антитіло, яке специфічно зв'язується з антигеном".

Термін "похідні антитіла" стосується будь-якої модифікованої форми антитіла, наприклад, кон'югату (як правило, хімічне зчеплення) антитіла та іншого агента або антитіла. Наприклад, антитіла за представленим винаходом можуть бути кон'югованими з агентами, включаючи, але не обмежуючись цим, полімери (наприклад, ПЕГ), токсини, мітки, тощо, як більш повно описано нижче. Антитіла за представленим винаходом можуть бути нелюдськими, химерними, гуманізованими або повністю людськими. Для опису концепцій химерних та гуманізованих антитіл, дивись Clark et al. (2000) та посилання, що цитуються в даному документі (Clark, 2000, Immunol Today 21:397-402). Химерні антитіла містять варіабельну ділянку нелюдського антитіла, наприклад  $V_H$  та  $V_L$  домени мишачого або щурячого походження, реально зв'язані з константною ділянкою людського антитіла (дивись, наприклад, патент США № 4,816,567). В переважному варіанті втілення, антитіла за представленим винаходом є гуманізованими. Під "гуманізованим" антитілом, як використовується в даному документі, мається на увазі антитіло, що містить ділянку з людською структурою (FR) та одну або більше ділянок, що визначають комплементарність (CDR) з нелюдського (як правило, мишачого або щурячого) антитіла. Нелюдське антитіло, що забезпечує CDR, називають "донором", та людський імуноглобулін, що забезпечує структуру, називають "акцептором". Гуманізація ґрунтується переважно на щепленні донора CDR на акцепторні (людські)  $V_L$  та  $V_H$  структури (Патент США No. 5,225,539). Дана стратегія називається як "CDR щеплення". "Обернена мутація" вибраних акцепторних структурних залишків до відповідного донорного залишку часто вимагає відновлення афінності, яка є втраченою у вихідному щепленому конструкті (US 5,530,101; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 6,180,370; US 5,859,205; US 5,821,337; US 6,054,297; US 6,407,213). Гуманізоване антитіло оптимально, крім того, буде містити, щонайменше, частину імуноглобуліну константної ділянки, типово людського імуноглобуліну, та, таким чином, типово буде містити людську  $F_c$  ділянку. Способи гуманізації нелюдських антитіл добре відомі в даній галузі з рівня техніки, та по суті можуть бути виконані наступним способом Вінтера (Winter) та

співробітників [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; Verhoeven et al. (1988) Science, 239:1534-1536]. Додаткові приклади гуманізованих мишачих моноклональних антитіл також відомі в даній галузі з рівня техніки, наприклад, антитіла, які зв'язують людський протеїн C (O'Connor et al., 1998, Протеїн Eng 11:321-8), рецептор інтерлейкіну 2 [Queen et al. (1989) Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33] та рецептор людського епідермального фактору росту 2 [Carter et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9]. В альтернативному варіанті втілення, антитіла за представленим винаходом можуть бути повністю людськими, що представляє собою послідовності антитіла, які є повністю або по суті людськими. Ряд способів, відомі в даній галузі з рівня техніки для генерації повністю людських антитіл, включаючи застосування трансгенних мишей [Bruggemann et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8:455-458] або бібліотек людського антитіла, в поєднанні з вибраними способами [Griffiths et al. (1998) Curr Opin Biotechnol 9:102-108].

Мається на увазі, що термін "гуманізоване антитіло" включає антитіла, в яких CDR послідовності, одержані із зародкової лінії інших видів ссавців, таких як миша, щеплені з людськими структурними послідовностями. Додаткові модифікації структурної ділянки можуть бути створені з людськими структурними послідовностями, такі як амінокислотні модифікації Fc домену, як описано в даному документі.

Мається на увазі, що термін "химерне антитіло" стосується антитіл, в яких послідовності варіабельної ділянки є похідними від одного виду та послідовності константної ділянки є похідними від іншого виду, таких як антитіло, в якому послідовності варіабельної ділянки є похідними від мишачого антитіла, та послідовності константної ділянки є похідними від людського антитіла.

Мається на увазі, що термін "специфічно зв'язують" (або "імуноспецифічно зв'язують") показує, що антитіло зв'язується виключно з його наміченою мішенню, незважаючи на те, що в багатьох варіантах втілення це буде правдою; тобто, антитіло "специфічно зв'язується" зі своєю мішенню та не виявляється, або по суті зв'язується з іншими компонентами в зразку, клітині або пацієнті. Однак, в деяких варіантах втілення, антитіло "специфічно зв'язують", якщо його афінність для його наміченої мішені є приблизно в 5-раз більшою, в порівнянні з його афінністю до молекули-немішені. Відповідно, існують незначні перехресні реакції або перехресне зв'язування з небажаними речовинами, головним чином, протеїнами, що зустрічаються в природі, або тканинами здорової людини або тварини. Афінність антитіла, наприклад, буде, щонайменше, приблизно в 5 разів, наприклад, в 10 разів, наприклад, в 25 разів, головним чином в 50 разів, та особливо в 100 разів або більше для молекули-мішені, ніж його афінність для молекули-немішені. В деяких варіантах втілення, специфічне зв'язування між антитілом або іншим зв'язуючим агентом та антигеном означає зв'язуючу афінність, щонайменше,  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Антитіла можуть, наприклад, зв'язуватися з афінностями, щонайменше, приблизно  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , такої як від приблизно  $10^8 \text{ M}^{-1}$  до приблизно  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , від приблизно  $10^9 \text{ M}^{-1}$  до приблизно  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , або від приблизно  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  до приблизно  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ . Антитіла можуть, наприклад, зв'язуватися з  $\text{EC}_{50}$  50 nM або менше, 10 nM або менше, 1 nM або менше, 100 pM або менше, або більш переважно 10 pM або менше.

Термін "по суті не зв'язуються" з протеїном або клітинами, як використовується в даному документі, означає, що не зв'язуються або не зв'язуються з високою афінністю з протеїном або клітинами, тобто зв'язуються з протеїном або клітинами з  $K_D$   $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  або більше, більш переважно  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  або більше, більш переважно  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  або більше, більш переважно  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  або більше, ще більш переважно  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  або більше.

Мається на увазі, що термін " $\text{EC}_{50}$ ", як використовується в даному документі, стосується ефективності сполуки шляхом кількісного визначення концентрації, що призводить до 50 % максимальної відповіді/ефекту.  $\text{EC}_{50}$  може бути визначене, використовуючи Scratchard або FACS.

Мається на увазі, що термін " $K_{\text{асоц.}}$ " або " $K_a$ ", як використовується в даному документі, стосується швидкості асоціації певної взаємодії антитіло-антиген, тоді як мається на увазі, що термін " $K_{\text{дис.}}$ " або " $K_d$ ", як використовується в даному документі, стосується швидкості дисоціації певної взаємодії антитіло-антиген. Мається на увазі, що термін " $K_D$ ", як використовується в даному документі, стосується константи афінності, яку одержують з відношення  $K_d$  к  $K_a$  (тобто  $K_d/K_a$ ) та виражається як молярна концентрація (M). Значення  $K_D$  антитіла можуть визначатися, використовуючи способи добре встановлені для даної ділянки. Переважним способом для визначення  $K_D$  антитіла є застосування резонансу поверхневого плазмону, переважно, використовуючи біосенсорну систему, таку як Biacore<sup>®</sup> система.

Як використовується в даному документі, термін "висока афінність" для IgG антитіла стосується антитіла, яке має  $K_D$   $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  або менше, більш переважно  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$  або менше, ще

більш переважно  $1 \times 10^{-8}$  М або менше, ще більш переважно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше, та ще більш переважно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше, для антигена-мішені. Однак, "висока афінність" зв'язування може варіювати для інших ізотипів антитіла. Наприклад, "висока афінність" зв'язування для IgM ізотипу стосується антитіла, яке має  $K_D$   $10^{-6}$  М або менше, більш переважно  $10^{-7}$  М або менше, 5  
це більш переважно  $10^{-8}$  М або менше.

Термін "епітоп" або "антигенна детермінанта" стосується сайту на антигені, з яким імуноглобулін або антитіло специфічно зв'язуються. Епітопи можуть бути утворені як з суміжних амінокислот або несуміжних амінокислот, розташованих рядом, шляхом третинного складання протеїну. Епітопи, утворені з суміжних амінокислот, як правило, зберігаються, коли їх піддають дії денатуруючих розчинів, тоді як епітопи, утворені шляхом третинного складування, як правило, втрачаються, коли їх піддають дії денатуруючих розчинів. Епітоп, як правило, включає, щонайменше, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Способи визначення просторової конформації епітопів включає методики з рівня техніки та ті, які описані в даному документі, наприклад, рентгенівська кристалографія та 2-вимірний ядерно-магнітний резонанс [дивись, наприклад Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)]. 10  
15

Відповідно, крім того, охопленими представленим винаходом є антитіла, які зв'язуються з (тобто розпізнають) однаковим епітопом, як антитіла, описані в даному документі (тобто BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3). Антитіла, які зв'язуються з однаковим епітопом, можуть бути ідентифіковані за рахунок їх здатності до перехресного конструювання з (тобто, конкурентно інгібують зв'язування) еталонним антитілом за антиген-мішень в статистично значний спосіб. Конкурентне інгібування може відбуватися, наприклад, якщо антитіла зв'язуються з ідентичними або структурно подібними епітопами (наприклад, епітопами, що перекриваються), або просторово проксимальними епітопами, які, коли зв'язуються, викликають стеричну невідповідність між антитілами. 20  
25

Конкурентне інгібування може бути визначене, використовуючи звичайні аналізи, в яких імуноглобулін при дослідженні інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном. Чисельні типи аналізів конкурентного зв'язування є відомими, наприклад: твердофазний прямий або непрямий радіоімунологічний аналіз (RIA), твердофазний прямий або непрямий ферментний імунологічний аналіз (EIA), сандвіч конкурентний аналіз [дивись, Stahl et al. (1983) Methods in Enzymology 9:242]; твердофазний прямий біотин-авідин EIA [дивись, Kirkland et al. (1986) J. Immunol. 137:3614]; твердофазний прямий мічений аналіз, твердофазний прямий мічений сандвіч аналіз [дивись, Harlow та Lane (1988) Антитіла: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press]; твердофазний прямий мічений RIA із застосуванням I-125 мітки [дивись, Morel et al. (1988) Mol. Immunol. 25(1):7]; твердофазний прямий біотин-авідин EIA [Cheung et al. (1990) Virology 176:546]; та прямий мічений RIA. [Moldenhauer et al. (1990) Scand. J. Immunol. 32:77]. Як правило, такий аналіз включає застосування очищеного антигену, зв'язаного з твердою поверхнею або клітинами, що несуть їх, немічений імуноглобулін, що досліджується, та мічений еталонний імуноглобулін. Конкурентне інгібування вимірюють шляхом визначення кількості міченого зв'язаного з твердою поверхнею або клітинами в присутності імуноглобуліну, що досліджується. Зазвичай, імуноглобулін, що досліджується, є присутнім в надлишку. Як правило, коли конкуруюче антитіло є присутнім в надлишку, воно буде інгібувати специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном на, щонайменше, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % або більше. 30  
35  
40

Інші способи включають, наприклад, способи мапування епітопів, такі як рентгенівський аналіз кристалів комплексів антиген:антитіло, який забезпечує атомну роздільність епітопу. Інші способи контролюють зв'язування антитіла з фрагментами антигену або мутованими варіаціями антигену, де втрата зв'язування через модифікацію амінокислотного залишку з послідовністю антигену часто розглядається як індикація епітопного компоненту. Крім того, також можуть бути застосовані розрахункові комбінаторні способи для мапування епітопу. Дані способи ґрунтуються на здатності антитіла з афінністю, що викликає інтерес, виділяти специфічні короткі пептиди з комбінаторних бібліотек фагового показаного пептиду. Потім пептиди співвідносять, що призводить до визначення епітопу, що відповідає антитілу, яке застосовують для скринінгу пептидної бібліотеки. Для мапування епітопу, крім того, розробляють розрахункові алгоритми, які є показаними для мапування конформаційних дискретних епітопів. 45  
50  
55

Як використовується в даному документі, термін "суб'єкт" включає будь-який людський або тваринний крім людини, організм. Термін "тваринний, крім людини, " включає всі хребетні тварини, наприклад, ссавців та не ссавців, такі як не людиноподібні примати, вівці, собаки, коти, коні, корови, кури, земноводні, рептилії, тощо. 60

Різні аспекти розкриття описуються надалі в деталях в наступних підрозділах.

### Анти-BST1антитіла

Антитіла за винаходом характеризуються певними функціональними особливостями або властивостями антитіла. Наприклад, антитіла специфічно зв'язуються з людським BST1. Переважно, антитіло за винаходом зв'язується з BST1 з високою афінністю, наприклад, з  $K_D$   $8 \times 10^{-7}$  М або менше, ще більш, як правило,  $1 \times 10^{-8}$  М або менше. Анти-BST1 антитіла за винаходом переважно демонструють одну або декілька з наступних характеристик, з антитілами, що демонструють обидва виявлення конкретного застосування:

зв'язуються з людським BST1 з  $EC_{50}$  50 нМ або менше, 10 нМ або менше, 1 нМ або менше, 100 пМ або менше, або більш переважно 10 пМ або менше;

зв'язуються з людськими клітинами, що експресують BST1.

В одному варіанті втілення, антитіла переважно зв'язуються з антигенним епітопом, що є присутнім в BST1, епітоп якого не є присутнім в інших протеїнах. Переважно, антитіла не зв'язуються зі спорідненими протеїнами, наприклад, антитіла по суті не зв'язуються з іншими молекулами клітинної адгезії. В одному варіанті втілення, антитіло може бути інтерналізованим в клітину, яка експресує BST1. Стандартні аналізи для оцінки інтерналізації антитіла є відомими в даній галузі з рівня техніки, включаючи, наприклад, MabZap або HumZap аналізи інтерналізації.

Стандартні аналізи для оцінки здатності зв'язування антитіла з BST1 можуть бути виконані на протеїновому або клітинному рівні, та за відомими методиками в даній галузі з рівня техніки, включаючи наприклад, ELISA, вестерн-блотинги, RIA, BiAcure® аналізи та аналіз проточної цитометрії. Прийнятні аналізи описані детально в прикладах. Кінетики зв'язування (наприклад, афінність зв'язування) антитіла також можуть бути оцінені за стандартними аналізами, відомими в даній галузі з рівня техніки, такими як системний аналіз BiAcure®. Для оцінки зв'язування з клітинами Раджи (Raji) або Дауді (Daudi) в клітинні пухлини, Раджи (ATCC Депонування № CCL-86) або Дауді (ATCC Депонування № CCL-213) клітини можуть бути одержані з джерел, що знаходяться у вільному доступі, таких як американська колекція типових культур (American Type Culture Collection), та застосовані в стандартних аналізах, таких як аналіз проточної цитометрії.

### Моноклональні антитіла за винаходом

Переважними антитілами за винаходом є моноклональні антитіла BST1\_A2 та BST1\_A1, виділені та структурно охарактеризовані, як описано в прикладах 1-4.  $V_H$  амінокислотні послідовності BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 2, 1 та 52, відповідно.  $V_K$  амінокислотні послідовності BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 4, 3 та 53, відповідно.

Задано, що кожне з даних антитіл може зв'язуватися з BST1,  $V_H$  та  $V_K$  послідовності можуть бути "змішаними та співставленими", щоб створити інші анти-BST1, які зв'язують молекули за винаходом. BST1 зв'язування таких "змішаних та співставлених" антитіл можуть бути досліджені, використовуючи аналізи зв'язування, описані вище та в прикладах (наприклад, ELISA). Переважно, коли  $V_H$  та  $V_K$  ланцюга є змішаними та співставленими,  $V_H$  послідовність з конкретного  $V_H/V_K$  парування замінюють на структурно подібну  $V_H$  послідовність. Аналогічним чином, переважно  $V_K$  послідовність з конкретного  $V_H/V_K$  парування замінюють на структурно подібну  $V_K$  послідовність.

Відповідно, в одному аспекті, винахід передбачає антитіло, що містить: варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: вибрану з групи, яка складається з 2, 1 та 52, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: вибрану з групи, яка складається з 4, 3 та 53; де антитіло специфічно зв'язується з BST1, переважно, з людським BST1.

Переважні комбінації важкого та легкого ланцюга включають:

варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; або

варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; або

варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53.

В іншому аспекті, винахід передбачає антитіла, які містять важкий ланцюг та легкий ланцюг CDR1s, CDR2s та CDR3s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3, або їх комбінації. Амінокислотні послідовності  $V_H$  CDR1s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 10, 9 та 56,

відповідно. Амінокислотні послідовності  $V_H$  CDR2s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57, відповідно. Амінокислотні послідовності  $V_H$  CDR3s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 14, 13 та 58, відповідно. Амінокислотні послідовності  $V_K$  CDR1s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 16, 15 та 59, відповідно. Амінокислотні послідовності  $V_K$  CDR2s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 18, 17 та 60, відповідно. Амінокислотні послідовності  $V_K$  CDR3s від BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 показані в SEQ ID NO: 20, 19 та 61, відповідно. Ділянки CDR зображують, використовуючи систему [Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242].

Задано, що кожне з даних антитіл може зв'язуватися з BST1, та що антиген-зв'язуюча специфічність передбачається спочатку за рахунок CDR1, CDR2, та CDR3 ділянок,  $V_H$  CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності та  $V_K$  CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності можуть бути "змішаними та співставленими" (тобто CDR від різних антитіл можуть бути змішаними та співставленими, незважаючи на те, що кожне антитіло, як правило, містить  $V_H$  CDR1, CDR2, та CDR3 та  $V_K$  CDR1, CDR2, та CDR3), щоб створити інші анти-BST1, які зв'язують молекули за винаходом. Відповідно, винахід, зокрема, включає кожну можливу комбінацію CDR важкого та легкого ланцюгів.

BST1 зв'язування таких "змішаних та співставлених" антитіл може бути дослідженим, використовуючи аналізи зв'язування, описані вище та в прикладах (наприклад, ELISA, Biacore® аналіз). Переважно, коли  $V_H$  CDR послідовності є змішаними та співставленими, CDR1, CDR2 та/або CDR3 послідовності від певної  $V_H$  послідовності заміщують на структурно подібну(і) CDR послідовність(і). Аналогічним чином, коли  $V_K$  CDR послідовності є змішаними та співставленими, CDR1, CDR2 та/або CDR3 послідовності від певної  $V_K$  послідовності, переважно, заміщують на структурно подібну(і) CDR послідовність(і). Для кваліфікованого спеціаліста в даній галузі буде достатньо очевидним, що нові  $V_H$  та  $V_K$  послідовності можуть створюватися шляхом заміщення однієї або більше  $V_H$  та/або  $V_L/V_K$  послідовностей CDR ділянки на структурно подібні послідовності від CDR послідовностей, які розкриті в даному документі для моноклональних антитіл BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3.

Відповідно, в іншому аспекті, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло, або його антиген-зв'язуючу частину, який містить:

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 10, 9 та 56;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, 13 та 58;

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 16, 15 та 59;

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 18, 17 та 60; та

варіабельна ділянка легкого ланцюга CDR3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 20, 19 та 61;

з всіма можливими комбінаціями, які є можливими, в яких антитіло специфічно зв'язується з BST1, переважно людським BST1.

В іншому переважному варіанті втілення, антитіло має:

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, яка містить SEQ ID NO: 10;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, яка містить SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 51;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, яка містить SEQ ID NO: 14; та

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, яка містить SEQ ID NO: 16;

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, яка містить SEQ ID NO: 18;

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, яка містить SEQ ID NO: 20.

В іншому переважному варіанті втілення, антитіло має:

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, яка містить SEQ ID NO: 9;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, яка містить SEQ ID NO: 11;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, яка містить SEQ ID NO: 13; та

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, яка містить SEQ ID NO: 15;

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, яка містить SEQ ID NO: 17;

варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, яка містить SEQ ID NO: 19.

В іншому переважному варіанті втілення, антитіло має:

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, яка містить SEQ ID NO: 56;

варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, яка містить SEQ ID NO: 57;  
 варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, яка містить SEQ ID NO: 58; та  
 варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, яка містить SEQ ID NO: 59;  
 варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, яка містить SEQ ID NO: 60;  
 варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, яка містить SEQ ID NO: 61.

в даній галузі з рівня техніки добре відомо, що CDR3 домен, незалежно від CDR1 та/або CDR2 домена(ів), сам може визначати специфічність зв'язування антитіла для подібного антигену, та що багато антитіл, як і очікувалось, може створюватися, маючи одну й ту саму специфічність зв'язування, що ґрунтується на загальній CDR3 послідовності. Дивись, наприклад, Klimka et al. (2000) *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (опис одержання гуманізованого анти-CD30 антитіла, використовуючи тільки варіабельний домен важкого ланцюга CDR3 мишачого анти-CD30 антитіла Ki-4); Beiboer et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (опис рекомбінантного епітеліального глікопротеїну-2 (EGP-2) антитіла, використовуючи тільки послідовність важкого ланцюга CDR3 батьківського мишачого MOC-31 анти-EGP-2 антитіла); Rader et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8910-8915 (опис панелі гуманізованих анти-інтегрин  $\alpha_v\beta_3$  антитіл, використовуючи варіабельний домен важкого та легкого ланцюга CDR3 мишачого анти-інтегрин  $\alpha_v\beta_3$  антитіла LM609, де кожен член антитіла містить несхожу послідовність за межами CDR3 домену та здатну до зв'язування одного й того ж епітопу, як батьківського мишачого антитіла з афінностями, як високими або більш високими, ніж батьківське мишаче антитіло); Barbas et al. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (розкриття, що CDR3 домен забезпечує найбільш значний вклад в зв'язуючий антиген); Barbas et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2529-2533 (опис щеплення послідовностей важкого ланцюга CDR3 трьох Fabs (SI-1, SI-40, та SI-32) по відношенню до людської плацентарної ДНК важкого ланцюга анти-правцевого токсоду Fab, таким чином, замінюючи існуючий важкий ланцюг CDR3, та демонструючи, що CDR3 домен сам давав специфічність зв'язування); та Ditzel et al. (1996) *J. Immunol.* 157:739-749 (опис досліджень щеплення, в яких перенесення тільки важкого ланцюга CDR3 батьківського поліспецифічного Fab LNA3 до важкого ланцюга моноспецифічного IgG правцевого токсод-зв'язуючого Fab p313 антитіла було достатнім для збереження специфічності зв'язування батьківського Fab). Кожне з даних посилань, таким чином, є включеним у вигляді посилання в повному об'ємі.

Відповідно, представлений винахід передбачає моноклональні антитіла, що містять один або більше доменів важкого та/або легкого ланцюга CDR3 від антитіла, отриманого від людини або тварини, крім людини, де моноклональне антитіло є здатним специфічно зв'язуватися з BST1. В певних аспектах, представлений винахід передбачає моноклональні антитіла, що містять один або більше доменів важкого та/або легкого ланцюга CDR3 від нелюдського антитіла, такого як мишаче або щуряче антитіло, де моноклональне антитіло є здатним до специфічного зв'язування з BST1. В деяких варіантах втілення, такі вибірково антитіла, що містять один або більше доменів важкого та/або легкого ланцюга CDR3 від нелюдського антитіла, (а) є здатними до конкурування за зв'язування з; (b) зберігають функціональні характеристики; (c) зв'язуються з одним й тим самим епітопом; та/або (d) мають подібну афінність зв'язування як і відповідне батьківське нелюдське антитіло.

В інших аспектах, представлений винахід передбачає моноклональні антитіла, що містять один або більше домени важкого та/або легкого ланцюга CDR3 від людського антитіла, такого як, наприклад, людське антитіло, одержане від тварини, крім людини, де людське антитіло є здатним до специфічного зв'язування з BST1. В інших аспектах, представлений винахід передбачає моноклональні антитіла, що містять один або більше доменів важкого та/або легкого ланцюга CDR3 від першого людського антитіла, такого як, наприклад, людське антитіло, одержане від тварини, крім людини, де перше людське антитіло є здатним до специфічного зв'язування з BST1, та де CDR3 домен від першого людського антитіла заміщує CDR3 домен в людському антитілі, у якого відсутня специфічність зв'язування з BST1, щоб згенерувати друге людське антитіло, яке є здатним до специфічного зв'язування з BST1. В деяких варіантах втілення, такі винайдені антитіла, які містять один або більше доменів важкого та/або легкого ланцюга CDR3 від першої людського антитіла, (а) є здатними до конкуруючого зв'язування; (b) зберігають функціональні характеристики; (c) зв'язуються з одним й тим самим епітопом; та/або (d) мають подібну афінність зв'язування як у відповідного батьківського першого людського антитіла.

Антитіла, що мають певні послідовності зародкової лінії

В певних варіантах втілення, антитіло за винаходом містить варіабельну ділянку важкого ланцюга від гена певної зародкової лінії важкого ланцюга імуноглобуліну та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга від гена певної зародкової лінії легкого ланцюга імуноглобуліну.

Наприклад, в переважному варіанті втілення, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_H$  1-39 гена, мишачого  $V_H$  1-80 гена або мишачого  $V_H$  69-1 гена, де антитіло специфічно зв'язується з BST1. В ще іншому переважному варіанті втілення, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, що містять варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_K$  4-55 гена, мишачого  $V_K$  4-74 гена або мишачого  $V_K$  44-1 гена, де антитіло специфічно зв'язується з BST1.

В ще іншому переважному варіанті втілення, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, де антитіло:

містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_H$  1-39 гена (ген якого включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 35 та 36);

містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_K$  4-55 гена (ген якого включає нуклеотидні послідовності, представлені в SEQ ID NO: 40, 41 та 42); та

специфічно зв'язується з BST1, переважно, з людським BST1.

Приклади антитіл, які мають гени  $V_H$  1-39 та  $V_K$  4-55, з послідовностями, описаними вище, представляють собою BST1\_A2.

В ще іншому переважному варіанті втілення, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, де антитіло:

містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_H$  1-80 гена (ген якого включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 33 та 34);

містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_K$  4-74 гена (ген якого включає нуклеотидні послідовності, представлені в SEQ ID NO: 37, 38 та 39); та

специфічно зв'язується з BST1, переважно, людським BST1. Прикладом антитіла, яке включає  $V_H$  1-80 та  $V_K$  4-74 гени, з послідовностями, описаними вище, є BST1\_A1.

В ще іншому переважному варіанті втілення, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, де антитіло:

містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_H$  69-1 гена (ген якого включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 68 та 69);

містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною від мишачого  $V_K$  44-1 гена (ген якого включає нуклеотидні послідовності, представлені в SEQ ID NO: 70, 71 та 72); та

специфічно зв'язується з BST1, переважно, людським BST1. Прикладом антитіла, яке має  $V_H$  та  $V_K$  гени, з послідовностями, описаними вище, є BST1\_A3.

Як використовується в даному документі, антитіло містить варіабельну ділянку важкого або легкого ланцюгів, які є "продуктом" або "похідною" послідовності певної зародкової лінії, якщо варіабельні ділянки антитіла одержують з системи, яка застосовує мишачі гени зародкової лінії імуноглобуліну. Такі системи включають скринінг бібліотеки мишачих генів імуноглобуліну, що демонструється на фазі з антигеном, що викликає зацікавленість. Антитіло, яке є "продуктом" або "похідною" послідовності імуноглобуліну мишачої зародкової лінії, може бути ідентифіковане як таке шляхом порівняння нуклеотидної або амінокислотної послідовності антитіла з нуклеотидними або амінокислотними послідовностями імуноглобулінів мишачої зародкової лінії, та вибираючи послідовність імуноглобуліну мишачої зародкової лінії, яка є найбільш близькою в послідовності (тобто має найбільший % ідентичності) до послідовності антитіла. Антитіло, яке є "продуктом" або "похідною" певної послідовності імуноглобуліну мишачої зародкової лінії, може містити амінокислотні відмінності в порівнянні з послідовністю зародкової лінії, через, наприклад, соматичні мутації, що зустрічаються в природі, або навмисного введення сайт-спрямованої мутації. Однак, вибране антитіло, як правило, є, щонайменше, на 90 % ідентичним щодо амінокислот в послідовності до амінокислотної послідовності, що кодується геном імуноглобуліну мишачої зародкової лінії, та містить амінокислотні залишки, які ідентифікують антитіло, як мишаче, в порівнянні з амінокислотними послідовностями імуноглобуліну зародкової лінії інших видів (наприклад, послідовностями людської зародкової лінії). В певних випадках, антитіло може бути, щонайменше, на 95 %, або навіть, щонайменше, на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичним за амінокислотною послідовністю до амінокислотної послідовності, що кодується геном імуноглобуліну зародкової

лінії. Як правило, антитіло, одержане від певної послідовності мишачої зародкової лінії, буде демонструвати відмінності не більше, ніж в 10 амінокислотах від амінокислотної послідовності, що кодується геном імуноглобуліну мишачої зародкової лінії. В певних випадках, антитіло може демонструвати відмінності не більше, ніж в 5, або навіть не більше, ніж в 4, 3, 2 або 1 амінокислоті від амінокислотної послідовності, що кодується геном імуноглобуліну зародкової лінії.

#### Гомологічні антитіла

В ще іншому варіанті втілення, антитіло за винаходом містить варіабельну ділянку важкого та легкого ланцюгів, яка містить амінокислотні послідовності, які є гомологічними до амінокислотних послідовностей переважних антитіл, описаних в даному документі, та де антитіла зберігають потрібні функціональні властивості анти-BST1 антитіл за винаходом.

Наприклад, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло або його антиген-зв'язуючу частину, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де: варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка є, щонайменше, на 80 % ідентичною до амінокислотної послідовності, яка вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 1 та 52; варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка є, щонайменше, на 80 % ідентичною до амінокислотної послідовності, яка вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, 3 та 53; та антитіло зв'язується з людським BST1. Такі антитіла можуть зв'язуватися з людським BST1 зEC<sub>50</sub> 50 нМ або менше, 10 нМ або менше, 1 нМ або менше, 100 пМ або менше, або більш переважно 10 пМ або менше.

Антитіло, крім того, може зв'язуватися з CHO клітинами, трансфікованими з людським BST1.

В різних варіантах втілення, антитіло може бути, наприклад, людським антитілом, гуманізованим антитілом або химерним антитілом.

В інших варіантах втілення, V<sub>H</sub> та/або V<sub>K</sub> амінокислотні послідовності можуть бути на 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % гомологічними до послідовностей, представлених вище. Антитіло, яке має V<sub>H</sub> та V<sub>K</sub> ділянки, що мають високу (тобто 80 % або більшу) ідентичність до V<sub>H</sub> та V<sub>K</sub> ділянок послідовностей, що представлені вище, може бути одержане шляхом мутагенезу (наприклад, сайт-спрямований або PCR-опосередкований мутагенез) молекул нуклеїнової кислоти, що кодують SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 та 55 з наступним дослідженням кодованого зміненого антитіла за збереженою функцією, використовуючи функціональні аналізи, описані в даному документі.

Відсоткова ідентичність між двома послідовностями є функцією ряду ідентичних положень, розділених послідовностями (тобто % гомології = # ідентичні положення / загальна # положень × 100), беручи в розрахунок кількість пропусків, та довжину кожного пропуску, яка потрібна для введення для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Порівняння послідовностей та визначення відсоткової ідентичності між двома послідовностями можуть виконувати, використовуючи математичний алгоритм, як описано в необмежуваних прикладах нижче.

Відсоткова ідентичність між двома амінокислотними послідовностями може бути визначена, використовуючи алгоритм Мейера та Міллера (E. Meyers та W. Miller) [Comput. Appl. Biosci. (1988) 4:11-17], який був включеним в ALIGN програму (версія 2.0), використовуючи PAM120 таблицю масових залишків, штраф за довжину пропуску 12 та штраф за пропуск 4. Крім того, відсоткова ідентичність між двома амінокислотними послідовностями може бути визначена, використовуючи алгоритм Нідлемана та Вунша (Needleman та Wunsch) [J. Mol. Biol. (1970) 48:444-453], який був включеним в GAP програму в GCG пакеті програмного забезпечення (доступний на <http://www.gcg.com>), використовуючи або Blossum 62 матрицю, або PAM250 матрицю, та масу пропуску 16, 14, 12, 10, 8, 6, або 4 та масу довжини 1, 2, 3, 4, 5 або 6.

Додатково або альтернативно, протеїнові послідовності за представленим винаходом можуть, крім того, застосовувати як "послідовність запиту", щоб виконувати пошук за загальнодоступними базами даних, наприклад, ідентифікувати споріднені послідовності. Такі пошуки можуть бути виконані, використовуючи XBLAST програму (версія 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Пошуки BLAST протеїну можуть бути виконані, використовуючи XBLAST програму, множина = 50, довжина слова = 3, щоб одержати амінокислотні послідовності гомологічні до молекул антитіла за винаходом. Для одержання вирівнювань, що містять пропуски, з метою порівняння, може бути застосований Gapped BLAST, як описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При застосуванні BLAST та Gapped BLAST програм, значення параметру за замовчуванням відповідних програм (наприклад, XBLAST та NBLAST) можуть бути застосовані. Дивись, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Антитіла з консервативними модифікаціями

В певних варіантах втілення, антитіло за винаходом містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1, CDR2 та CDR3 послідовності, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1, CDR2 та CDR3 послідовності, де одна або більше з даних CDR послідовностей містять специфічні амінокислотні послідовності, що ґрунтуються на переважних антитілах, описаних в даному документі (наприклад, BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3), або їх консервативні модифікації, та де антитіла зберігають потрібні функціональні властивості анти-BST1 антитіл за винаходом. Відповідно, винахід передбачає виділене моноклональне антитіло, або його антиген-зв'язуючу частину, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності, де: послідовність CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 14, 13 та 58, та їх консервативних модифікацій; послідовність CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 20, 19 та 61, та їх консервативних модифікацій; та антитіло зв'язується з людським BST1 з EC<sub>50</sub> 50 нМ або менше, 10 нМ або менше, 1 нМ або менше, 100 пМ або менше, або більш переважно, 10 пМ або менше.

Крім того, антитіло може зв'язуватися з CHO клітинами трансфікованими з людським BST1.

В переважному варіанті втілення, послідовність CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57, та їх консервативних модифікацій; та послідовність CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 18, 17 та 60, та їх консервативних модифікацій. В іншому переважному варіанті втілення, послідовність CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 10, 9 та 56, та їх консервативних модифікацій; та послідовність CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 16, 15 та 59, та їх консервативних модифікацій. В іншому переважному варіанті втілення, послідовність CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 14, 13 та 58, та їх консервативних модифікацій; та послідовність CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 20, 19 та 61, та їх консервативних модифікацій.

В переважному варіанті втілення, послідовність CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57, та їх консервативних модифікацій; та послідовність CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 18, 17 та 60, та їх консервативних модифікацій. В іншому переважному варіанті втілення, послідовність CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 10, 9 та 56, та їх консервативних модифікацій; та послідовність CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 16, 15 та 59, та їх консервативних модифікацій.

В різних варіантах втілення, антитіло може бути, наприклад, людським антитілом, гуманізованим антитілом або химерним антитілом.

Як використовується в даному документі, мається на увазі, що термін "консервативні модифікації послідовності" стосується амінокислотних модифікацій, які не чинять значну дію або впливають на характеристики зв'язування антитіла, яке містить амінокислотну послідовність. Такі консервативні модифікації включають амінокислотні заміщення, додавання та делеції. Модифікації можуть вводити в антитіло за винаходом із застосуванням стандартних методик, відомих в даній галузі з рівня техніки, таких як сайт-спрямований мутагенез та PCR-опосередкований мутагенез. Консервативні амінокислотні заміщення є заміщеннями, в яких амінокислотний залишок заміщується на амінокислотний залишок, що має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, що мають подібні бічні ланцюги, визначені в рівні техніки. Дані родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн, триптофан), неполярними бічними

ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином, один або більше амінокислотних залишків в CDR ділянках антитіла за винаходом може бути

заміщеним на інші амінокислотні залишки з тієї же родини бічного ланцюга, та альтернативне антитіло можуть досліджувати на збережену функцію, використовуючи функціональні аналізи, описані в даному документі.

Послідовності важкого ланцюга CDR1 SEQ ID NO: 10, 9 та 56 можуть містити одну або більше консервативних модифікацій послідовності, таких як одне, два, три, чотири, п'ять або більше амінокислотних заміщень, додавань або делецій; послідовності легкого ланцюга CDR1 SEQ ID NO: 16, 15 та 59 можуть містити одну або більше консервативних модифікацій послідовності, таких як одне, два, три, чотири, п'ять або більше амінокислотних заміщень, додавань або делецій; послідовності важкого ланцюга CDR2, показані в SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57, можуть містити одну або більше консервативних модифікацій послідовності, таких як одне, два, три, чотири, п'ять або більше амінокислотних заміщень, додавань або делецій; послідовності легкого ланцюга CDR2, показані в SEQ ID NO: 18, 17 та 60, можуть містити одну або більше консервативних модифікацій послідовності, таких як одне, два, три, чотири, п'ять або більше амінокислотних заміщень, додавань або делецій; послідовності важкого ланцюга CDR3, показані в SEQ ID NO: 14, 13 та 58, можуть містити одну або більше консервативних модифікацій послідовності, таких як одне, два, три, чотири, п'ять або більше амінокислотних заміщень, додавань або делецій; та/або послідовності легкого ланцюга CDR3, показані в SEQ ID NO: 20, 19 та 61, можуть містити одну або більше консервативних модифікацій послідовності, таких як одне, два, три, чотири, п'ять або більше амінокислотних заміщень, додавань або делецій.

Антитіла, які зв'язуються з одним й тим самим епітопом, як анти-BST1 антитіла за винаходом

В іншому варіанті втілення, винахід передбачає антитіла, які зв'язуються з одним й тим самим епітопом на людському BST1, як будь-яким з BST1 моноклональних антитіл за винаходом (тобто антитіла, які мають здатність перехресно конкурувати за зв'язування з BST1 з будь-яких моноклональних антитіл за винаходом). В переважних варіантах втілення, еталонне антитіло для досліджень перехресного конкурування може бути моноклональним антитілом BST1\_A2 (що має  $V_H$  та  $V_L$  послідовності, як показано в SEQ ID NO: 2 та 4, відповідно), моноклональним антитілом BST1\_A1 (що має  $V_H$  та  $V_L$  послідовності, як показано в SEQ ID NO: 1 та 3, відповідно), моноклональним антитілом BST1\_A3 (що має  $V_H$  та  $V_L$  послідовності, як показано в SEQ ID NO: 52 та 53, відповідно).

Такі перехресно-конкуруючі антитіла можуть бути ідентифікованими ґрунтуючись на їх здатності до перехресного конструювання з BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3 в стандартних BST1 аналізах зв'язування. Наприклад, BIAcore аналіз, ELISA аналізи або проточна цитометрія можуть бути застосовані для демонстрації перехресного конкурування з антитілами за представленим винаходом. Здатність антитіла, що досліджують, інгібувати зв'язування, наприклад, BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3, з людським BST1 демонструє, що антитіло, що досліджують, може конкурувати з BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3 за зв'язування з людським BST1 й, таким чином, зв'язуватися з одним й тим самим епітопом на людському BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3.

Сконструйовані та модифіковані антитіла

Антитіло за винаходом можуть одержувати, використовуючи антитіло, що має одну або більше з  $V_H$  та/або  $V_L$  послідовностей, розкритих в даному документі, яке може бути застосоване, як вихідний матеріал, щоб сконструювати модифіковане антитіло, де модифіковане антитіло може мати змінені властивості в порівнянні з вихідним антитілом. Антитіло може бути сконструйоване шляхом модифікації однієї або більше амінокислот в межах однієї або обох варіабельних ділянок (тобто  $V_H$  та/або  $V_L$ ), наприклад, в межах однієї або більше CDR ділянок та/або в межах однієї або більше структурних ділянок. Додатково або альтернативно, антитіло може бути сконструйоване шляхом модифікації залишків в межах константної(их) ділянки(ок), наприклад, щоб змінити ефектрону(i) функцію(ї) антитіла.

В певних варіантах втілення, щеплення CDR може бути застосоване для того, щоб сконструювати варіабельні ділянки антитіла. Антитіла взаємодіють з антигенами-мішенями переважно за рахунок амінокислотних залишків, які є розташованими в шести ділянках, що визначають комплементарність (CDR) важкого та легкого ланцюга. По цій причині, амінокислотні послідовності з CDR більше розрізняються між індивідуальними антитілами, ніж послідовності за межами CDR. Так як CDR послідовності є відповідальними за найбільші

взаємодії антитіло-антиген, то існує можливість експресувати рекомбінантні антитіла, які імітують властивості специфічних антитіл, що зустрічаються в природі, шляхом конструювання експресуючих векторів, які включають CDR послідовності від специфічного антитіла, що зустрічається в природі, прищепленого на структурних послідовностях від відмінного антитіла з різними властивостями (дивись, наприклад, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Divись. USA*. 86:10029-10033; Патент США № 5,225,539 Winter, та Патент США № 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 та 6,180,370 Queen et al.).

Відповідно, інший варіант втілення за винаходом стосується виділеного моноклонального антитіла або його антиген-зв'язуючої частини, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності, що містять амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO 10, 9 та 56; 12 або 51, 11 та 57; та 14, 13 та 58, відповідно, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності, що містять амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 16, 15 та 59; 18, 17 та 60; та 20, 19 та 61, відповідно. Таким чином, такі антитіла містять  $V_H$  та  $V_L$  CDR послідовності моноклональних антитіл BST1\_A2, BST1\_A1 та BST1\_A3, ще можуть містити різні структурні послідовності з даних антитіл.

Такі структурні послідовності можуть бути одержані із загальнодоступних ДНК баз даних або опублікованих посилань, які включають генні послідовності антитіла зародкової лінії. Наприклад, ДНК послідовності зародкової лінії для мишачих генів варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга можуть бути знайдені в IMGT (міжнародний ImMunoGeneTics) базі даних послідовностей мишачої зародкової лінії (доступної за гіперпосиланням протоколу передачі [//www.imgt.cines.fr/?](http://www.imgt.cines.fr/?)), а також в Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; зміст кожного з яких повністю включено в даний документ у вигляді посилання. Як інший приклад, ДНК послідовності зародкової лінії для мишачих генів варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга можуть бути знайдені в Genbank базі даних.

Протеїнові послідовності антитіла порівнюють з протеїновими послідовностями компільованих баз даних, використовуючи один зі способів пошуку за подібністю послідовності, що називається Gapped BLAST [Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402], який є добре відомим кваліфікованому спеціалісту в даній галузі з рівня техніки. BLAST представляє собою евристичний алгоритм, в якому статистично значне вирівнювання між послідовністю антитіла та послідовністю бази даних є можливим, щоб містити високо-ранжовані сегментні пари (HSP) слів, що вирівнюються. Сегментні пари, чий оцінки не можуть бути покращені шляхом розширення або урізання, називаються хітом. Коротко кажучи, нуклеотидні послідовності, наведені в базі даних, та ділянка між, та включаючи, FR1 через FR3 структурну ділянку зберігаються. Послідовності бази даних мають середню довжину 98 залишків. Послідовності, що повторюються, які представляють собою точні співпадіння по всій довжині протеїну, видаляються. Пошук BLAST для протеїнів, використовуючи програму blastp за замовчуванням, стандартні параметри, крім фільтру низьких багатоконпонентностей, який є виключеним, та матричне заміщення BLOSUM62, фільтри для топ 5 хітів, що дають сумісності послідовності. Нуклеотидні послідовності транскрибують в усі шість скелетів, та скелет без стоп-кодонів у відповідному сегменті послідовності бази даних вважається потенційним хітом. Це, в свою чергу, підтверджено за допомогою програми BLAST tblastx, яка транскрибує послідовність антитіла в усіх шести скелетах та порівнює дані трансляції з нуклеотидними послідовностями в базі даних, що динамічно транскрибуються в усіх шести скелетах.

Ідентичності є точними співпадіннями амінокислоти між послідовністю антитіла та протеїну бази даних по всій довжині послідовності. Позитивні (співпадіння ідентичностей + заміщення) не є ідентичними, а амінокислотні заміщення регулюються матрицею заміщення BLOSUM62. Якщо два співпадіння послідовностей антитіла з послідовності бази даних з тією самою ідентичністю, то слід вважати, що хіт з більшістю позитивних є співпадаючим хітом послідовності.

Переважають структурні послідовності для застосування в антитілах за винаходом є структурно подібними до структурних послідовностей, що застосовують вибрані антитіла за винаходом, наприклад, подібні до  $V_H$  1-80 структурної послідовності,  $V_H$  1-39 структурної послідовності,  $V_L$  4-74 структурної послідовності та/або  $V_L$  4-55 структурної послідовності, які використовуються переважними моноклональними антитілами за винаходом.  $V_H$  CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності, та  $V_L$  CDR1, CDR2, та CDR3 послідовності, можуть бути прищеплені в структурні ділянки, які мають ідентичну послідовність, як та, що знайдена в гені імуноглобуліну зародкової лінії, від якого походить структурна послідовність, або CDR послідовності можуть бути прищеплені в структурні ділянки, які містять одну або більше мутацій в порівнянні з

послідовностями зародкової лінії. Наприклад, виявлено, що в деяких випадках є вигідним мутування залишків в межах структурних ділянок для збереження або підвищення антиген-зв'язуючої здатності антитіла (дивись, наприклад, патент США № 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 та 6,180,370 Queen et al.).

Іншим типом модифікації варіабельної ділянки є мутування амінокислотних залишків в межах  $V_H$  та/або  $V_K$  CDR1, CDR2 та/або CDR3 ділянок, щоб, таким чином, модифікувати одне або більше властивостей зв'язування (наприклад, афінність) антитіла, яке викликає зацікавленість. Сайт-спрямований мутагенез або PCR-опосередкований мутагенез може бути виконаний, щоб ввести мутацію(ї), та ефективність зв'язування антитіла, або інші функціональні властивості, які викликають зацікавленість, може бути оцінена в аналізах *in vitro* або *in vivo*, як описано в даному документі та представлено в прикладах. В деяких варіантах втілення, вводять консервативні модифікації (як обговорювалося вище). Альтернативно, можуть бути виконані не консервативні модифікації. Мутаціями можуть бути амінокислотні заміщення, додавання або делеції, але переважними є заміщення. Більш того, як правило, не більше, ніж один, два, три, чотири або п'ять залишків в межах CDR ділянки є зміненими, незважаючи на те, що, як буде зрозуміло кваліфікованому спеціалісту в даній галузі, варіантів в інших ділянках (структурних ділянках, наприклад) може бути більше.

Відповідно, в іншому варіанті втілення, представлене розкриття передбачає виділені анти-BST1 моноклональні антитіла або їх антиген-зв'язуючі частини, що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить: (a)  $V_H$  CDR1 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 10, 9 та 56 або амінокислотної послідовності, що має одне, два, три, чотири або п'ять амінокислотних заміщень, делецій або додавань, в порівнянні з SEQ ID NO: 10, 9 та 56; (b)  $V_H$  CDR2 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57, або амінокислотної послідовності, що має одне, два, три, чотири або п'ять амінокислотних заміщень, делецій або додавань, в порівнянні з SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57; (c)  $V_H$  CDR3 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, 13 та 58, або амінокислотної послідовності, що має одне, два, три, чотири або п'ять амінокислотних заміщень, делецій або додавань, в порівнянні з SEQ ID NO: 14, 13 та 58; (d)  $V_K$  CDR1 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 16, 15 та 59, або амінокислотної послідовності, що має одне, два, три, чотири або п'ять амінокислотних заміщень, делецій або додавань, в порівнянні з SEQ ID NO: 16, 15 та 59; (e)  $V_K$  CDR2 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 18, 17 та 60, або амінокислотної послідовності, що має одне, два, три, чотири або п'ять амінокислотних заміщень, делецій або додавань, в порівнянні з SEQ ID NO: 18, 17 та 60; та (f)  $V_K$  CDR3 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 20, 19 та 61, або амінокислотної послідовності, що має одне, два, три, чотири або п'ять амінокислотних заміщень, делецій або додавань, в порівнянні з SEQ ID NO: 20, 19 та 61.

Сконструйовані антитіла розкриття включають ті, в яких модифікації зроблені в структурних залишках в межах  $V_H$  та/або  $V_K$ , наприклад, щоб покращити властивості антитіла. Як правило, такі структурні модифікації роблять, щоб знизити імуногенність антитіла. Наприклад, одним підходом є "мутування до початкового вигляду" одного або більше структурних залишків до відповідної послідовності зародкової лінії. Більш конкретно, антитіло, яке піддавали соматичній мутації, може містити структурні залишки, які відрізняються від послідовності зародкової лінії, з якої походить антитіло. Такі залишки можуть бути ідентифіковані шляхом порівняння структурних послідовностей антитіла з послідовностями зародкової лінії, з якої походить антитіло.

Інший тип структурної модифікації включає мутацію одного або більше залишків в межах структурної ділянки, або навіть в межах однієї або більше CDR ділянок, щоб видалити Т клітинні епітопи, таким чином, знизити потенційну імуногенність антитіла. Даний підхід також називається як "деімунізація", та є описаним, крім того, в деталях в публікації патенту США № 2003/0153043.

На додаток або альтернативно до модифікацій, зробленим в межах структурних або CDR ділянок, антитіла за винаходом можуть бути сконструйовані так, щоб включати модифікації в межах  $F_c$  ділянки, як правило, щоб змінити одну або декілька функціональних властивостей антитіла, таких як сироватковий період напів-виведення, фіксація комплементу, зв'язування  $F_c$  рецептора, та/або антиген-залежна клітинна цитотоксичність. Більш того, антитіло за винаходом може бути хімічно модифікованим (наприклад, один або декілька хімічних фрагментів можуть бути приєднаними до антитіла) може бути модифікованим, щоб змінити своє глікозування, знову, щоб змінити одну або більше функціональних властивостей антитіла. Кожен з даних

варіантів втілення є описаним дальше детально нижче. Нумерація залишків на Fc ділянці є такою ж, як EU індекс Кабата.

В одному варіанті втілення, шарнірну ділянку C<sub>H</sub>1 модифікують таким чином, що кількість цистеїнових залишків в шарнірній ділянці змінюється, наприклад, підвищується або знижується. Даний підхід, крім того, є описаним в патенті США № 5,677,425. Кількість цистеїнових залишків в шарнірній ділянці C<sub>H</sub>1 змінюється, наприклад, щоб сприяти утворенню легких та важких ланцюгів, або, щоб підвищити або знизити стабільність антитіла.

В іншому варіанті втілення, Fc шарнірна ділянка антитіла мутує, щоб знизити біологічний період напів-виведення антитіла. Більш конкретно, одну або більше амінокислотних мутацій вводять в граничну ділянку C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 домену Fc-шарнірного фрагменту таким чином, щоб антитіло пошкоджувало зв'язування стафілококового протеїну A (SpA) по відношенню до зв'язування нативного Fc-шарнірного домену SpA. Даний підхід, крім того, детально є описаним в патенті США № 6,165,745.

В іншому варіанті втілення, антитіло модифікують, щоб підвищити його біологічний період напів-виведення. Різні підходи є можливими. Наприклад, введенними можуть бути одна або більше з наступних мутацій: T252L, T254S, T256F, як описано в патенті США № 6,277,375. Альтернативно, щоб підвищити біологічний період напів-виведення, антитіло може бути змінене в межах C<sub>H</sub>1 або C<sub>L</sub> ділянки, щоб містити збережений епітоп, зв'язуючий рецептор, взятий з двох петель C<sub>H</sub>2 домену Fc ділянки IgG, як описано в патенті США № 5,869,046 та 6,121,022.

В іншому варіанті втілення, антитіло продукують, як юнітіло як описано в WO2007/059782, яка є включеною в даний документ у вигляді посилання в повному об'ємі.

В ще інших варіантах втілення, Fc ділянку змінюють шляхом заміщення, щонайменше, одного амінокислотного залишку на відмінний амінокислотний залишок, щоб змінити ефекторну(i) функцію(i) антитіла. Наприклад, одна або більше амінокислот, вибраних з амінокислотних залишків 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 та 322, можуть бути заміщені на відмінний амінокислотний залишок таким чином, що антитіло має змінену афінність для ефекторного ліганду, але зберігає антиген-зв'язуючу здатність батьківського антитіла. Ефекторний ліганд, афінність якого змінюється, може бути, наприклад, Fc рецептором або C1 компонентом комплексу. Даний підхід, крім того, є детально описаним в патенті США № 5,624,821 та 5,648,260.

В іншому прикладі, одна або декілька амінокислот, вибраних з амінокислотних залишків 329, 331 та 322 можуть бути заміщеними на відмінний амінокислотний залишок таким чином, щоб антитіло змінило C1q зв'язування та/або знизило або анулювало комплемент-залежну цитотоксичність (CDC). Даний підхід, крім того, детально є описаним в патенті США № 6,194,551.

В іншому прикладі, один або декілька амінокислотних залишків в амінокислотних положеннях 231 та 239 змінюються таким чином, щоб змінити здатність антитіла фіксувати комплемент. Даний підхід, крім того, є описаним в публікації заявки на патент PCT WO 94/29351.

В ще іншому прикладі, Fc ділянку модифікують так, щоб підвищити здатність антитіла виступати посередником в антитіло-залежній клітинній цитотоксичності (ADCC) та/або підвищити афінність антитіла для Fcγ рецептора шляхом модифікування однієї або більше амінокислот в наступних положеннях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 або 439. Даний підхід, крім того, є описаним в публікації PCT WO 00/42072 Presta. Більш того, сайти зв'язування на людському IgG1 for FcγR1, FcγR2, FcγR3 та FcRn були маповані та варіанти з покращеним зв'язуванням були описані (дивись, Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Специфічні мутації в положеннях 256, 290, 298, 333, 334 та 339 показані для покращення зв'язування з FcγR3. Крім того, наступні комбінаційні мутанти були показані для покращення FcγR3 зв'язування: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A та S298A/E333A/K334A. Крім того, ADCC варіанти є описаними, наприклад, в WO2006/019447.

В ще іншому прикладі, Fc ділянку модифікують, щоб підвищити період напіввиведення антитіла, як правило, шляхом підвищення зв'язування з FcRn рецептором, як описано, наприклад, в PCT/US2008/088053, US 7,371,826, US 7,670,600 та WO 97/34631. В іншому варіанті втілення, антитіло модифікують, щоб підвищити його біологічний період напів-виведення. Різні підходи є можливими. Наприклад, одна або більше з наступних мутацій можуть бути введенними: T252L, T254S, T256F, як описано в патенті США № 6,277,375 Уордом (Ward). Альтернативно, щоб підвищити біологічний період напів-виведення, антитіло може бути змінене

в межах C<sub>H</sub>1 або C<sub>L</sub> ділянки, щоб містити збережений епітоп, зв'язуючий рецептор, взятий з двох петель C<sub>H</sub>2 домену Fc ділянки IgG, як описано в патенті США № 5,869,046 та 6,121,022.

В ще іншому варіанті втілення, модифікують глікозилювання антитіла. Наприклад, аглікозильоване антитіло може бути зробленим (тобто антитіло, яке зазнає потреби в глікозилюванні). Глікозилювання може змінювати, наприклад, підвищувати афінність, антитіла для антигену. Такі вуглеводні модифікації можуть бути виконані, наприклад, шляхом зміни одного або більше сайтів глікозилювання в послідовності антитіла. Наприклад, одне або більше амінокислотних заміщень може бути зроблено, що в результаті призводить до елімінування одного або більше структурних сайтів глікозилювання варіабельної ділянки, щоб, таким чином, виключити глікозилювання в такому сайті. Таке аглікозилювання може підвищувати афінність антитіла для антигену. Такий підхід, крім того, є детально описаним в патенті США № 5,714,350 та 6,350,861 Ко (Со) та співробітниками, та може бути виконаний шляхом видалення аспарагіну в положенні 297.

Додатково або альтернативно, антитіло може бути зробленим так, що має змінений тип глікозилювання, такий як гіпофукозильоване антитіло, що має знижену кількість фукозильних залишків, або антитіло, що має підвищене бісектирування GlcNac структур. Іноді в даній галузі це називають як "сконструйована глікоформа". Такі змінені типи глікозилювання продемонстрували підвищення ADCC здатності антитіл. Такі вуглеводні модифікації, як правило, можуть бути виконані двома шляхами; наприклад, в деяких варіантах втілення, антитіло експресують в клітині-господарі за зміненим механізмом глікозилювання. Клітини зі зміненим механізмом глікозилювання описані в даній галузі в рівні техніки та можуть бути застосовані як клітини-господарі, в яких експресують рекомбінантні антитіла за винаходом, щоб, таким чином, одержати антитіло зі зміненим глікозилюванням. Посилання робиться на POTEILLIGENT® технологію. Наприклад, клітинні лінії Ms704, Ms705 та Ms709 зазнають нестачу в гені фукозилтрансферази, FUT8 (альфа (1,6) фукозилтрансфераза), таким чином, що антитіла, експресовані в Ms704, Ms705, та Ms709 клітинних лініях зазнають нестачу фукози в своїх вуглеводах. Ms704, Ms705, та Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> клітинні лінії були створені шляхом спрямованого руйнування FUT8 гена в CHO/DG44 клітинах, використовуючи два вектора заміщення [дивись, публікацію патенту США № 2004/0110704, патент США № 7,517,670 та Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng. 87:614-22]. Як інший приклад, EP 1,176,195 Ханай (Hanaï) та співробітники описують клітинну лінію з функціонально зруйнованим FUT8 геном, який кодує фукозилтрансферазу, таким чином, що антитіла, експресовані в такій клітинній лінії демонструють гіпофукозилювання шляхом зменшення або елімінування альфа 1,6 відносно зв'язаного ферменту. Ханай (Hanaï) та співробітники, крім того, описують клітинні лінії, які мають низьку ферментну активність щодо додавання фукози до N-ацетилглюкозаміну, який зв'язується з Fc ділянкою антитіла, або не має ферментної активності, наприклад, клітинна лінія щурячої мієломи YB2/0 (ATCC CRL 1662). Альтернативно, сконструйовані глікоформи, зокрема афукозильовані, можуть бути зроблені, використовуючи низькомолекулярні інгібітори шляхом глікозилювання ферментів [дивись, наприклад, Rothman et al. (1989) Mol. Immunol. 26(12):113-1123; Elbein (1991) FASEB J. 5:3055; PCT/US2009/042610 та патент США № 7,700,321]. Публікація PCT WO 03/035835 описує варіантну CHO клітинну лінію, Lec13 клітини, зі зниженою здатністю приєднувати фукозу до Asn(297)-зв'язаних вуглеводів, також призводячи в результаті до гіпофукозилювання антитіл, експресованих в такій клітині-господарі [дивись, також Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740]. Публікація PCT WO 99/54342 описує клітинні лінії, сконструйовані, щоб експресувати глікопротеїн-модифікуючі фукозилтрансферази (наприклад, бета(1,4)-N-ацетилглюкозамінілтрансферазу III (GnTIII)), таким чином, що антитіла, експресовані в сконструйованій клітинній лінії демонструють підвищене бісектирування GlcNac структур, що в результаті призводить до підвищеної ADCC активності антитіла [дивись, також Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180].

Альтернативно, залишки фукози антитіла можуть бути розщеплені, використовуючи фермент фукозидазу. Наприклад, фукозидаза альфа-L-фукозидази видаляє фукозильні залишки з антитіла [Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23].

Інша модифікація антитіла в даному документі, яка розглядається винаходом, представляє собою ПЕГилування. Антитіло може бути ПЕГильованим щоб, наприклад, підвищити біологічний (наприклад, сироватковий) період напів-виведення антитіла. Щоб ПЕГилувати антитіло, антитіло або його фрагмент, як правило, піддають взаємодії з поліетиленгліколем (ПЕГ), наприклад, реакційноздатну складноєфірну або альдегідну похідну ПЕГ, в умовах, в яких одна або декілька ПЕГ груп стають приєднаними до антитіла або фрагменту антитіла. Переважно, ПЕГилування здійснюється за рахунок реакції ацилювання або реакції алкілювання з реакційноздатною молекулою ПЕГ (або аналогічного реакційноздатного водорозчинного

полімеру). Як використовується в даному документі, мається на увазі, що термін "поліетиленгліколь" охоплює будь-яку з форм ПЕГ, які були застосовані для дериватизації інших протеїнів, таких як моно (C1-C10) алкокси- або арилокси-поліетиленгліколь або поліетиленгліколь-малеїмід. В певних варіантах втілення, антитіло, яке є ПЕГильованим, представляє собою аглікозильоване антитіло. Способи ПЕГильовання протеїнів відомі в даній галузі з рівня техніки та можуть бути застосовані до антитіл за винаходом. Дивись, наприклад, EP 0154316 та EP 0401384.

В додаткових варіантах втілення, наприклад, при застосуванні антитіла за винаходом в діагностичних цілях або цілях виявлення, антитіла можуть містити мітку. Під "міченим" в даному документі мають на увазі те, що сполука має, щонайменше, один елемент, ізотоп або хімічну сполуку, яку приєднують для того, щоб зробити можливим виявлення сполуки. Загалом, мітки розділяють на три класи: а) ізотопні мітки, які можуть бути радіоактивними або важкими ізотопами, б) магнітні, електричні, теплові; та с) кольорові або люмінесцентні барвники; незважаючи на те, що мітки також включають ферменти та частинки, такі як магнітні частинки. Переважні мітки включають, але не обмежуються цим, флуоресцентні комплекси лантанідів (включаючи європій та тербій), та флуоресцентні мітки, включаючи, але не обмежуючись цим, квантові точки, флуоресцеїн, родамін, тетраметилродамін, еозин, еритрозин, кумарин, метилкумарини, пірен, малахітовий зелений, стильбен, люцифер жовтий, каскадний блакитний, тейксоматин, червоний, Алекса барвники, ціанінові барвники, та інші, описані в 6-ому виданні Molecular Probes Handbook під редакцією Richard P. Haugland, таким чином, спеціально включені в якості посилання.

#### Лінкери

Представлений винахід передбачає кон'югати антитіло-партнер, де антитіло зв'язується з партнером за рахунок хімічного лінкеру. В деяких варіантах втілення, лінкер представляє собою пептидильний лінкер, інші лінкери включають гідразин та дисульфідні лінкери. На додаток до лінкерів, які приєднуються до партнеру, представлено розкриття, крім того, передбачає лінкерні плечі, що розщеплюються, які є прийнятними для приєднання, по суті, до будь-якого молекулярного виду. Аспект лінкерного плеча за винаходом ілюструється в даному документі шляхом посилання на їх приєднання до терапевтичного фрагменту. однак, кваліфікованому спеціалісту в даній галузі техніки буде достатньо очевидним, що лінкери можуть бути прикріплені до різних видів, включаючи, але не обмежуючись цим, діагностичні агенти, аналітичні агенти, біомолекули, агенти-мішені, мітки, які детектуються, тощо.

Застосування пептидильних та інших лінкерів в кон'югатах антитіло-партнер є описаним в попередніх заявках на патент США № 60/295,196; 60/295,259; 60/295,342; 60/304,908; 60/572,667; 60/661,174; 60/669,871; 60/720,499; 60/730,804 та 60/735,657; та заявці на патент США № 10/160,972; 10/161,234; 11/134,685; 11/134,826; та 11/398,854 та патенті США № 6,989,452 та заявці на патент PCT № PCT/US2006/37793, всі з яких включені в даний документ у вигляді посилання. Додаткові лінкери є описаними в патенті США № 6,214,345, заявці на патент США 2003/0096743 та заявці на патент США 2003/0130189, de Groot et al., J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot et al. J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot et al., J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl et al., J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik et al., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998); та попередній заявці на патент США 60/891,028.

В одному аспекті, представлено розкриття стосується лінкерів, які є корисними для приєднання груп-мішеней до терапевтичних агентів та маркерів. В іншому аспекті, дане розкриття передбачає лінкери, які надають стабільність сполукам, зниження їх токсичності *in vivo*, або в протилежному випадку прийнятно відобразиться на їх фармакокінетиках, біодоступності та/або фармакодинаміках. Як правило, переважним є те, що в таких варіантах втілення лінкер розщеплюється, вивільняючи активний лікарський засіб, як тільки лікарський засіб досягає місця його дії. Таким чином, в одному варіанті втілення, лінкери за представленим винаходом є безслідним, таким чином, що після його видалення з терапевтичного агента або маркера (таких як, під час активації), ніякого сліду присутності лінкеру не залишається. В іншому варіанті втілення, лінкери характеризуються своєю здатністю відщеплюватися в сайті, в межах або поблизу клітини-мішені, такі як в сайті терапевтичної дії або активності маркера. Таке розщеплення може бути ферментативним в природі. Дана характеристика сприяє зниженню системної активації терапевтичного агента або маркера, знижуючи токсичність та системні побічні ефекти. Переважні групи, що розщеплюються, для ферментативного розщеплення включають пептидні зв'язки, складноефірні зв'язки та дисульфідні містки. В інших варіантах втілення, лінкери є чутливими до рН та розщеплюються через зміну в рН.

Аспектом представленого розкриття є здатність контролювати швидкість, з якою лінкери розщеплюються. Часто лінкер, який швидко розщеплюється, є потрібним. В деяких варіантах

втілення, однак, лінкер, який розщеплюється більш повільно, може бути переважним. Наприклад, в композиції з подовженим вивільненням компонента або в композиції, як зі швидким вивільненням, так і з повільним вивільненням компонента, може бути корисним, забезпечення лінкеру, який розщеплюється більш повільно. WO 02/096910 передбачає декілька конкретних комплексів ліганд-лікарський засіб, що має гідразинний лінкер. Однак, не існує ніякого способу, щоб "відрегулювати" композицію лінкеру в залежності від швидкості потрібної циклізації, та конкретних сполук, описаних відщеплень ліганду від лікарського засобу при більш повільній швидкості, ніж це є переважним для багатьох кон'югатів лікарський засіб-лінкер. На протипагу цьому, гідразинні лінкери представленого винаходу передбачають діапазон швидкостей циклізації, від дуже швидко до дуже повільно, тим самим, дозволяючи вибір конкретного гідразинного лінкеру, ґрунтуючись на необхідній швидкості циклізації.

Наприклад, дуже швидка циклізація може бути досягнута з гідразинними лінкерами, які продукують один 5-членний цикл при розщепленні. Швидкості переважної циклізації для спрямованої доставки цитотоксичного агенту до клітин досягаються із застосуванням гідразинних лінкерів, які одержують, при розщепленні, або двох 5-членних кілець, або одного 6-членного кільця, що в результаті призводить до лінкеру, що має два метили в гемінальному положенні. Гем-диметильний ефект, як було показано, збільшує швидкість реакції циклізації в порівнянні з єдиним 6-членним циклом без двох метилів в гемінальному положенні. Це відбувається в результаті деформації, яка вивільняється в кільце. Іноді, однак, замісники можуть сповільнити реакцію, замість того, щоб прискорити. Часто причини уповільнення можуть бути прослідковані за стеричними невідповідностями. Наприклад, гем-диметильне заміщення дозволяє здійснити реакцію циклізації набагато швидше, в порівнянні з тим, коли гемінальним вуглецем є  $\text{CH}_2$ .

Важливо відмітити, однак, що в деяких варіантах втілення, лінкер, який розщеплюється більш повільно, може бути переважним. Наприклад, в композиції з подовженим вивільненням або в композиції, як зі швидким вивільненням, так і з повільним вивільненням компоненту, це може бути корисним, щоб забезпечити лінкер, який розщеплює більш повільно. В певних варіантах втілення, повільна швидкість циклізації досягається застосуванням гідразинного лінкеру, який продукується, при розщепленні або одного 6-членного кільця, без гем-диметильного заміщення, або одного 7-членного кільця. Лінкери також слугують для стабілізації терапевтичного агенту або маркера по відношенню до деградації, при кровообігу. Дана особливість передбачає значну перевагу, так як така стабілізація, що в результаті призводить до продовження періоду напів-виведення при кровообігу приєднаного агента або маркера. Лінкер, крім того, слугує для послаблення активності приєднаного агента або маркера так, що кон'югат є відносно доброякісним, в той час, коли знаходиться в кровообігу, та має необхідний ефект, наприклад, є токсичним, після активації в необхідному місці дії. Для кон'югатів терапевтичного агента, дана особливість лінкеру слугує для покращення терапевтичного індексу агента.

Стабілізуючі групи переважно вибирають так, щоб обмежити кліренс та метаболізм терапевтичного агента або маркера ферментами, які можуть бути присутніми в крові або нецільовій тканині та додатково вибирають, щоб обмежити перенесення агента або маркера в клітини. Стабілізуючі групи слугують для блокування деградації агента або маркера, та можуть також діяти щодо забезпечення інших фізичних характеристик агента або маркера. Стабілізуюча група може також покращувати стабільність агента або маркера при зберіганні в будь-якому вигляді препарату або в не сформульованій формі.

В ідеалі, стабілізуюча група є корисною, щоб стабілізувати терапевтичний агент або маркер, якщо він слугує для захисту агенту або маркеру від деградації при дослідженні щодо зберігання агента або маркера в людській крові при  $37^\circ\text{C}$  впродовж 2 годин та, що в результаті призводить до менше, ніж 20 %, переважно менше, ніж 10 %, більш переважно, менше, ніж 5 % та ще більш переважно менше, ніж 2 %, розщеплення агента або маркера ферментами, що є присутніми в людській крові за даних умов аналізу. Представлений винахід також стосується кон'югатів, що містять дані лінкери. Більш конкретно, винахід стосується застосування проліків, які можуть бути застосовані для лікування захворювання, особливо для хіміотерапії раку. Зокрема, застосування лінкерів, описане в даному документі, передбачає проліки, які демонструють високу специфічність дії, понижено токсичність, та покращену стабільність в крові по відношенню до проліків подібної структури. Лінкери за представленим розкриттям, як описано в даному документі, можуть бути присутніми в різних положеннях всередині молекули партнера.

Таким чином, забезпечується лінкер, який може містити будь-яке з множини груп, як частину свого ланцюга, які будуть розщеплятися *in vivo*, наприклад, в кровотоці, зі швидкістю, яка підвищується по відношенню до того з конструкторів, в яких відсутні такі групи. Крім того,

передбаченими є кон'югати лінкерних плечей з терапевтичними та діагностичними агентами. Лінкери є прийнятними для формування проліків-аналогів терапевтичних агентів та для оборотного зв'язування терапевтичного або діагностичного агента з агентом-мішенню, який детектується міткою або з твердим носієм. Лінкери можуть бути включені в комплекси, які включають цитотоксини.

Приєднання проліків до антитіла може дати додаткові переваги безпеки в порівнянні зі звичайними антитілами-кон'югатами цитотоксичних лікарських засобів. Активація проліків може бути досягнута за допомогою естерази, як в пухлинних клітинах, так і в деяких нормальних тканинах, включаючи плазму. Показано, що рівень відповідної активності естерази у людей є дуже схожим з тим, що спостерігається у щурів та приматів, крім людей, незважаючи на те, що є меншим, ніж той, що спостерігається у мишей. Активація проліків, крім того, може бути досягнута шляхом розщеплення глюкуронидазою. На додаток до пептиду, що розщеплюється, гідразину або дисульфідної групи, необов'язково вводять одну або декілька лінкерних груп, що самостійно руйнується, між цитотоксином та агентом-мішенню. Дані лінкерні групи також можуть бути описані, як спейсерні групи, та містять, щонайменше, дві реакціоноздатні функціональні групи. Як правило, одна хімічна функціональність спейсерних груп зв'язується з хімічною функціональністю терапевтичного агента, наприклад цитотоксину, тоді як інша хімічна функціональність спейсерної групи застосовується для зв'язування з хімічною функціональністю агента-мішені або лінкера, що розщеплюється. Приклади хімічних функціональностей спейсерних груп включають гідрокси, меркапто, карбонільні, карбокси, аміно, кетонні та меркаптогрупи.

Лінкерами, що самостійно руйнуються, як правило, є заміщена або незаміщена алкільна, заміщена або незаміщена арильна, заміщена або незаміщена гетероарильна, або заміщена або незаміщена гетероалкільна група. В одному варіанті втілення, алкільні або арильні групи можуть містити від 1 до 20 атомів вуглецю. Вони можуть також містити поліетиленгліколевий фрагмент.

Ілюстративні спейсерні групи включають, наприклад, 6-аміногексанол, 6-меркаптогексанол, 10-гідроксидеканову кислоту, гліцин та інші амінокислоти, 1,6-гександіол,  $\beta$ -аланін, 2-аміноетанол, цистеамін (2-аміноетантіол), 5-амінопентанову кислоту, 6-амінокапроєву кислоту, 3-малеїмідобензойну кислоту, фталід,  $\alpha$ -заміщені фталіли, карбонільну групу, тваринні складні ефіри, нуклеїнові кислоти, пептиди, тощо.

Спейсер може слугувати для введення додаткової молекулярної маси та хімічної функціональності в комплекс цитотоксин-цільовий агент. Як правило, додаткова маса та функціональність будуть впливати на сироватковий період напів-виведення та інші властивості комплексу. Таким чином, за рахунок дбайливого вибору спейсерних груп, можуть бути одержані комплекси цитотоксину з діапазоном сироваткового періоду напів-виведення.

Коли є присутніми складні спейсери, можуть бути застосовані або ідентичні, або різні спейсери.

Додатковий лінкерний фрагмент може бути використаний для того, щоб, переважно, надати підвищену розчинність або знижені агрегаційні властивості кон'югатам, що застосовують лінкер, який містить фрагмент, або модифікує швидкість гідролізу кон'югата, такі лінкери не повинні бути такими, що руйнуються самостійно. В одному варіанті втілення, зв'язуючий фрагмент представляє собою заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероалкіл або незаміщений гетероалкіл, будь-який з яких може бути лінійним, розгалуженим або циклічним. Замісниками можуть бути, наприклад, нижчий ( $C_1$ - $C_6$ ) алкіл, алкокси, алкілтіо, алкіламіно або діалкіламіно. В певних варіантах втілення, лінкери включають нециклічний фрагмент. В іншому варіанті втілення, лінкери містять будь-який позитивно або негативно заряджений амінокислотний полімер, такий як полілізін або поліаргінін. Лінкери можуть містити полімер, такий як поліетиленгліколевий фрагмент. Крім того, лінкер може містити, наприклад, як полімерний компонент, так і невеликий хімічний фрагмент. В переважному варіанті втілення, такі лінкери містять поліетиленгліколевий (ПЕГ) фрагмент. Частина ПЕГ може становити від 1 та 50 одиниць довжиною. Переважно, ПЕГ буде мати 1-12 одиниць, що повторюються, більш переважно 3-12 одиниць, що повторюються, більш переважно 2-6 одиниць, що повторюються, або ще більш переважно 3-5 одиниць, що повторюються та найбільш переважно 4 одиниці, що повторюються. Лінкер може складатися виключно з ПЕГ фрагменту, або він може також містити додатковий заміщений або незаміщений алкіл або гетероалкіл. Прийнятним є комбінування ПЕГ, як частини фрагменту, щоб підвищити розчинність комплексу у воді. Крім того, ПЕГ фрагмент знижує ступінь агрегації, яка може відбуватися під час кон'югації препарату з антитілом.

Для подальшого обговорення типів цитоксинів, лінкерів та інших способів для кон'югування

терапевтичних агентів з антитілами, дивись, також PCT публікацію WO 2007/059404 Gangwar et al. та під назвою "Cytotoxic Compounds And Conjugates, " Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. та Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. та Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264, кожна з яких є включеною в даний документ у вигляді посилання в повному об'ємі.

#### Молекули-партнери

Представлений винахід включає антитіло, кон'юговане з партнером-молекулою, такою як цитотоксин, лікарський засіб (наприклад, імунодепресант) або радіотоксин. Такі кон'югати також називаються в даному документі як "імунокон'югати." Імунокон'югати, які включають один або декілька цитотоксинів називаються, як "імунотоксини". Цитотоксин або цитотоксичний агент включає будь-яке агент, який є шкідливим (наприклад, знищує) для клітин.

Приклади молекул-партнерів представленого розкриття включають таксол, цитохалазин В, грамміцидин D, бромід етидію, еметин, мітоміцин, етопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрациндіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол та пуроміцин та їх аналоги або гомологи. Приклади молекул-партнерів також включають, наприклад, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацилдекарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретаміна, тіопахлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) та ломустин (CCNU), циклотосфамід, бусульфамід, дибромоманітол, стрептозотозин, мітоміцин C, та цис-дихлордіамін платини (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) та доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин та антраміцин (AMC)) та антимітотичні агенти (наприклад, вінкристин та вінбластин).

Інші переважні приклади молекул-партнерів, які можуть бути кон'югованими з антитілом за винаходом, включають дуокарміцини, каліхеаміцини, майтансини та ауристатини, та їх похідні. Приклад кон'югата каліхеаміцину з антитілом є комерційно доступним (Mylotarg®; American Home Products).

Переважними прикладами молекул-партнерів є CC-1065 та дуокарміцини. CC-1065 вперше був виділений з *Streptomyces zelensis* в 1981 році компанією Upjohn Company (Hanka et al, J. Antibiot. 31: 1211 (1978); Martin et al., J. Antibiot. 33: 902 (1980); Martin et al., J. Antibiot. 34: 1119 (1981)) та було встановлено наявність сильної протипухлинної та антимікробної активності як *in vitro*, так і у експериментальних тварин (Li et al., Cancer Res. 42: 999 (1982)). CC-1065 зв'язуються з дволанцюговою В-ДНК в малій борозці (Swenson et al., Cancer Res. 42: 2821 (1982)) з переважною послідовністю 5'- d(A/GNTTA)-3' та 5'-d(AAAAA)-3' та алкілює N3 положення 3'-аденіну своєї CPl лівосторонньою одиницею, яка є присутньою в молекулі (Hurley et al., Science 226: 843 (1984)).

Незважаючи на свою потенційну та широку протипухлинну активність, CC-1065 не може бути застосований у людей, тому що він викликає уповільнену смерть піддослідних тварин. Багато аналогів та похідних CC-1065 та дуокарміцинів є відомими в даній галузі з рівня техніки. Дослідження структури, синтезу та властивостей багатьох сполук було розглянуто. Дивись, наприклад, Boger et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996); та Boger et al., Chem. Rev. 97: 787 (1997). Група в Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. одержала ряд CC-1065 похідних. Дивись, наприклад, патент США № 5,101, 038; 5,641,780; 5,187,186; 5,070,092; 5,703,080; 5,070,092; 5,641,780; 5,101,038; та 5,084,468; та опубліковану заявку PCT WO 96/10405 та опубліковану заявку на Європейський патент 0 537 575 Al. Компанія Upjohn Company (Pharmacia Upjohn) також приймає активну участь в одержанні похідних CC-1065. Дивись, наприклад, патент США № 5,739,350; 4,978,757, 5,332, 837 та 4,912,227.

#### Фізичні властивості антитіла

Антитіла за представленим винаходом, крім того, можуть характеризуватися різними фізичними властивостями анти-BST1 антитіла. Різні аналізи можуть бути застосовані для виявлення та/або диференціювання різних класів антитіл, ґрунтуючись на їх фізичних властивостях.

В деяких варіантах втілення, антитіла за представленим винаходом можуть містити один або більше сайтів глікозилювання в варіабельній ділянці або легкого, або важкого ланцюга. Присутність одного або більше сайтів глікозилювання в варіабельній ділянці може в результаті призвести до підвищеної імуногенності антитіла або зміні pK антитіла за рахунок зміненого антиген-зв'язування [Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala FA та Morrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro RG (2002)

Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706]. Відомо, що глікозилювання здійснюється на фрагментах, що містять N-X-S/T послідовність. Глікозилювання варіабельної ділянки можуть досліджувати, використовуючи гліко-блотинг аналіз, який відщеплює антитіло, щоб одержати Fab, та потім досліджують глікозилювання, використовуючи аналіз, який вимірює перйодатне окиснення та утворення основи Шиффа (Schiff). Альтернативно, глікозилювання варіабельної ділянки можуть досліджувати, використовуючи Dionex рідинну хроматографію (Dionex-PX), які відщеплюють сахаради від Fab в моносахаридах, та аналізують вміст конкретного сахариду. В деяких випадках, переважним є наявність анти-BST1 антитіла, яке не містить глікозилювання варіабельної ділянки. Це може бути досягнуто або відбором антитіл, які не містять фрагмента глікозилювання в варіабельній ділянці або мутуванням залишків в фрагменті глікозилювання, використовуючи стандартні методики, добре відомі в даній галузі з рівня техніки.

В переважному варіанті втілення, антитіла за представленим винаходом не містять сайти ізомеризму аспарагіну. Ефекти деамідування або ізоаспарагінової кислоти можуть здійснюватися на N-G або D-G послідовностях, відповідно. Ефекти деамідування або ізоаспарагінової кислоти в результаті призводять до утворення ізоаспарагінової кислоти, яка знижує стабільність антитіла шляхом створення ламаної структури карбокси кінця бічного ланцюга переважніше, ніж головного ланцюга. Утворення ізоаспарагінової кислоти можуть вимірювати, використовуючи ізо-квантовий аналіз, який використовує ВЕРХ з оберненою фазою, щоб дослідити ізоаспарагінову кислоту.

Кожне антитіло буде мати унікальну ізоелектричну точку (pI), але, як правило, антитіла будуть припадати на діапазон рН від 6 до 9,5. pI для IgG1 антитіла, як правило, припадає на діапазон рН 7-9,5 та pI для IgG4 антитіла, як правило, припадає на діапазон рН 6-8. Антитіла можуть мати pI, яка виходить за даний діапазон. Незважаючи на те, що ефекти, як правило, є невідомими, існує припущення, що антитіла з pI за межами нормального діапазону можуть мати деяке розгортання та нестабільність в умовах *in vivo*. Ізоелектрична точка може бути досліджена, використовуючи капілярний ізоелектричний фокусуючий аналіз, який створює рН градієнт та може застосовувати лазерне фокусування для підвищеної точності [Janini et al (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt et al (1998) J Chromatogr A 800:355-67]. В деяких випадках, переважним є мати анти-BST1 антитіло, яке містить значення pI, яке припадає на нормальний діапазон. Це може бути досягнуто або шляхом відбору антитіла з pI в нормальному діапазоні, або шляхом мутування заряджених поверхневих залишків, використовуючи стандартні методики, добре відомі в даній галузі з рівня техніки.

Кожне антитіло буде мати температуру плавлення, яка є показовою щодо термічної стабільності [Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71]. Більш висока термічна стабільність демонструє більшу загальну стабільність антитіла *in vivo*. Температуру плавлення антитіла можуть вимірювати, використовуючи методики, такі як диференціальна скануюча калориметрія [Chen et al. (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) Immunol Lett 68:47-52].  $T_{M1}$  демонструє температуру початкового розгортання антитіла.  $T_{M2}$  демонструє температуру повного розгортання антитіла. Як правило, переважним є те, що  $T_{M1}$  антитіла за представленим винаходом становить більше, ніж 60°C, переважно більше, ніж 65°C, ще більш переважно більше, ніж 70°C. Альтернативно, термічну стабільність антитіла можуть вимірювати, використовуючи круговий дихроїзм [Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9].

В переважному варіанті втілення, антитіла вибирають такі, які не розкладаються швидко. Фрагментацію анти-BST1 антитіла можуть вимірювати, використовуючи капілярний електрофорез (CE) та MALDI-MS, як добре розуміється в даній галузі з рівня техніки [Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal. Chem. 67:3626-32].

В іншому переважному варіанті втілення, антитіла вибирають такі, які мають мінімальні агрегаційні ефекти. Агрегування може призводити до запуску небажаної імунної відповіді та/або змінених або небажаних фармакокінетичних властивостей. Як правило, антитіла є прийнятними з агрегацією 25 % або менше, переважно 20 % або менше, ще більш переважно 15 % або менше, ще більш переважно 10 % або менше та ще більш переважно 5 % або менше. Агрегацію можуть вимірювати, використовуючи декілька методик, добре відомих в даній галузі з рівня техніки, включаючи ексклюзійну колонкову (SEC) високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ), та розсіяння світла, щоб ідентифікувати мономери, димери, тримери або мультимери.

Способи конструювання антитіл

Як описано вище, анти-BST1 антитіла, що мають  $V_N$  та  $V_K$  послідовності, розкриті в даному документі, можуть бути застосовані для створення нових анти-BST1 антитіл шляхом

модифікування  $V_H$  та/або  $V_K$  послідовностей, або константної(их) ділянки(ок), приєднаної до них. Таким чином, в іншому аспекті за винаходом, структурні особливості анти-BST1 антитіла за винаходом, наприклад BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3, використовують для створення структурно споріднених анти-BST1 антитіл, які зберігають, щонайменше, одну функціональну властивість антитіла за винаходом, таку як зв'язування з людським BST1. Наприклад, одна або більше CDR ділянки BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3, або їх мутації, можуть бути комбіновані рекомбінантно з відомими структурними ділянками та/або іншими CDR, щоб створити додаткові, рекомбінантно-сконструйовані анти-BST1 антитіла за винаходом, як описано вище. Інші типи модифікацій включають ті, що є описаними в попередньому розділі. Вихідний матеріал для способу конструювання представляє собою одну або більше з  $V_H$  та/або  $V_K$  послідовностей, передбачених в даному документі, або одну або більше їх CDR ділянок. Для створення сконструйованого антитіла, немає необхідності фактично готувати (тобто, експресувати, як протеїн) антитіло, що має одну або більше з  $V_H$  та/або  $V_K$  послідовностей, передбачених в даному документі, або одну або більше їх CDR ділянок. Переважніше, інформація, яка міститься в послідовності(ях), застосовується, як вихідний матеріал для створення "другого покоління" послідовності(ей), одержаних з вихідної(их) послідовності(ей), та потім послідовність(і) "другого покоління" одержують та експресують як протеїн.

Відповідно, в іншому варіанті втілення, винахід передбачає спосіб одержання анти-BST1 антитіла, що включає: передбачене: (i) послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла, яка містить CDR1 послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 10, 9 та 56, CDR2 послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 12 або 51, 11 та 57, та/або CDR3 послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, 13 та 58; та/або (ii) послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла, яка містить CDR1 послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 16, 15 та 59, CDR2 послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 18, 17 та 60 та/або CDR3 послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 20, 19 та 61, зміну, щонайменше, одного амінокислотного залишку в послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла та/або послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла, щоб створити, щонайменше, одну змінену послідовність антитіла; та експресування зміненої послідовності антитіла як протеїну.

Стандартні методики молекулярної біології можуть бути застосовані для одержання та експресування зміненої послідовності антитіла.

Переважно, антитіло, кодоване зміненою(ими) послідовністю(ями) антитіла, є антитілом, яке зберігає одну, декілька або всі з функціональних властивостей анти-BST1 антитіл, описаних в даному документі, функціональні властивості яких включають, але не обмежуються цим: (а) зв'язування з людським BST1 з  $K_D$   $1 \times 10^{-7}$  М або менше; (b) зв'язування з людськими CHO клітинами трансфікованими з BST1.

Функціональні властивості змінених антитіл можуть бути оцінені, використовуючи стандартні аналізи доступні в даній галузі з рівня техніки та/або описані в даному документі, такі як ті, що є представленими в прикладах (наприклад, проточна цитометрія, аналізи зв'язування).

В певних варіантах втілення способів конструювання антитіл за винаходом, мутації можуть вводиться довільно або вибірково вздовж всього або частини анти-BST1 антитіла, що кодує послідовність, та в результаті модифіковані анти-BST1 антитіла можуть бути скринінговані за активністю зв'язування та/або іншими функціональними властивостями, як описано в даному документі. Мутаційні способи є описаними в даній галузі в рівні техніки. Наприклад, РСТ публікація WO 02/092780 описує способи створення та скринінгу мутацій антитіла, використовуючи мутагенез насичення, зборку синтетичного лігування або їх комбінацію. Альтернативно, РСТ публікація WO 03/074679 описує способи, що використовують розрахункові способи скринінгу, щоб оптимізувати фізико-хімічні властивості антитіл.

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують антитіла за винаходом

Інший аспект за винаходом стосується молекул нуклеїнової кислоти, які кодують антитіла за винаходом. Нуклеїнові кислоти можуть бути присутніми в цілих клітинах, в клітинному лізаті, або в частково очищеній, або по суті чистій формі. Нуклеїнова кислота є "виділена" або "виявляється по суті чистою", коли вона є очищеною від інших клітинних компонентів або інших домішок, наприклад інших клітинних нуклеїнових кислот або протеїнів, за стандартними методиками, включаючи лужну/SDS обробку, CsCl бендінг, колонкову хроматографію, агарозний гель-електрофорез та інші добре відомі в даній галузі з рівня техніки. Дивись, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing та Wiley Interscience, N. Y. Нуклеїновою кислотою за винаходом може бути, наприклад, ДНК або РНК та може або не може містити інтронні послідовності. В переважному варіанті втілення, нуклеїнова кислота представляє собою молекулу кДНК.

Нуклеїнові кислоти за винаходом можуть бути одержані із застосуванням стандартних способів молекулярної біології. Для антитіл, експресованих гібридомами, кДНК, що кодують легкий та важкий ланцюг антитіла, створеного гібридомою, можуть бути одержаними стандартною ПЦР-ампліфікацією або способами кДНК клонування. Для антитіл, одержаних з бібліотеки генів імуноглобуліну (наприклад, із застосуванням способів відображення фагів), нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло, можуть бути відновлені з бібліотеки.

Молекулами переважних нуклеїнових кислот за винаходом є ті, які кодують  $V_H$  та  $V_K$  послідовності BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3 моноклональні антитіла. ДНК послідовності, що кодують  $V_H$  послідовності BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3, показані в SEQ ID NO: 6, 5 та 54, відповідно. ДНК послідовності, що кодують  $V_K$  послідовності BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3, показані в SEQ ID NOs: 8, 7 та 55, відповідно.

Інші переважні нуклеїнові кислоти за винаходом представляють собою нуклеїнові кислоти, що мають, щонайменше, 80 % ідентичність послідовності, таку як, щонайменше, 85 %, щонайменше, 90 %, щонайменше, 95 %, щонайменше, 98 % або, щонайменше, 99 % ідентичність послідовності, з однією з послідовностей, показаних в SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 та 55, де нуклеїнові кислоти кодують антитіло за винаходом, або його антиген-зв'язуючу частину.

Відсоткова ідентичність між двома послідовностями нуклеїнової кислоти представляє собою кількість положень в послідовності, в яких нуклеотид є ідентичним, з врахуванням кількості пропусків та довжину кожного пропуску, який необхідно ввести для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Порівняння послідовностей та визначення відсоткової ідентичності між двома послідовностями можуть бути виконані із застосуванням математичного алгоритму, такого як, алгоритм Мейерса (Meyers) та Міллера (Miller), або XBLAST програми Altschul, описаної вище.

Тим не менше, далі, переважні нуклеїнові кислоти за винаходом містять одну або більше частини послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують CDR, показані в SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 та 55. В даному варіанті втілення нуклеїнова кислота може кодувати важкий та легкий ланцюг CDR1, CDR2 та/або CDR3 послідовності з BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3.

Нуклеїнові кислоти, які мають, щонайменше, 80 %, такі як, щонайменше, 85 %, щонайменше, 90 %, щонайменше, 95 %, щонайменше, 98 % або, щонайменше, 99 % ідентичність послідовності, з такою CDR-кодуючою частиною SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 та 55 ( $V_H$  та  $V_K$  посл.), також є переважними нуклеїновими кислотами за винаходом. Такі нуклеїнові кислоти можуть відрізнятися від відповідної частини SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 та 55 в не-CDR-кодуючій ділянці та/або в CDR-кодуючій ділянці. Коли відмінність знаходиться в CDR-кодуючій ділянці, CDR ділянка нуклеїнової кислоти, кодована нуклеїновою кислотою, як правило, містить одну або більше консервативних модифікацій послідовності, як визначено в даному документі, в порівнянні з відповідною CDR послідовністю BST1\_A2, BST1\_A1 або BST1\_A3.

Одного разу були одержані ДНК фрагменти, що кодують  $V_H$  та  $V_K$  сегменти, дані ДНК фрагменти надалі можуть піддавати дії відповідно до стандартних способів рекомбінантних ДНК, наприклад, перетворення генів варіабельної ділянки в гени повнорозмірного ланцюга антитіла, в гени Fab фрагмента, або в ген scFv. При даних діях,  $V_K$ - або  $V_H$ -кодуючий ДНК фрагмент функціонально зв'язується з іншим ДНК фрагментом, кодуючим інший протеїн, такий як константна ділянка антитіла або гнучкий лінкер. Мається на увазі, що термін "функціонально зв'язаний", як застосовано в даному контексті, означає, що два ДНК фрагмента зв'язуються таким чином, що амінокислотні послідовності, що кодуються двома ДНК фрагментами, зберігають скелет.

Виділена ДНК, що кодує  $V_H$  ділянку, може бути перетворена в ген повнорозмірного важкого ланцюга за рахунок функціонального зв'язування  $V_H$ -кодуючої ДНК з іншою молекулою ДНК, що кодує константну ділянку важкого ланцюга ( $C_H1$ ,  $C_H2$  та  $C_H3$ ). Послідовності мишачих генів константної ділянки важкого ланцюга є відомими в даній галузі з рівня техніки [дивись, наприклад, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] та ДНК фрагменти, що охоплюють дані ділянки, можуть бути одержані шляхом стандартної PCR ампліфікації. Константна ділянка важкого ланцюга може бути IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD константною ділянкою, але найбільш переважно представляє собою IgG1 або IgG4 константну ділянку. Для гена важкого ланцюга Fab фрагмента,  $V_H$ -кодуюча ДНК може бути функціонально зв'язаною з іншою ДНК молекулою, що кодує тільки константну ділянку важкого ланцюга  $C_H1$ .

Виділена ДНК, що кодує  $V_L/VK$  ділянку, може бути перетворена в ген повнорозмірного легкого ланцюга (а також в ген Fab легкого ланцюга) за рахунок функціонального зв'язування  $V_L$ -кодуючої ДНК з іншою молекулою ДНК, що кодує константну ділянку легкого ланцюга,  $C_L$ . Послідовності мишачих генів константної ділянки легкого ланцюга відомі в даній галузі з рівня

техніки [дивись, наприклад, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] та ДНК фрагменти, що охоплюють дані ділянки, можуть бути одержані шляхом стандартної PCR ампліфікації. В переважних варіантах втілення, константна ділянка легкого ланцюга може бути

5 каппа або лямбда константною ділянкою.

Для створення scFv гена,  $V_H$ - та  $V_L/V_K$ -кодуючі ДНК фрагменти є функціонально зв'язаними з іншими фрагментами, що кодують гнучкий лінкер, наприклад, що кодує амінокислотну послідовність  $(Gly_4-Ser)_3$ , таку як  $V_H$  та  $V_L/V_K$  послідовності, можуть бути експресовані, як суміжний протеїн з одинарним ланцюгом, з  $V_L/V_K$  та  $V_H$  ділянками, зв'язаними гнучким лінкером

10 [дивись, наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554].

Отримання моноклональних антитіл

У відповідності з винаходом BST1, або фрагмент, або його похідна може бути застосований в якості імуногену, щоб генерувати антитіла, які імуноспецифічно зв'язують такий імуноген. Такі імуногени можуть бути виділені будь-яким прийнятним способом. Кваліфікованому спеціалісту в даній галузі буде зрозуміло, що багато процедур є доступними для одержання антитіл, наприклад, як описано в Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Кваліфікованому спеціалісту в даній галузі, також буде зрозуміло, що зв'язуючі фрагменти або Fab фрагменти, які імітують антитіла, також

20 можуть бути одержані з генетичної інформації за допомогою різних процедур [Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebäck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)].

В одному варіанті втілення за винаходом, одержані антитіла зі специфічним доменом BST1. В конкретному варіанті втілення, гідрофільні фрагменти BST1 використовують як імуногени для одержання антитіла.

25 В одержанні антитіл скринінг для бажаного антитіла може бути виконаний за способом, відомим в даній галузі з рівня техніки, наприклад ІФА (імуноферментний аналіз). Наприклад, щоб вибрати антитіла, які розпізнають певний домен в BST1, він може аналізувати гібридами, що генеруються, для продукту, який зв'язується з BST1 фрагментом, що містить такий домен.

Для вибору антитіла, яке специфічно зв'язує перший BST1 гомолог, але який специфічно не зв'язує (або зв'язує менш сильно) другий BST1 гомолог, антитіло можуть вибирати ґрунтуючись на позитивному зв'язуванні з першим BST1 гомологом та відсутності зв'язування з (або знижене зв'язування з) другим BST1 гомологом. Аналогічно, для вибору антитіла, яке специфічно зв'язується з BST1, але яке специфічно не зв'язується з (або зв'язує менш сильно), ізоформою, що вирізняється, того самого протеїну (такий як, інша глікоформа, що має такий самий основний пептид, як BST1), антитіло можуть вибирати, ґрунтуючись на позитивному зв'язуванні з BST1 та відсутності зв'язування з (або зниженого зв'язування з) ізоформою, що відрізняється, (наприклад, інша глікоформа). Таким чином, представлений винахід передбачає антитіло (таке як моноклональне антитіло), яке зв'язується з більшою афінністю (наприклад, щонайменше, в 2

40 рази, такою як, щонайменше, в 5 раз, зокрема, щонайменше, в 10 раз більшою афінністю) з BST1, ніж інша ізоформа або ізоформи (наприклад, глікоформи) BST1.

Поліклональні антитіла, які можуть бути застосовані в способах за винаходом, представляють собою гетерогенні популяції молекул антитіла, одержані із сироватки імунізованих тварин. Крім того, може бути використана нефракціонована імунна сироватка. Різні процедури, відомі в даній галузі з рівня техніки, можуть бути застосовані для одержання поліклональних антитіл до BST1, фрагменту BST1, BST1-зв'язаного поліпептиду або фрагменту BST1-зв'язаного поліпептиду. Наприклад, один зі способів є очисткою поліпептидів, що викликають зацікавленість, або синтезом поліпептидів, що викликають зацікавленість, використовуючи, наприклад, способи твердофазного пептидного синтезу, добре відомого в даній галузі з рівня техніки. Дивись, наприклад Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. Vol 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Вибрані поліпептиди можуть бути потім застосовані для імунізації різних тварин-господарів шляхом ін'єкції, включаючи, але не обмежуючись цим, кроликів, мишей, щурів тощо, щоб генерувати поліклональні або моноклональні антитіла. Різні допоміжні речовини (тобто імуностимулятори) можуть бути застосовані для підвищення імунної відповіді, в залежності від виду господаря, включаючи, але не обмежуючись цим, повний або неповний ад'ювант Фрейнда (Freund), мінеральний гель, такий як гідроксид алюмінію, поверхнево-активна речовина, така як, лізолецитин, пліороніловий поліол, поліаніон, пептид, олійну емульсію, гемоціанін лімфи

60

равлика, динітрофенол, та ад'ювант, такий як BCG (бацила Кальметта-Герена) або *Corynebacterium parvum*. Додаткові допоміжні речовини також є добре відомими в даній галузі з рівня техніки.

Для одержання моноклональних антитіл (mAbs), спрямованих на BST1, можуть застосовувати будь-який спосіб, який передбачає продукування молекул антитіла за допомогою неперервних клітинних ліній в культурі. Наприклад, спосіб гібридоми, початково розроблений Кохлером (Kohler) та Мільштейном (Milstein) (1975, *Nature* 256:495-497), а також спосіб триоми, спосіб гібридоми людської В-клітини [Kozbor et al. (1983) *Immunology Today* 4:72], та спосіб EBV-гібридоми для одержання людських моноклональних антитіл Cole et al. (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]. Такі антитіла можуть бути будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgG, IgM, IgE, IgA, IgD та будь-який їх підклас. Гібридома, яка продукує моноклональні антитіла, може бути культивована *in vitro* або *in vivo*. В додатковому варіанті втілення винаходу, моноклональні антитіла можуть бути одержані у стерильних тварин із застосуванням відомої технології (PCT/US90/02545, включений в даний документ в якості посилання).

Переважаюча тваринна система для одержання гібридом представляє собою мишачу систему. Одержання гібридоми у миші представляє собою дуже добре відлагоджену процедуру. Протоколи та способи імунізації для виділення імунізованих спленоцитів для злиття є відомими в даній галузі з рівня техніки. Партнери злиття (наприклад, мишачі мієломні клітини) та процедури злиття також є відомими.

Моноклональні антитіла включають, але не обмежуються цим, людські моноклональні антитіла та химерні моноклональні антитіла (наприклад, химери людина-миша).

Химерні або гуманізовані антитіла за представленим винаходом можуть бути одержані ґрунтуючись на послідовності нелюдського моноклонального антитіла, одержаного, як описано вище. ДНК, що кодує імуноглобуліни важкого та легкого ланцюга, може бути одержана з нелюдської гібридоми, що викликає зацікавленість, та сконструйована так, щоб містити послідовності немишачого (наприклад, людського) імуноглобуліну, використовуючи стандартні способи молекулярної біології. Наприклад, для створення химерного антитіла, мишачі варіабельні ділянки можуть зв'язуватися з людськими константними ділянками, використовуючи способи, відомі в даній галузі з рівня техніки (дивись, наприклад патент США № 4,816,567 Cabilly et al.). Для створення гуманізованого антитіла, мишачі CDR ділянки можуть бути введені в людські структури, використовуючи способи, відомі в даній галузі з рівня техніки (дивись, наприклад патент США № 5,225,539 Winter, та патент США № 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 та 6,180,370 Queen et al.).

Повністю людські антитіла можуть бути одержані, використовуючи трансгенні або трансхромосомні миші, які не є здатними експресувати гени ендегенного імуноглобуліну важкого та легкого ланцюга, але які можуть експресувати гени людського важкого та легкого ланцюга. Трансгенні миші імунізують в звичайному режимі вибраним антигеном, наприклад, всією або частиною BST1. Моноклональні антитіла, спрямовані проти антигену, можуть бути одержані, використовуючи традиційну технологію гібридоми. Трансгени людського імуноглобуліну, накопичені трансгенними мишами, реконструюються під час диференціації В-клітини, та пізніше піддається класу перемикання та соматичної мутації. Таким чином, використовуючи такий спосіб, існує можливість одержати терапевтично корисні IgG, IgA, IgM та IgE антитіла. Дані трансгенні та трансхромосомні миші включають мишей HuMAb Mouse<sup>®</sup> (Medarex<sup>®</sup>, Inc.) та KM Mouse<sup>®</sup> ліній. Лінія HuMAb Mouse<sup>®</sup> (Medarex<sup>®</sup>, Inc.) описана в (Lonberg та Huszar 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Для детального обговорення даної технології продукування людських антитіл та людських моноклональних антитіл та протоколів продукування таких антитіл, дивись, наприклад, патент США 5,625,126; патент США 5,633,425; патент США 5,569,825; патент США 5,661,016; та патент США 5,545,806. Лінія KM mouse<sup>®</sup> відноситься до миші, яка несе трансген людського важкого ланцюга та трансхромосому людського легкого ланцюга, та є детально описаною в PCT публікації WO 02/43478 Ishida et al.

Більш того, альтернативні трансгенні тваринні системи, що експресують гени людського імуноглобуліну, є доступними в даній галузі та можуть бути застосовані для підвищення анти-BST1 антитіл за винаходом. Наприклад, може бути використаною альтернативна трансгенна система, яка називається як Xenomouse (Amgen, Inc); такі миші описані в, наприклад, патенті США № 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 та 6,162,963 Kucherlapati et al.

Повністю людські антитіла, які розпізнають вибраний епітоп, можуть бути створені, використовуючи спосіб, який називається як "керована селекція". При даному підході вибране нелюдське моноклональне антитіло, наприклад, антитіло миші, застосовується для керування вибором повністю людського антитіла, що розпізнає той самий епітоп [Jespers et al. (1994)

Biotechnology 12:899-903].

Крім того, альтернативні трансхромосомні тваринні системи, що експресують гени людського імуноглобуліну, є доступними в даній галузі та можуть бути застосовані для підвищення анти-BST1 антитіл. Наприклад, можуть бути застосовані миші, що несуть, як трансхромосому людського важкого ланцюга, так і трансхромосому людського легкого ланцюга, який називається як " TC миші"; такі миші є описаними в Tomizuka співавт. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Крім того, корови, що несуть трансхромосоми людського важкого та легкого ланцюга, були описаними в даній галузі [Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894] та публікації PCT № WO2002/092812, та можуть бути застосовані для підвищення анти-BST1 антитіл.

Людські моноклональні антитіла за винаходом також можуть бути одержані із застосуванням мишей SCID, у яких людські імунні клітини були відновленими таким чином, що відповідь людського антитіла може бути сгенерованою при імунізації. Такі миші описані в, наприклад, патенті США №№ 5,476,994 та 3,698,767.

Антитіла за представленим винаходом можуть бути сгенерованими шляхом застосування технології фагового дисплею для одержання та скринінгу бібліотек поліпептидів для зв'язування з вибраною мішенню [дивись, наприклад Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., Science 249, 404-6, 1990, Scott та Smith, Science 249, 386-88, 1990; та Ladner et al., патент США № 5,571,698]. Основна концепція способів фагового дисплею представляє собою встановлення фізичного зв'язку між ДНК, що кодує поліпептид для скринінгу, та поліпептидом. Даний фізичний зв'язок передбачає фагову частину, яка демонструє поліпептид як частину капсиду, що охоплюється фаговим геном, який кодує поліпептид. Встановлення фізичного зв'язку між поліпептидами та їх генетичним матеріалом дозволяє одночасний скринінг за масою дуже великої кількості фагів, що несуть різні поліпептиди. Фаг, що демонструє поліпептид з афінністю до мішені, зв'язуються з мішенню та дані фаги покращуються шляхом скринінгу за афінністю до мішені. Ідентичність поліпептидів, які відображаються з даних фагів, можуть бути визначені з їх відповідних геномів. Застосування даних способів в ідентифікованому поліпептиді, як такому, що має афінність зв'язування з потрібною мішенню, потім можуть бути синтезовані в об'ємі за допомогою традиційних засобів. Дивись, наприклад, патент США № 6,057,098, який є включеним в даний документ у всій своїй повноті, включаючи всі таблиці, Фігури та пункти формули. Зокрема, такі фаги можуть бути застосовані, щоб показати домени, які зв'язують антиген, експресовані зі спектра або комбінаторних бібліотек антитіл (наприклад, людські або мишачі). Фаг, що експресує антиген-зв'язуючий домен, який зв'язує антиген, що викликає зацікавленість, може бути вибраним або ідентифікованим з антигеном, наприклад, використовуючи мічений антиген або антиген, зв'язаний або захоплений з твердою поверхнею або кулькою. Фаг, використаний в даних способах, як правило, є ниткоподібним фагом, включаючи fd та M13, які зв'язують домени, експресовані з фага з Fab, Fv або дисульфідом, стабілізовані Fv доменами антитіла рекомбінантно злиті з будь-яким фаговим геном III або геном VIII протеїну. Способи фагового дисплею, які можуть бути застосовані для створення антитіл за представленим винаходом, включають ті, що розкриті в Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al. (1997) Gene 187 9-18; Burton et al. (1994) Advances in Immunology 57:191-280; PCT заявці на патент № PCT/GB91/01134; PCT публікаціях WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; та патенті США № 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 та 5,969,108; кожна з яких є включеною в даний документ у вигляді посилання в повному об'ємі.

Як описано в наведених вище посиланнях, після вибору фага, антитіло, що кодує ділянки з фага, може бути виділеним та застосованим для створення антитіл в цілому, включаючи людські антитіла, або будь-який інший потрібний антиген-зв'язуючий фрагмент, та експресованим в будь-якому іншому потрібному господарі, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі та бактерії, наприклад, як детально описано нижче. Наприклад, способи для рекомбінантного продукування Fab, Fab' і F(ab')<sub>2</sub> фрагментів, також можуть бути застосовані, використовуючи способи, відомі в даній галузі з рівня техніки, такі як ті, що є описаними в публікації PCT WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12 (6): 864 869; та Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34; та Better et al. (1988) Science 240:1041-1043 (вказані джерела є включеними у вигляді посилання в усій своїй повноті).

Приклади способів, які можуть бути застосовані для одержання FVS з одинарним ланцюгом та антитіл включають ті, які є описаними в патентах США 4,946,778 та 5,258,498; Huston et al. (1991), Methods in Enzymology 203:46-88; Shu et al. (1993) PNAS 90:7995-7999; та Skerra et al.

(1988) Science 240:1038-1040.

Винахід передбачає функціонально активні фрагменти, похідні або аналоги молекул анти-BST1 імуноглобуліну. Функціонально активні означає, що фрагмент, похідна або аналог є здатним встановлювати анти-анти-ідіотип антитіла (тобто третинні антитіла), які розпізнають один та той самий антиген, який є таким, що розпізнається антитілом, від якого походить фрагмент, похідна або аналог. Зокрема, в конкретному варіанті втілення антигенність ідіотипу молекули імуноглобуліну може бути підвищена за рахунок делеції структурної та CDR послідовностей, яка є С-термінальною до CDR послідовності, яка специфічно розпізнає антиген. Щоб визначити, які CDR послідовності зв'язують антиген, синтетичні пептиди, що містять CDR послідовності, можуть бути застосовані в аналізах зв'язування з антигеном, застосовуючи будь-який спосіб аналізу зв'язування, відомий в даній галузі з рівня техніки.

Представлений винахід передбачає фрагменти антитіл, такі як, але не обмежуючись цим,  $F(ab'')_2$  фрагменти та Fab фрагменти. Фрагменти антитіл, які розпізнають специфічні епітопи, можуть бути одержані, використовуючи відомі способи.  $F(ab'')_2$  фрагменти складаються з варіабельної ділянки, константної ділянки легкого ланцюга та  $C_H1$  домену важкого ланцюга, та генеруються шляхом пепсинового розщеплення молекули антитіла. Fab фрагменти генеруються шляхом відновлення дисульфідних містків  $F(ab'')_2$  фрагментів. Винахід, крім того, передбачає димери важкого ланцюга та легкого ланцюга антитіла за винаходом, або будь-який його мінімальний фрагмент, такий як Fvs або антитіла з одинарним ланцюгом (SCAs) [наприклад, як описано в патенті США 4,946,778; Bird, (1988) Science 242:423-42; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; та Ward et al. (1989) Nature 334:544-5], або будь-яку іншу молекулу з такою самою специфічністю як антитіло за винаходом. Антитіла з одинарним ланцюгом утворюються шляхом зв'язування фрагментів важкого та легкого ланцюга Fv ділянки через амінокислотний місток, одержуючи в результаті поліпептид з одинарним ланцюгом. Способи для зборки функціональних Fv фрагментів в E. coli можуть бути застосовані [Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041].

В інших варіантах втілення, винахід передбачає протеїни злиття з імуноглобулінів за винаходом (або їх функціонально активні фрагменти), наприклад, в яких імуноглобулін є злитим за рахунок ковалентного зв'язку (наприклад, пептидного зв'язку), або на N-кінці, або на С-кінці з амінокислотою послідовністю іншого протеїну (або його частини, переважно, щонайменше, 10, 20 або 50 амінокислотних частин протеїну), який не є імуноглобуліном. Переважно імуноглобулін або його фрагмент, є ковалентно зв'язаним з іншим протеїном на N-кінці константного домену. Як встановлено вище, такі протеїни злиття можуть полегшити очистку, збільшити період напів-виведення in vivo, та збільшити доставку антигену через епітеліальний бар'єр до імунної системи.

Імуноглобуліни за винаходом включають аналоги та похідні, які є модифікованими, тобто шляхом ковалентного приєднання будь-якого типу молекули, поки таке ковалентне приєднання не погіршить імуноспецифічне зв'язування. Наприклад, але не в якості обмеження, похідні та аналоги імуноглобулінів включають ті, які були додатково модифіковані, наприклад, шляхом глікозилування, ацетилювання, ПЕГилування, фосфорилювання, амідування, дериватизації відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичного розщеплення, зв'язування з клітинним лігандом або іншим протеїном тощо. Будь-які з чисельних хімічних модифікацій може бути здійснена відомими способами, включаючи, але не обмежуючись цим, специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, тощо. Крім того, аналог або похідна може містити одну або більше не класичних амінокислот.

#### Імунізація мишей

Миші можуть бути імунізовані очищеним або збагаченим препаратом BST1 антигена та/або рекомбінантного BST1 або клітин, що експресують BST1. Переважно, миші будуть 6-16 тижневого віку на момент першої інфузії. Наприклад, очищений або рекомбінантний препарат (100 мкг) BST1 антигена може бути застосований для імунізації мишей внутрішньочеревинно.

Накопичений досвід з різними антигенами показав, що миші реагують, коли їх імунізували внутрішньочеревинно (IP) антигеном в повному ад'юванті Фрейнда. Однак, було виявлено, що інші ад'юванти крім Фрейнда, також є ефективними. Крім того, було виявлено, що цілі клітини у відсутність ад'юванта ї високо імуногенними. Імунна відповідь може бути проконтрольована впродовж процесу за протоколом імунізації за зразками плазми, які одержують шляхом ретроорбітального відбору крові. Плазма може бути вивчена за допомогою ELISA (як описано нижче), щоб дослідити щодо задовільності титрів. Миші можуть підтримуватися внутрішньовенно антигеном впродовж 3 днів підряд з наступним умертвінням та видаленням селезінки, яке відбувається через 5 днів. В одному варіанті втілення, можуть бути застосовані миші лінії A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.).

Генерація трансфектоми, одержуючи моноклональні антитіла

Антитіла за винаходом можуть бути продуковані в трансфектомі клітини-господаря, використовуючи, наприклад, комбінацію способів рекомбінантного ДНК та способів генної трансфекції, як є добре відомим в даній галузі з рівня техніки [наприклад, Morrison, S. (1985) Science 229:1202].

Наприклад, для експресії антитіл, або їх фрагментів антитіл, ДНК, що кодують часткові або повнорозмірні легкі та важкі ланцюги, можуть бути одержані за стандартними способами молекулярної біології (наприклад, PCR ампліфікація або кДНК клонування, використовуючи гібридому, яка експресує антитіло, яке викликає зацікавленість) та ДНК можуть бути введені в вектори, які експресують таким чином, що гени є функціонально зв'язаними з транскрипційними та трансляційними контрольними послідовностями. В даному контексті, мається на увазі, що термін "функціонально зв'язаний" означає, що ген антитіла лігується в вектор таким чином, що транскрипційні та трансляційні контрольні послідовності в межах вектора виконують призначену їм функцію регулювання транскрипції та трансляції гена антитіла. Вектор, що експресує, та контрольні послідовності експресії вибирають таким чином, щоб бути сумісними з клітиною-господарем експресії, яку використовують.

Клітина-господар може бути спів-трансфікована з двома векторами, що експресують, за винаходом, перший вектор, що кодує важкий ланцюг похідного поліпептиду, та другий вектор, що кодує легкий ланцюг похідного поліпептиду. Два вектора можуть містити ідентичні селективні маркери, які дозволяють рівну експресію важкого та легкого ланцюга поліпептидів. Альтернативно, може бути застосований одиничний вектор, який кодує як важкий, так і легкий ланцюг поліпептидів. В таких ситуаціях, легкий ланцюг повинен бути розташований перед важким ланцюгом, щоб уникнути надлишок токсично-вільного важкого ланцюга [Proudfoot (1986) Nature 322:52; Kohler (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197]. Послідовності, що кодують, для важких та легких ланцюгів можуть містити кДНК або геномну ДНК.

Гени антитіла вставляються в вектор, що експресує за стандартними способами (наприклад, лігуванням комплементарних сайтів рестрикції на фрагменті гену та векторі антитіла або лігуванням тупих кінців, якщо сайти рестрикції не є присутніми). Варіабельна ділянка легких та важких ланцюгів антитіл, описаних в даному документі, може бути застосованим для створення повнорозмірних генів антитіла будь-якого ізо типу антитіла, за рахунок введення їх в вектори, які експресують, вже кодуючу константну ділянку важкого ланцюга та константну ділянку легкого ланцюга потрібного ізо типу таким чином, що сегмент  $V_H$  є функціонально зв'язаним з  $C_H$  сегментом(ами) в межах вектора, та сегмент  $V_L$  є функціонально зв'язаним з сегментом  $C_L$  в векторі. Додатково або альтернативно, рекомбінантний вектор, що експресує може кодувати сигнальний пептид, який полегшує секрецію ланцюга антитіла з клітини-господаря. Ген ланцюга антитіла може бути клонований в векторі таким чином, що сигнальний пептид є зв'язаним в скелеті на аміно-кінці генного ланцюгу антитіла. Сигнальний пептид може бути сигнальним пептидом імуноглобуліну або гетерологічним сигнальним пептидом (тобто сигнальним пептидом з не-імуноглобулінового протеїну).

Крім того, генні ланцюги антитіла, рекомбінантні вектори, які експресують, за винаходом проводять регуляторні послідовності, які контролюють експресію генів ланцюга антитіла в клітині-господарі. Мається на увазі, що термін "регуляторна послідовність" включає промотори, енансери та інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілювання), які контролюють транскрипцію або трансляцію генів ланцюгів антитіла. Такі регуляторні послідовності є описаними, наприклад, в Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Кваліфікованим спеціалістам в даній галузі буде зрозуміло, що конструкція експресуючого вектора, включаючи вибір регуляторних послідовностей, може залежати від таких факторів, як вибір клітини-господаря для трансформації, рівня експресії потрібного протеїну, тощо. Переважні регуляторні послідовності для експресії клітин-господарів ссавців включають вірусні елементи, які спрямовують високі рівні експресії протеїну в клітинах ссавців, таких як промотори та/або енансери, одержані з цитомегаловірусу (CMV), вірусу мавп 40 (SV40), аденовірусу, (наприклад, основний пізній промотор аденовірусу (AdMLP) та поліоми. Альтернативно, можуть бути застосовані невірусні регуляторні послідовності, такі як, промотор убиквітіну або промотор  $\beta$ -глобіну. Більш того, регуляторні елементи, які складаються з послідовності з різних джерел, таких як промоторної системи SR $\alpha$ , яка містить послідовності від раннього промотору SV40 та довгого термінального повтору вірусу типу 1 людських Т клітин лейкемії [Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472].

Крім того, гени ланцюга антитіла та регуляторні послідовності, рекомбінантні вектори, які експресують, за винаходом можуть нести додаткові послідовності, такі як послідовності, які

регулюють реплікацію вектора в клітинах-господарях (наприклад, початок реплікації) та селективних маркерних генах. Селективний маркерний ген полегшує вибір клітин-господарів, в які був введений вектор (дивись, наприклад, патенти США № 4,399,216, 4,634,665 та 5,179,017, всі від Axel et al.). Наприклад, як правило, селективний маркерний ген надає стійкість до

5 лікарських засобів, таким як G418, гігromіцин або метотрексат, для клітини-господаря, в яку був введений вектор. Переважні селективні маркерні гени включають ген дигідрофолатредуктази (DHFR) (для застосування в dhfr-клітинах-господарях з метотрексат вибір/ампліфікація) та неоген (для G418 вибору).

Для експресії легких та важких ланцюгів, вектор(и), що експресує(ють), які кодують важкі та

10 легкі ланцюги, є трансфікованими в клітину-господаря за допомогою стандартних способів. Мається на увазі, що різні форми терміна "трансфекція" охоплюють широкий спектр способів, які, як правило, використовують для введення екзогенної ДНК в прокаріотичну або еукаріотичну клітину-господаря, наприклад, електропорація, кальцій-фосфатне осадження, DEAE-декстранова трансфекція, тощо. Незважаючи на те, що теоретично можливим є експресувати

15 антитіла за винаходом або в прокаріотичних, або еукаріотичних клітинах-господарях, експресія антитіла в еукаріотичних клітинах, та найбільш переважно у ссавців клітинах-господарях, є найбільш переважним, тому що такі еукаріотичні клітини, та, зокрема, клітини ссавців, є більш вірогідними, ніж прокаріотичні клітини, щоб зібрати та секретувати правильно складене та імунологічно активне антитіло. Повідомлялось, що прокаріотична експресія генів антитіла є неефективною для виробництва з високими виходами активного антитіла [Boss, M. A. та Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13].

20

Переважають клітини-господарі ссавців для експресії рекомбінантних антитіл за винаходом включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), в поєднанні з вектором, таким як промоторний елемент раннього гену основного інтермедиату від людського цитомегаловірусу

25 [Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al. (1990) BioTechnology 8:2], dhfr-CHO клітини, описаний в Urlaub та Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, використані із селективним маркером DHFR, наприклад, як описано в R. J. Kaufman та P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), NSO клітинами мієломи, COS клітинами та SP2 клітинами. Зокрема, для застосування з NSO клітинами мієломи, інша переважна система експресії представляє собою

30 GS систему генної експресії, розкриту в WO 87/04462 (Wilson), WO 89/01036 (Bebbington) та EP 338,841 (Bebbington).

Різноманітність систем господаря експресуючого вектору може бути застосована, щоб експресувати молекулу антитіла за винаходом. Такі системи господар-експресія представляють носії, за допомогою яких послідовності, що кодують, що викликають зацікавленість, можуть бути

35 одержані та потім очищені, але, крім того, представляють собою клітини, які можуть, при трансформації або трансфікуванні з відповідною нуклеотидною послідовністю, що кодує, експресувати молекулу антитіла за винаходом *in situ*. Вони включають, але не обмежуються цим, мікроорганізми, такі як бактерії (наприклад, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформовані з рекомбінантним бактеріофагом ДНК, плазмідною ДНК або космідною ДНК, що експресує вектори, що містять кодуючі послідовності антитіла; дріжджі (наприклад, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформовані з рекомбінантними дріжджовими векторами, що експресують, які містять кодуючі послідовності антитіла; системи клітин комах, інфіковані рекомбінантним вірусом, вектори, що експресують (наприклад, бакуловірус), які містять кодуючі послідовності антитіла; системи рослинних клітин, інфіковані рекомбінантним вірусом, вектори, що експресують

45 (наприклад, вірус мозаїки цвітної капусти, CaMV; вірус тютюнової мозаїки, TMV) або трансформовані з рекомбінантними плазмідними векторами, що експресують (наприклад, Ті плазміда), що містять кодуючі послідовності антитіла; або системи клітин ссавців (наприклад, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 клітин), що несуть рекомбінантні конструкти експресії, що містять промотори, одержані з геному клітин ссавців (наприклад, промотор металотіонеїну) або з вірусів ссавців (наприклад, пізній промотор аденовірусу; 7.5K промотор вірусу коров'ячої віспи).

50

В бактеріальних системах, ряд експресуючих векторів переважно може бути вибраним в залежності від застосування, призначеного для молекули антитіла, яка експресується. Наприклад, коли велика кількість такого протеїну повинна продукуватися для створення фармацевтичних композицій, що містять молекулу антитіла, вектори, які спрямовують експресію

55 високих рівнів злиття, то небажаними можуть бути протеїнові продукти, які легко чистяться. Такі вектори включають, але не обмежуються цим, *E. coli* вектор, що експресує pUR278 (Ruther et al. (1983) EMBO J. 2:1791), в якому кодуючу послідовність антитіла, можна лігувати індивідуально в векторі в скелеті з *lac Z*, що кодує ділянку так, щоб продукувати протеїн злиття; PIN вектори [Inouye & Inouye (1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509]; та подібні вектори pGEX також можуть бути застосовані для експресії

60

чужорідних поліпептидів у вигляді злитих протеїнів з глутатіон-S-трансферазою (GST). Загалом, такі злиті протеїни є розчинними та можуть бути легко очищеними від лізованих клітин шляхом адсорбції та зв'язуванням з матрицею глутатіон-агарозних кульок, з наступним елююванням в присутності вільного глутатіону. Вектори рGEX розроблені так, щоб включити тромбін або сайти розщеплення фактора Ха протеази так, що клонований продукт цільового гену може вивільнятися з GST фрагмента.

В системі комах, *Autographa californica* вірус ядерного поліедрозу (AcNPV) застосовується в якості вектора для експресії чужорідних генів. Вірус росте в клітинах *Spodoptera frugiperda*. Антитіло кодуєчої послідовності, може бути клоноване окремо в несуттєвих ділянках (наприклад, ген поліедрину) вірусу та розташоване під контролем AcNPV промотору (наприклад, промотору поліедрину). В клітинах-господарях ссавців, може бути застосованим ряд систем експресії на вірусній основі (наприклад, експресуючій системі аденовірусу).

Як описано вище, вибирати можуть штам клітин-господарів, який модулює експресію вставленої послідовності, або модифікує та обробляє генний продукт конкретного потрібного виду. Такі модифікації (наприклад, глікозилювання) та обробка (наприклад, розщеплення) протеїнових продуктів може мати важливе значення для функції протеїну.

Для довготривалого виробництва з високим виходом рекомбінантних антитіл, стабільна експресія є переважною. Наприклад, клітинні лінії, які стабільно експресують в антитіло, яке викликає зацікавленість, можуть одержувати шляхом трансфікування клітин з експресуючим вектором, що містить нуклеотидну послідовність антитіла, та нуклеотидна послідовність є здатною до відбору (наприклад, неомицину або гігromіцину), та вибір експресії здатної до відбору маркера. Такі сконструйовані клітинні лінії можуть бути особливо корисні в скринінгу та оцінці сполук, які взаємодіють безпосередньо або опосередковано з молекулою антитіла.

Рівні експресії молекули антитіла можуть бути збільшені за допомогою вектора ампліфікації [для огляду, дивись, Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)]. Коли маркер в векторній системі, що експресує антитіло, є здатним до ампліфікації, збільшення рівня інгібітору, що є присутнім в культурі клітини-господаря, буде збільшувати кількість копій маркерного гена. Оскільки ампліфікуюча ділянка зв'язана з геном антитіла, продукування антитіла також збільшується [Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257].

Коли рекомбінантні вектори, які експресують, що кодують гени антитіла, вводяться в клітини-господарі ссавців, антитіла одержують шляхом культивування клітин-господарів впродовж періоду часу, достатнього для забезпечення експресії антитіла в клітинах-господарях, або, більш переважно, секреції антитіла в культуральному середовищі, в якому вирощують клітини-господарі. Після того як молекулу антитіла за винаходом рекомбінантно експресували, вона може бути очищеною будь-яким способом, відомим в даній галузі з рівня техніки для очистки молекули антитіла, наприклад, за допомогою хроматографії (наприклад, іонообмінної хроматографії, хроматографії за афінністю, така як з протеїном A або специфічним антигеном, та розмірної колонкової хроматографії), центрифугування, диференційної розчинності, або будь-якого іншого стандартного способу для очистки протеїнів.

Альтернативно, будь-який протеїн злиття може бути легко очищеним за рахунок застосування антитіла, специфічного до протеїну злиття, який експресують. Наприклад, система, описана на Janknecht et al. дозволяє легку очистку неденатурованих протеїнів злиття, експресованих в людських клітинних лініях [Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897]. В цій системі, що викликає зацікавленість, ген субклонують в плазміді рекомбінації коров'ячої віспи таким чином, що відкритий скелет зчитування гену трансляційно злитий з аміно-термінальною міткою, що складається з шести залишків гістидину. Мітка слугує як матриця, що зв'язує домен протеїну злиття. Екстракти з клітин, інфіковані рекомбінантним вірусом коров'ячої віспи загружаються в колонку  $Ni^{2+}$  нітрилоцтової кислоти-агарози та гістидин-мічені протеїни селективно елюють буфером, що містить імідазол.

Характеристика зв'язування антитіла з антигеном

Антитіла, які створюються, використовуючи дані способи, потім можуть бути вибрані за допомогою першого скринінгу за афінністю та специфічністю з очищеним поліпептидом, що викликає зацікавленість, та, за необхідності, порівнюючи результати афінності та специфічності антитіл з поліпептидами, які є потрібними, повинні бути виключені зі зв'язування. Антитіла можуть бути досліджені на зв'язування з BST1, наприклад, використовуючи стандартний ELISA. Процедура скринінгу може включати іммобілізацію очищених поліпептидів в окремих лунках мікротитрувальних планшетів. Розчин, який містить потенційне антитіло або групи антитіл, потім розміщують у відповідні мікротитрувальні лунки та інкубують впродовж приблизно від 30 хвилин до 2 годин. Мікротитрувальні лунки потім промивають та добавляють мічене вторинне антитіло

(наприклад, анти-мишаче антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою, якщо вирощені антитіла є мишачими антитілами) в лунки та інкубували впродовж приблизно 30 хвилин, та потім промивають. Субстрат додають в лунки та проявляється кольорова реакція, де є присутнім антитіло з іммобілізованим(и) поліпептидом(ами).

5 Антитіла, визначені таким чином, потім можуть бути додатково проаналізовані на афінність та специфічність в розробленому селективному аналізі. В розвитку імуноаналізів для протеїну-мішені, очищений протеїн-мішень діє як стандарт, за яким можна судити про чутливість та специфічність імуноаналізу із застосуванням антитіл, які були вибрані. Оскільки афінність зв'язування різних антитіл може відрізнятися, деякі пари антитіла (наприклад, в сендвіч

10 аналізах) можуть створювати стеричні перешкоди один одному, тощо, ефективність аналізу антитіла може бути більш важливою мірою, ніж абсолютна афінність та специфічність антитіла. Кваліфікованому спеціалісту в даній галузі буде зрозуміло, що більшість підходів можуть бути прийнятними у виробництві антитіл або зв'язуючих фрагментів, та скринінгу, та селекції за афінністю та специфічністю для різних поліпептидів, але ці підходи не змінюють межі винаходу.

15 Щоб визначити, чи вибрані анти-BST1 моноклональні антитіла зв'язуються з унікальними епітопами, кожне антитіло може бути біотинільованим, використовуючи комерційно доступні реагенти (Pierce, Rockford, IL). Дослідження конкуренції, використовуючи немічені моноклональні антитіла та біотинільовані моноклональні антитіла можуть виконувати із застосуванням BST1 накритих-ELISA планшетів. Зв'язування біотинільованого mAb може бути

20 виявлене за допомогою зонду стрептавідин-лужна фосфатаза. Для визначення ізотипу очищеного антитіла, ізотипні ELISA можуть бути виконані із застосуванням реагентів, специфічних для антитіла певного ізотипу.

Анти-BST1 антитіла можуть бути додатково досліджені на реактивність з BST1 антигеном за допомогою вестерн-блотингу. Коротко кажучи, BST1 може бути одержаний та підданий натрійдодецилсульфатполіакриламідному гель-електрофорезу. Після електрофорезу розділені

25 антигени переносили на нітроцелюлозні мембрани, блокували 10 % фетальною бичачою сироваткою, та зондували, використовуючи моноклональні антитіла, що піддають дослідженню. Специфічності зв'язування антитіла за винаходом також можуть бути визначені шляхом контролювання зв'язування антитіла з клітинами, що експресують BST1, наприклад,

30 використовуючи проточну цитометрію. Як правило, клітинна лінія, така як, клітинна лінія CHO, може бути трансфікованою з експресуючим вектором, що кодує BST1. Трансфікований протеїн може містити мітку, таку як, мус-мітку, переважно на N-кінці, для виявлення, використовуючи антитіло з міткою. Зв'язування антитіла за винаходом з BST1 може бути визначене шляхом інкубування трансфікованих клітин з антитілом, та виявлення зв'язаного антитіла. Зв'язування

35 антитіла з міткою на трансфікованому протеїні може бути застосоване як позитивний контроль. Специфічність антитіла за винаходом для BST1 може бути додатково вивчена шляхом визначення, так або інакше, за тим як протеїн зв'язується з іншими протеїнами, такими як інші члени Ерн родини, використовуючи ті самі способи, за якими визначають зв'язування з BST1.

#### Імунокон'югати

40 В іншому аспекті, представлений винахід показує анти-BST1 антитіло, або його фрагмент, кон'юговане з терапевтичним фрагментом, таким як цитотоксин, лікарським засобом (наприклад, імунодепресантом) або радіотоксином. Такі кон'югати згадуються в даному документі як "імунокон'югати". Імунокон'югати, які включають один або декілька цитотоксинів називають як "імунотоксини". Цитотоксин або цитотоксичний агент включає будь-який агент,

45 який є шкідливим (наприклад, вбиває) для клітин. Приклади включають таксол, цитохалазин В, граміцидин D, бромід етидію, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрациндіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол та пуроміцин та їх аналоги або гомологи. Терапевтичні агенти також включають,

50 наприклад, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, тіоепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) та ломустин (CCNU), циклотосфамід, бусульфат, дибромманітол, стрептозотозин, мітоміцин C, та цис-дихлордіамін платини (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) та доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин та антраміцин (AMC)), та антимітотичні агенти (наприклад, вінкрисдин та вінбластин).

Інші переважні приклади терапевтичних цитотоксинів, які можуть бути кон'югованими з антитілом за винаходом, включають дуокарміцини, каліхеаміцини, майтанзини та ауристатици, та їх похідні. Приклад кон'югату каліхеаміцин-антитіло є комерційно доступним (Mylotarg ®; American Home Products).

Цитотоксини можуть бути кон'югованими з антитілами за винаходом, використовуючи лінкерну технологію, доступну в даній галузі. Приклади типів лінкеру, які були застосовані для кон'югату цитотоксину з антитілом, включають, але не обмежуються цим, гідразони, тіоефіри, складні ефіри, дисульфідиди та лінкери, що містять пептиди. Лінкер може бути вибраним з тих, які, наприклад, є чутливими до розщеплення при низькому рН в лізосомному компартменті або чутливими до розщеплення протеазами, такими як протеази, що переважно експресуються в пухлинних тканинах, такі як катепсини (наприклад катепсини В, С, D).

Приклади цитотоксинів описані, наприклад, в патенті США № 6,989,452, 7,087,600, та 7,129,261 та в заявці РСТ № РСТ/US2002/17210, РСТ/US2005/017804, РСТ/US2006/37793, РСТ/US2006/060050, РСТ/US2006/060711, WO2006/110476, та заявці на патент США № 60/891,028, всі з яких є включеними в даний документ в якості посилання в усій їх повноті. Для подальшого обговорення типів цитотоксинів, лінкерів та способів кон'югування терапевтичних агентів з антитілами, дивись, також Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. та Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. та Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Антитіла за представленим винаходом також можуть бути кон'югованими з радіоактивним ізотопом, щоб створити цитотоксичні радіофармацевтичні препарати, також які називаються, як радіоімунокон'югати. Приклади радіоактивних ізотопів, які можуть бути кон'югованими з антитілами для діагностичного або терапевтичного застосування включають, але не обмежуються цим, йод-131, індій-111, ітрій-90 та лютецій-177. Спосіб одержання радіоімунокон'югатів є встановленим в даній галузі. Приклади радіоімунокон'югатів є комерційно доступними, включаючи Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) та Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), та подібні способи можуть бути застосовані для одержання радіоімунокон'югатів, використовуючи антитіла за винаходом.

Антитіла-кон'югати за винаходом можуть бути застосовані для модифікування даної біологічної відповіді, та фрагмент лікарського засобу не слід розглядати як обмежуючий для класичних хімічних терапевтичних агентів. Наприклад, фрагмент лікарського засобу може бути протеїном або поліпептидом, що має потрібну біологічну активність. Такі протеїни можуть включати, наприклад, ферментативно активний токсин або його активний фрагмент, такий як абрин, рицин А, синегнійний екзотоксин або дифтерійний токсин; протеїн, такий як фактор некрозу пухлини або інтерферона- $\gamma$ ; або модифікатори біологічної відповіді, такі як, наприклад, лімфокіни, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитний макрофаговий колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитний колонієстимулюючий фактор ("G-CSF") або інші фактори росту.

Способи кон'югування такого терапевтичного фрагмента з антитілами добре відомі, дивись, наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," в *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), та Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

#### Біспецифічні молекули

В іншому аспекті, представлений винахід показує біспецифічні молекули, що містять анти-BST1 антитіло, або його фрагмент, за винаходом. Антитіло за винаходом, або його антиген-зв'язуюча частина, може бути дериватизованим або зв'язаним з іншою функціональною молекулою, наприклад, іншим пептидом або протеїном (наприклад, інше антитіло або ліганд для рецептору), щоб створити біспецифічну молекулу, яка зв'язується, щонайменше, з двома різними сайтами зв'язування або молекулами-мішенями. Антитіло за винаходом може в дійсності бути дериватизованим або зв'язаним з більше, ніж однією іншою функціональною молекулою, щоб створити мультиспецифічні молекули, які зв'язуються з більше ніж двома різними сайтами зв'язування та/або молекулами-мішенями; такі мультиспецифічні молекули, як мається на увазі, також є охопленими терміном "біспецифічна молекула", який використовується в даному документі. Щоб створити біспецифічну молекулу за винаходом, антитіло за винаходом може бути функціонально зв'язаним (наприклад, шляхом хімічного зв'язування, генетичного злиття, нековалентної асоціації або іншим чином) з однією або більше іншими зв'язуючими молекулами, такими як інше антитіло, фрагмент антитіла, пептид або

зв'язуючий міметик, таким чином, що в результаті призводить до біспецифічної молекули.

Відповідно, представлений винахід включає біспецифічні молекули, що містять, щонайменше, одну першу специфічність зв'язування для першого цільового епітопу (тобто BST1) та другу специфічність зв'язування для другого цільового епітопу. Другий цільовий епітоп можливо є присутнім на тому самому цільовому протеїні, як і той, що зв'язаний шляхом найпершої специфічності зв'язування; або другий цільовий епітоп може бути присутнім від другого цільового протеїну, з яким є зв'язаним за допомогою першого протеїну, з яким є зв'язаним за допомогою першої специфічності зв'язування. Другий цільовий епітоп може бути присутнім на тій самій клітині, що й перший цільовий епітоп (тобто BST1); або другий цільовий епітоп може бути присутнім на мішені, яка не відображається клітиною, яка демонструє перший цільовий епітоп. Як використовується в даному документі, термін "специфічність зв'язування" стосується фрагмента, що містить, щонайменше, один варіабельний домен антитіла.

В одному варіанті втілення винаходу, другим епітопом-мішенню є рецептор Fc, наприклад, людський FcγRI (CD64) або людський Fcα рецептор (CD89). Таким чином, винахід включає біспецифічні молекули, здатні зв'язуватися як з FcγR так і з FcαR, що експресуються ефекторними клітинами (наприклад, моноцитами, макрофагами або поліморфноядерними клітинами (PMN)), та з клітинами-мішенями, що експресують BST1. Дані біспецифічні молекулярні мішені BST1, що експресують клітини до активності ефекторної клітини, та тригер Fc рецептор-опосередкованої ефекторної клітини, такої як фагоцитоз BST1, експресують клітини, антитіло залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC), цитокінове вивільнення або покоління супероксиданіону.

В іншому варіанті втілення за винаходом, другий цільовий епітоп представляє собою CD3 або CD5. Таким чином, винахід включає біспецифічні молекули, здатні зв'язуватися, як з CD3, так і з CD5, що експресують ефекторні клітини (наприклад, CD3 або CD5, що експресують цитотоксичні Т-клітини), та з клітинами-мішенями, що експресують BST1. Дані біспецифічні молекули цільової BST1, що експресують клітини до активності ефекторних клітин та тригера CD3 або CD5-опосередкованих ефекторних клітин, наприклад, Т-клітинне клональне розширення та Т-клітинна цитотоксичність. В даному варіанті втілення, біспецифічне антитіло за винаходом може мати всього два або три варіабельних домени антитіла, де перша частина біспецифічного антитіла є здатною підбирати за активністю людську імунну ефекторну клітину, використовуючи специфічне зв'язування з ефекторним антигеном, розташованим на людській імунній ефекторній клітині, в якій ефекторний антиген представляє собою людський CD3 або CD5 антиген, де вказана перша частина, яка складається з одного варіабельного домену антитіла, та друга частина біспецифічного антитіла є здатною специфічно зв'язуватися з цільовим антигеном іншим, ніж ефекторний антиген, наприклад, BST1, де зазначений цільовий є розташованим на цільовій клітині іншій, ніж вказана людська імунна ефекторна клітина, та вказаній другій частині, що містить один або два варіабельних домени антитіла.

В варіанті втілення винаходу, в якому біспецифічна молекула є мультиспецифічною, молекула може додатково включати третю специфічність зв'язування, на додаток до анти-Fc специфічності зв'язування або анти-CD3 або CD5 специфічності зв'язування та анти-BST1 специфічності зв'язування. В одному варіанті втілення, третя специфічність зв'язування представляє собою частину фактору анти-посилення (EF), наприклад, молекулу, яка зв'язується з поверхневим протеїном, включеним в цитотоксичну активність, та, таким чином, збільшує імунну відповідь проти клітини-мішені. "Частина фактору анти-посилення" може бути антитілом, функціональним фрагментом антитіла або лігандом, що зв'язується з даною молекулою, наприклад, антигеном або рецептором, та тим самим в результаті призводить до посилення ефекту зв'язування детермінантів з рецептором Fc або антигеном клітини-мішені. "Частина фактору анти-посилення" може зв'язувати рецептор Fc або антиген клітини-мішені. Альтернативно, частина фактору анти-посилення може зв'язуватися з організмом, який відрізняється від організму, з яким зв'язуються перші та другі специфічності зв'язування. Наприклад, частина фактору анти-посилення може зв'язувати цитотоксичну Т-клітину (наприклад, через CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 або іншу імунну клітину, що в результаті призводить до збільшення імунної відповіді проти клітини-мішені).

В одному варіанті втілення, біспецифічні молекули за винаходом містять, як специфічність зв'язування, щонайменше, одне антитіло, або фрагмент антитіла, включаючи, наприклад Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb або Fv з одинарним ланцюгом. Крім того, антитіло може бути димером легкого ланцюга або важкого ланцюга, або будь-яким його мінімальним фрагментом, таким як Fv або конструктор з одинарним ланцюгом, як описано в патенті США № 4,946,778, зміст якого є включеним в якості посилання.

В одному варіанті втілення, специфічність зв'язування для рецептора Fcγ забезпечується

моноклональним антитілом, зв'язування яких не блокується людським імуноглобуліном G (IgG). Як використовується в даному документі, термін "рецептор IgG" відноситься до будь-якого з восьми  $\gamma$ -ланцюгових генів, розташованих на хромосомі 1. Дані гени кодують загалом дванадцять трансмембранних або розчинних рецепторних ізоформ, які згруповані в три Fc $\gamma$  класи рецепторів: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), та Fc $\gamma$ RIII (CD16). В одному переважному варіанті

втілення, рецептор Fc $\gamma$  є людським Fc $\gamma$ RI з високою афінністю. Людський Fc $\gamma$ RI представляє собою 72 кДа молекулу, яка показує високу афінність для мономерного IgG ( $10^8$ - $10^9$  M $^{-1}$ ). Одержання та характеристика певних переважних анти-Fc $\gamma$  моноклональних антитіл є описаними в публікації PCT WO 88/00052 та в патенті США No: 4,954,617, вчення, яких в повному об'ємі включені в якості посилання. Дані антитіла зв'язуються з епітопом Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII або Fc $\gamma$ RIII на сайті, який відрізняється від Fc $\gamma$  сайту зв'язування рецептора та, таким чином, їх зв'язування не блокується по суті фізіологічними рівнями IgG. Специфічні анти-Fc $\gamma$ RI антитіла прийнятні в даному винаході є mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 та mAb 197. Гібридома, яка продукує mAb 32, є доступною з Американської колекції типових культур (American Type Culture Collection), з ATCC номером доступу HB9469. В інших варіантах втілення, антитіло анти-Fc $\gamma$  рецептора є гуманізованою формою моноклонального антитіла 22 (H22). Одержання та характеристика антитіла H22 є описаними в Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 та публікації PCT WO 94/10332. H22 антитіло, що продукує клітинну лінію, є депонованим в Американській колекції типових культур під позначенням HA022CL1 та має номер доступу CRL 11177.

В ще інших переважних варіантах втілення, специфічність зв'язування для рецептора Fc забезпечується за допомогою антитіла, яке зв'язується з людським рецептором IgA, наприклад Fc-альфа рецептором [Fc $\alpha$ RI (CD89)], зв'язування якого переважно не блокується людським імуноглобуліном A (IgA). Мається на увазі, що термін "рецептор IgA" включає генний продукт одного  $\alpha$ -гена (Fc $\alpha$ RI), розташованого на хромосомі 19. Відомо, що даний ген кодує декілька альтернативно сплайсованих трансмембранних ізоформ від 55 до 110 кДа. Fc $\alpha$ RI (CD89) конститутивно експресується на моноцитах/макрофагах, еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитах, але не в популяціях неефекторної клітини. Fc $\alpha$ RI має середню афінність ( $\approx 5 \times 10^7$  M $^{-1}$ ), як для IgA1, так і для IgA2, яка збільшується при дії цитокінів, таких як G-CSF або GM-CSF [Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440]. Чотири Fc $\alpha$ RI-специфічних моноклональних антитіл, які були визначені як A3, A59, A62 та A77, які зв'язують Fc $\alpha$ RI за межами зв'язуючого домену IgA ліганду, були описаними [Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764].

Fc $\alpha$ RI та Fc $\gamma$ RI є переважними рецепторами триггеру для застосування в біспецифічних молекулах за винаходом, тому що вони (1) експресуються, головним чином, на імунних ефекторних клітинах, наприклад моноцитах, PMNs, макрофагах та дендритних клітинах; (2) експресуються на високих рівнях (наприклад, 5 000-100 000 на клітину); (3) є медіаторами цитотоксичних активностей (наприклад, ADCC, фагоцитоза); та (4) виступають посередником посиленої антигенної презентації антигенів, включаючи власні-антигени, мішені до них.

Антитіла, які можуть бути застосовані в біспецифічних молекулах за винаходом, є мишачими, людськими, химерними та гуманізованими моноклональними антитілами.

Біспецифічні молекули за представленим винаходом можуть бути одержані шляхом кон'югування компонента специфічності зв'язування, наприклад, анти-FcR, анти-CD3, анти-CD5 та анти-BST1 специфічностей зв'язування, використовуючи способи, відомі в даній галузі з рівня техніки. Наприклад, специфічність зв'язування кожної біспецифічної молекули може бути згенерована окремо та потім вони можуть бути кон'юговані одна з іншою. Коли специфічностями зв'язування є протеїни або пептиди, то можуть бути застосовані різноманітні конденсуючі або перехресно-сшиваючі агенти для ковалентної кон'югації. Приклади перехресно-сшиваючих агентів включають протеїн A, карбодіїмід, N-сукцинімідил-S ацетилтіоацетат (SATA), 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойну кислоту) (DTNB), о-фенілендималеїмід (oPDM), N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), та сульфосукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) [дивись, наприклад Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648]. Інші способи включають ті, які описані в Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, та Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375. Переважними кон'югуючими агентами є SATA та сульфо-SMCC, обидва доступні від Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)].

Додаткова бівалентна робота була зроблена для біспецифічних за конструюванням подвійного зв'язування в повнорозмірному антитілі подібних форматів (Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297; USSN12/477,711; Michaelson et al., 2009, mAbs 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo et al., 2000, Protein Engineering 13[5]:361-367; USSN09/865,198; Shen et

al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472; спеціально є включеними в даний документ в якості посилання).

Коли специфічностями зв'язування є антитіла, вони можуть бути кон'югованими за рахунок сульфогідрильного зв'язування С-термінальних шарнірних ділянок двох важких ланцюгів. В особливо переважному варіанті втілення шарнірну ділянку модифікують, щоб містити непарну кількість сульфгідрильних залишків, переважно один, до кон'югації.

Альтернативно, обидві специфічності зв'язування можуть бути кодовані в тому самому векторі та експресовані, та зібрані в тій самій клітині-господарі. Даний спосіб є особливо прийнятним, коли біспецифічні молекули є mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')<sub>2</sub> або лігандом х Fab протеїну злиття. Біспецифічна молекула за винаходом може бути молекулою з одинарним ланцюгом, що містить одне антитіло з одинарним ланцюгом та детермінанту зв'язування, або біспецифічною молекулою з одинарним ланцюгом, що містить дві детермінанти зв'язування. Біспецифічні молекули можуть містити, щонайменше, дві молекули з одинарним ланцюгом. Способи одержання біспецифічних молекул описані, наприклад, в патентах США з номерами 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; та 5,482,858, всі з яких спеціально є включеними в даний документ у вигляді посилання.

Зв'язування біспецифічних молекул з їх специфічними мішенями може бути підтвердженим, наприклад, твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA), радіоімуноаналізом (RIA), FACS-аналізом, біоаналізом (наприклад, інгібуванням росту) або аналізом Вестерн-блотинг. Кожен з даних аналізів, як правило, виявляє присутність комплексів протеїн-антитіло, що викликають особливий інтерес, за допомогою застосування міченого реагенту (наприклад, антитіла) специфічного для комплексу, що викликає інтерес. Наприклад, комплекси FcR-антитіло можуть бути виявлені із застосуванням, наприклад, фермент-зв'язаного антитіла або фрагмента антитіла, який розпізнає та специфічно зв'язується з комплексами антитіло-FCR. Альтернативно, комплекси можуть бути виявлені, використовуючи будь-яке з множини інших імуноаналізів. Наприклад, антитіло може бути радіоактивно міченим та застосованим в радіоімуноаналізі (RIA) (дивись, наприклад, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, яка включена в якості посилання в даний документ). Радіоактивний ізотоп може бути виявленим за допомогою таких засобів, як застосування в γ лічильника, або сцинтиляційного лічильника, або ауторадіографією.

#### Фрагменти антитіл та антитіла-міметики

Представлений винахід не обмежується традиційними антитілами та може бути здійснений за рахунок застосування фрагментів антитіл та антитіл-міметиків. Як детально описано нижче, широкий спектр фрагментів антитіл та технологій антитіла-міметика в даний час є розробленими та широко відомими в даній галузі з рівня техніки. Тоді як, ряд даних технологій, таких як антитіла домену, нанотіла та юнітіла, використовують фрагменти або інші модифікації, структур традиційних антитіл, існують також альтернативні технології, такі як афібоді, DARPs, антикаліні, авімери, та версатіла, які використовують структури зв'язування, які, тоді як вони імітують традиційне антитіло зв'язування, створюються та функціонують за рахунок різних механізмів.

Домени антитіл (dAbs) є найменшими функціональними одиницями зв'язування антитіл, що відповідають варіабельним ділянкам або важких (V<sub>H</sub>), або легких (V<sub>L</sub>) ланцюгів людських антитіл. Домени антитіл молекулярною масою приблизно 13 кДа. Домантіс (Domantis) розробила серію великих та високо функціональних бібліотек повністю людського V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> dAbs (більше, ніж десять мільярдів різних послідовностей в кожній бібліотеці), та використовує дані бібліотеки, щоб вибрати dAbs, які є специфічними для терапевтичних мішеней. На відмінність від багатьох традиційних антитіл, домени антитіла добре експресуються в бактеріальних, дріжджових та ссавцевих клітинних системах. Більш детальна інформація про домени антитіл та способи їх одержання можуть бути одержані, використовуючи посилання на патент США № 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; США № 2004/0110941; заявку на Європейський патент № 1433846 та Європейські патенти 0368684 & 0616640; WO 05/035572, WO 04/101790, WO 04/081026, WO 04/058821, WO 04/003019 та WO 03/002609, кожна з яких, є включеною в даний документ в якості посилання у всій своїй повноті.

Нанотіла представляють собою терапевтичні протеїни, одержані з антитіл, які мають унікальні структурні та функціональні властивості від антитіл, що зустрічаються в природі, з важким ланцюгом. Дані антитіла з важким ланцюгом містять один варіабельний домен (V<sub>HH</sub>) та два константних домени (C<sub>H2</sub> та C<sub>H3</sub>). Важливо відмітити, що клонований та виділений V<sub>HH</sub> домен є повністю стабільним поліпептидом, що приховує повну антиген-зв'язуючу здатність вихідного антитіла з важким ланцюгом. Нанотіла мають високу гомологію з V<sub>H</sub> доменами

людських антитіл та можуть бути надалі гуманізовані без будь-якої втрати активності. Важливо відмітити, що нанотіла мають низький імунотензійний потенціал, який був підтверджено в дослідженнях на приматах з нанотілом сполук свинцю.

Нанотіла об'єднують переваги традиційних антитіл з важливими особливостями низькомолекулярних лікарських засобів. Подібно до традиційних антитіл, нанотіла показують високу специфічність до мішеней, високу афінність до своєї мішені та низьку властиву їй токсичність. Однак, подібно до низькомолекулярних лікарських засобів вони можуть інгібувати ферменти та легко одержати доступ до розпадини рецепторів. Крім того, нанотіла є надзвичайно стабільними, можуть бути введені шляхами іншими, ніж ін'єкційний (дивись, наприклад, WO 04/041867, яка включена в даний документ в якості посилання в повному об'ємі), та є простими в виготовленні. Інші переваги нанотіл включають розпізнавання незвичайних або прихованих епітопів, як результат їх невеликого розміру, зв'язування в порожнині або в активних сайтах протеїнових мішеней з високою афінністю та селективністю в зв'язку з їх унікальною 3-вимірною, форматною гнучкістю лікарських засобів, адаптацією періоду напів-виведення та легкого і швидкого виявлення нових лікарських засобів.

Нанотіла кодуються одиничними генами та ефективно продукуються в майже всіх прокариотичних та еукаріотичних господарях, наприклад, *E.coli* (дивись, наприклад, US 6,765,087, який є включеним в даний документ в якості посилання в повному об'ємі), гриби цвілі (наприклад, *Aspergillus* або *Trichoderma*) та дріжджі (наприклад, *Saccharomyces*, *Kluuyveromyces*, *Hansenula* або *Pichia*) (дивись, наприклад, US 6,838,254, який є включеним в даний документ в якості посилання в повному об'ємі). Процес продукування масштабують та одержують мульти-кілограмні кількості нанотіл. Оскільки нанотіла демонструють чудову стабільність в порівнянні з традиційними антитілами, вони можуть бути сформульованими як готовий до застосування розчин довгого строку зберігання.

Спосіб наноклонування (дивись, наприклад, WO 06/079372, яка є включеною в даний документ в якості посилання в повному об'ємі) є запатентованим способом генерації нанотіл проти потрібної мішені, ґрунтуючись на автоматизованій високопродуктивній селекції В-клітин, та міг би застосовуватися в контексті представленого винаходу.

Юнітіла є ще одним фрагментом технології антитіла, однак, такий фрагмент ґрунтується на видаленні шарнірної ділянки з IgG4 антитіла. Делеція шарнірної ділянки, що в результаті призводить до молекули, яка, по суті, є наполовину меншою традиційних IgG4 антитіл та переважніше має одновалентну ділянку зв'язування, ніж бівалентну ділянку обов'язкового IgG4 антитіла. Крім того, добре відомо, що IgG4 антитіла є інертними і, таким чином, не взаємодіють з імунною системою, яка може бути переважною для лікування захворювань, для яких не потребується імунна відповідь, та дана перевага передається до юнітіл. Наприклад, юнітіла можуть функціонувати, щоб інгібувати або мовчати, але не вбивати, клітини, до яких вони є приєднаними. Крім того, зв'язування юнітіла з раковими клітинами не стимулює їх до проліферації. Крім того, оскільки юнітіла мають приблизно половину розміру традиційного IgG4 антитіла, вони можуть показати краще розподілення в великих солідних пухлинах з потенційно вигідною ефективністю. Юнітіла, які виводяться з організму з однаковою швидкістю до цілих IgG4 антитіл, є здатними зв'язуватися з аналогічною афінністю з їх антигенами, як цілі антитіла. Подальші подробиці щодо юнітіл можуть бути одержані за посиланням на патентну публікацію WO 2007/059782, яка є включеною в даний документ в якості посилання в повному об'ємі.

Молекули афібоді представляють собою новий клас афінних протеїнів, який ґрунтується на протеїновому домені з 58-амінокислотними залишками, одержаними від одного з IgG-зв'язуючих доменів стафілококового протеїну А. Даний триспиральний пучковий домен був використаний як каркас для конструювання комбінаторних фагемідних бібліотек, з яких можуть бути вибрані варіанти афібоді, мішень яких є на потрібних молекулах, використовуючи технологію фагового дисплею [Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA (1997) "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain" *Nat Biotechnol* 15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA (2002) "Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A" *Eur J Biochem.* 269:2647-55.]. Проста, надійна структура молекул афібоді в комбінації з їх низькомолекулярною масою (6 кДа) роблять їх прийнятними для широкого кола застосувань, наприклад, в якості реагентів для виявлення [Ronmark J. et al. (2002) "Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*" *J Immunol Methods* 261:199-211] та для інгібування взаємодії рецепторів [Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA (2003) "Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering" *Protein Eng* 16:691-7]. Подальші деталі афібоді та способів їх виробництва можуть бути одержані, використовуючи посилання на патент США № 5,831,012, яке є включеним в даний документ в

якості посилання в повному об'ємі.

Мічені афібоді, крім того, можуть бути прийнятними для одержання зображень для визначення множини ізоформ.

DARPs (сконструйовані протеїни з анкериним повторенням) є одним з прикладів антитіла-міметика DRP (сконструйований протеїн з повторенням) технології, яка була розроблена для застосування здатностей зв'язування поліпептидів не-антитіла. Протеїни з повторенням, такі як протеїни з анкериним або лейцин-збагаченим повторенням, є повсюдними зв'язуючими молекулами, які походять, на відмінність від антитіла, всередині- та позаклітинно. Їх унікальна модульна архітектура характеризується структурними одиницями, що повторюються, (повторення), які складаються разом, щоб сформувати подовжені домени повторення, що демонструють варіабельні та модульні поверхні зв'язування мішені. Ґрунтуючись на даній модульності, комбінаторні бібліотеки поліпептидів можуть бути згенеровані з високо різноманітними специфічностями зв'язування. Дана стратегія включає дизайн загального, типового елементу структури само-сумісних повторів, що відображають варіабельні поверхневі залишки та їх довільну зборку в домени повторів.

DARPs можуть бути продуковані в бактеріальних системах експресії з дуже високими виходами, та вони належать до найбільш стабільних протеїнів з відомих. Відбирали високоспецифічні, високо-афінні DARPs в широкому діапазоні протеїнів-мішеней, включаючи людські рецептори, цитокіни, кінази, людські протеази, віруси та мембранні протеїни. DARPs, що мають афінність, можуть бути одержані в однорозрядному наномолярному до пікомолярного діапазоні.

DARPs були застосовані в широкому діапазоні застосувань, включаючи ELISA, сендвіч ELISA, аналіз проточної цитометрії (FACS), імуногістохімію (IHC), чіп додатку, афінну очистку або вестерн-блотинг. Доведено, що DARPs також є високо активним в внутрішньоклітинному компартменті, наприклад, як внутрішньоклітинні маркерні протеїни, злиті з зеленим флуоресцентним протеїном (GFP). DARPs були додатково застосовані для інгібування вірусного запису з IC50 в рМ діапазоні. DARPs є не тільки ідеальними для блокування взаємодій протеїн-протеїн, але також інгібує ферменти. Протеази, кінази та транспортери успішно інгібуються, найбільш часто аллостеричний режим інгібування. Дуже швидкі та специфічні збагачення на пухлині та дуже прийнятні співвідношення пухлини до крові роблять DARPs добре прийнятними для діагностики або терапевтичних підходів *in vivo*.

Додаткова інформація щодо DARPs та інших технологій DRP може бути знайдено в публікації заявки на патент США № 2004/0132028, та міжнародній патентній публікації № WO 02/20565, обидві з яких є включеними в представлений опис в якості посилання в повному їх об'ємі.

Антикаліні є додатковою технологією антитіла-міметика. Однак, в даному випадку специфічність зв'язування відбувається за рахунок ліпокалінів, родини протеїнів з низькою молекулярною масою, які природно та інтенсивно експресуються в людських тканинах та рідині тіла. Ліпокаліні еволюціонували, щоб виконувати ряд функцій *in vivo*, пов'язаних з фізіологічним транспортом та збереженням хімічно чутливих або нерозчинних сполук. Ліпокаліні мають надійну внутрішню структуру, яка містить високо консервативну  $\beta$ -бочку, яка підтримує чотири петлі на одному кінці протеїну. Дані петлі утворюють вхід в зв'язуючий карман, та конформаційні відмінності в даній частині молекули розглядаються для зміни в специфічності зв'язування між окремими ліпокалінами.

В той час як загальна структура гіперваріабельних петель, що підтримується  $\beta$ -листвою структурою, що зберігається, нагадує імуноглобуліни, ліпокаліні значно відрізняються від антитіла з точки зору розміру, які складаються з одного поліпептидного ланцюга з 160-180 амінокислот, яка є незначно більшим, ніж один імуноглобуліновий домен.

Ліпокаліні клонують та їх петлі піддають конструюванню з метою створення антикалінів. Одержані бібліотеки структурно різноманітних антикалінів, та проявлення антикаліну дозволяє зробити вибір та скринінг функції зв'язування, з наступною експресією та продукуванням розчинного протеїну для подальшого аналізу в прокаріотичних або еукаріотичних системах. Дослідження успішно продемонстрували, що можуть бути розроблені антикаліні, які є специфічними для практично будь-якого людського цільового протеїну, який може бути виділений, та можуть бути одержані афінності зв'язування в наномолярному або більш високому діапазоні.

Антикаліні, крім того, можуть бути відформатовані, як подвійні мішені протеїни, так звані дуокаліні. Дуокалін зв'язує дві окремі терапевтичні мішені в один мономерний протеїн, який легко продукується, використовуючи стандартні виробничі процеси, в той же час, зберігаючи цільову специфічність та афінність незалежно від структурної орієнтації його двох зв'язуючих

доменів.

Модуляція декількох мішеней за рахунок одної молекули є особливо переважним в відомих захворюваннях, щоб включати більше одного причинного фактору. Крім того, бі- або мультивалентні формати зв'язування, такі як дуокаліни, мають значний потенціал в таргетуванні клітинної поверхні молекул при захворюванні, агоністичні ефекти, що виступають посередниками на сигнальному шляху трансдукції або індукуючі розширені ефекти інтерналізації через зв'язування та кластеризацію клітинних поверхневих рецепторів. Крім того, висока внутрішня стабільність дуокалінів є співрозмірною з мономерними антикалінами, пропонуючи гнучкі формулювання та доставки потенціалу для дуокалінів.

Додаткова інформація відносно антикалінів може бути знайдена в патенті США No: 7,250,297 та в міжнародній патентній публікації WO 99/16873, обидві з яких є включеними в даний опис в якості посилання в повному їх об'ємі.

Інша технологія антитіло-міметик прийнятна в контексті представленого винаходу представляє собою авімери. Авімери одержують з великої родини людських позаклітинних рецепторних доменів *in vitro* шляхом зчеплення екзонів та фагового дисплею, створюючи протеїни з мультидоменами зі зв'язуючими та інгібуючими властивостями. Показано, що зв'язування декількох незалежних доменів зв'язування створює авідності, що в результаті призводить до покращеної афінності та специфічності в порівнянні з традиційними одно-епітопними протеїнами зв'язування. Інші потенційні переваги включають просте та ефективне виробництво мультимішенних конкретних молекул в *Escherichia coli*, підвищеної термостабільності та стійкості до протеаз. Авімери з суб-наномолярною афінністю були одержані від різних мішеней.

Додаткова інформація щодо авімерів може бути знайдена в опублікованих заявках на патент США № 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, всі з яких є включеними в даний опис в якості посилання в повному їх об'ємі.

Версатіла є іншою технологією антитіло-міметик, яка могла бути використана в контексті представленого винаходу. Версатіла представляють собою невеликі протеїни з 3-5 кДа з > 15 % цистеїнів, які утворюють високу дисульфідну щільність клітинних каркасів, замінюючи гідрофобне ядро, які мають типові протеїни. Заміна великої кількості гідрофобних амінокислот, що містять гідрофобне ядро, на невелику кількість дисульфідних результатів в протеїні, який є меншим, більш гідрофільним (менша агрегація та не-специфічне зв'язування), більш стійким до протеаз та нагрівання, та має більш низьку густину Т-клітинних епітопів, тому що залишки, які вносять найбільший вклад в презентацію МНС, є гідрофобними. Всі чотири з даних властивостей є добре відомими, що впливає на імуногенність, та очікується, що разом вони викликають більше зниження імуногенності.

Стимулювання версатіл відбувається з природних ін'єкційних біофармацевтичних препаратів, які одержують від п'явок, змій, павуків, скорпіонів, равликів та анемонів, які, як відомо, демонструють неочікувано низьку імуногенність. Починаючи з вибраних природних родин протеїну, шляхом дизайну та шляхом скринінгу за розміром, гідрофобністю, протеолітичного процесингу антигену та епітопна густина є мінімізованими до рівнів значно більш низьких середнього показника для природних ін'єкційних протеїнів.

Враховуючи структуру версатіла, дані антитіло-міметики пропонують багатосторонній формат, який включає мульти-валентність, мульти-специфічність, різноманітність механізмів напів-виведення, модулі таргетингу тканини та відсутність Fc ділянки антитіла. Крім того, Версатіла виробляються в *E.coli* з високими виходами за рахунок їх гідрофільності та невеликого розміру, версатіла є добре розчинними та можуть бути сформульовані в високих концентраціях. Версатіла є виключно термостабільними (вони можуть піддаватися кип'ятінню) та пропонують подовжений строк зберігання.

Додаткова інформація щодо версатіла може бути знайдена в опублікованій заявці на патент США № 2007/0191272, який є наведеним в даному документі в якості посилання в повному об'ємі.

Мається на увазі, що детальний опис фрагменту антитіла та технології антитіло-міметика, передбачені вище, не є повним переліком всіх технологій, які могли б бути застосовані в контексті представленого опису. Наприклад, та також не в якості обмеження, різні додаткові технології, включаючи альтернативні технології ґрунтуючись на поліпептиді, такі як злиття комплементарних, що визначають ділянки, як вказано в Qui et al. (2007) *Nature Biotechnology* 25(8):921-929, яка є включеною в даний документ в якості посилання в повному об'ємі, а також технології ґрунтуючись на нуклеїнових кислотах, такі як технології аптамерів РНК, описані в патентах США № 5,789,157, 5,864,026, 5,712,375, 5,763,566, 6,013,443, 6,376,474, 6,613,526,

6,114,120, 6,261,774, та 6,387,620 та, всі з яких є включеними в даний документ в якості посилання, могли б бути застосовані в контексті представленого винаходу.

#### Фармацевтичні композиції

В іншому аспекті, представлений винахід передбачає композицію, наприклад, фармацевтичну композицію, яка містить одне або комбінацію з моноклональних антитіл, або антиген-зв'язуючу(і) частину(и), за представленим винаходом, сформульованих разом з фармацевтично прийнятним носієм. Такі композиції можуть включати одне або комбінацію з (наприклад, двох або більше різних) антитіл, або імунокон'югати, або біспецифічні молекули за винаходом. Наприклад, фармацевтична композиція за винаходом може містити комбінацію з антитіл (або імунокон'югатів, або біспецифічних), які зв'язуються з різними епітопами на антигені-мішені, або які мають комплементарні активності.

Фармацевтичні композиції за винаходом також можуть вводитися в комбінаційній терапії, тобто в поєднанні з іншими агентами. Наприклад, комбінаційна терапія може включати анти-антитіло за представленим винаходом в поєднанні з, щонайменше, одним іншим протипухлинним агентом, або протизапальним, або імунодепресантним агентом. Приклади терапевтичних агентів, які можуть бути застосовані в комбінаційній терапії, описані більш детально нижче в розділі, присвяченому використанню антитіла за винаходом.

Як використовується в даному документі, "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які та всі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні та протигрибкові засоби, ізотонічні та агенти відкладеного всмоктування, тощо, які є фізіологічно сумісними. Переважно, носій є прийнятним для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, парентерального, спінального або епідермального введення (наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії). В залежності від способу введення, активні сполуки, тобто антитіла, імунокон'югати або біспецифічні молекули, можуть бути покриті в матеріалі для захисту сполуки від дії кислот та інших природних умов, які можуть інактивувати сполуку.

Фармацевтичні сполуки за винаходом можуть включати одну або декілька фармацевтично прийнятних солей. "Фармацевтично прийнятна сіль" стосується солі, яка зберігає потрібну біологічну активність вихідної сполуки та не дає ніяких небажаних токсикологічних ефектів [дивись, наприклад, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19]. Приклади таких солей включають кислотно-адитивні солі та основно-адитивні солі. Кисотно-адитивні солі включають солі, одержані з нетоксичних неорганічних кислот, таких як соляна, азотна, фосфорна, сірчана, бромисто-воднева, йодистоводнева, фосфориста, тощо, а також з нетоксичних органічних кислот, таких як аліфатичні моно- та дикарбонові кислоти, феніл-заміщені алканові кислоти, гідроксіалканові кислоти, ароматичні кислоти, аліфатичні та ароматичні сульфокислоти, тощо. Основно-адитивні солі включають солі, одержані з лужноземельних металів, таких як натрій, калій, магній, кальцій, тощо, а також з нетоксичних органічних амінів, таких як N, N'-дибензилетилендіаміну, N-метилглукаміну, хлорпрокаїну, холіну, діетаноламіну, етилендіаміну, прокаїну, тощо.

Фармацевтична композиція за винаходом може також включати фармацевтично прийнятний антиоксидант. Приклади фармацевтично прийнятних антиоксидантів включають: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, цистеїну гідрохлорид, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфат натрію, тощо, (2) розчинні в олії антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутильований гідроксіанізол (ВНА), бутильований гідрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол, та тому подібне; та (3) метал-хелатуючі агенти, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТО), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота, та тому подібне.

Приклади прийнятних водних та неводних носіїв, які можуть бути застосовані в фармацевтичних композиціях за винаходом, включають воду, етанол, поліолі (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, тощо), та їх прийнятні суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, та ін'єкційні органічні складні ефіри, такі як етилолеат. Належна плинність може підтримуватися, наприклад, шляхом застосування покриваючих матеріалів, таких як лецитин, шляхом підтримання потрібного розміру частинок у випадку дисперсій, та шляхом застосування поверхнево-активних речовин.

Дані композиції можуть, крім того, містити допоміжні речовини, такі як консерванти, зволожуючі агенти, емульгуючі агенти та диспергуючі агенти. Запобігання присутності мікроорганізмів може бути забезпечено, як процедурами стерилізації, вказаними вище, так і шляхом включення різних антибактеріальних та протигрибкових агентів, наприклад, парабенів, хлорбутанолів, фенолсорбінової кислоти, та тому подібне. Крім того, може бути потрібним, щоб композиції включають ізотонічні агенти, такі як цукри, хлорид натрію, тощо. Крім того, подовження всмоктування ін'єкційної фармацевтичної форми може бути визвано включенням

агентів, які сповільнюють всмоктування, такі як моностеарат алюмінію та желатин.

Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини або дисперсії, та стерильні порошки для негайного приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Застосування таких засобів та агентів для фармацевтично активних речовин є відомими в даній галузі з рівня техніки. За виключенням деяких випадків, коли будь-які традиційні середовища або агент є несумісними з активними сполуками, припускається їх застосування в фармацевтичних композиціях за винаходом. Додаткові активні сполуки також можуть бути включені в композиції.

Терапевтичні композиції, як правило, повинні бути стерильними та стабільними в умовах виробництва та зберігання. Композиція може бути сформульована у вигляді розчину, мікроемульсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, прийнятної для лікарських засобів з високою концентрацією. Носій може бути розчинником або дисперсійним середовищем, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь, та рідкий поліетиленгліколь, тощо), та їх прийнятні суміші. Належна плинність може підтримуватися, наприклад, за рахунок застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання потрібного розміру частинок у випадку дисперсії, та шляхом застосування поверхнево-активних речовин. В багатьох випадках переважні будуть включати ізотонічні агенти, наприклад, цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт, сорбіт, або хлорид натрію в композиції. Подовжене всмоктування ін'єкційних композицій може бути викликаним шляхом включення в композицію агента, який затримує всмоктування, наприклад, солей моностеарату та желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини можуть бути одержані шляхом включення активної сполуки в потрібній кількості у відповідний розчинник з одним або комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, за необхідністю, з наступною стерилізацією мікрофільтрацією. Як правило, дисперсії готують шляхом введення активної сполуки в стерильний носій, який містить основне дисперсійне середовище та інші необхідні інгредієнти з перелічених вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів, переважними способами одержання є вакуумна сушка та сушка при заморожуванні (ліофілізація), які дають порошок активного інгредієнту плюс будь-який додатковий потрібний інгредієнт з попередньо стерилізованого фільтрацією його розчину.

Кількість активного інгредієнту, яку можуть комбінувати з матеріалом-носієм для одержання одиничної дозованої форми, буде залежати від суб'єкта, якого лікують, та конкретного способу введення. Кількість активного інгредієнту, яку можуть комбінувати з матеріалом-носієм для одержання одиничної дозованої форми, як правило, буде такою, що композиція забезпечить терапевтичний ефект. Як правило, виходячи зі 100 відсотків, дана кількість буде знаходитись в межах від приблизно 0,01 відсотка до приблизно 99 відсотків активного інгредієнта, переважно, від приблизно 0,1 відсотка до приблизно 70 відсотків, найбільш переважно, від приблизно 1 відсотка до приблизно 30 відсотків активного інгредієнта в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Схеми дозування регулювали, щоб забезпечити оптимальну потрібну відповідь (наприклад, терапевтичну відповідь). Наприклад, можна вводити один болюс, декілька окремих доз можна вводити впродовж довгого часу або доза може бути пропорційно зменшена або збільшена, як показано в зв'язку з гострою необхідністю терапевтичної ситуації. Особливо переважно є формулювання парентеральних композицій в одиничній дозованій формі для простоти введення та однорідності дозування. Дозована одинична форма, як використовується в даному документі, стосується фізично дискретних одиниць, прийнятних як одиничні дози для суб'єктів, які піддаються лікуванню, та кожна одиниця містить раніше визначену кількість активної сполуки, розраховані на одержання потрібного терапевтичного ефекту в поєднанні з потрібним фармацевтичним носієм. Специфікація для дозованих одиничних форм за винаходом диктується способом та безпосередньо залежить від (а) унікальних характеристик активної сполуки та певного терапевтичного ефекту, який повинен бути досягнутий, та (b) обмежений, властивостями процесу складання суміші з такої активної сполуки для лікування чутливості у суб'єктів.

Для введення антитіла, дозування знаходиться в діапазоні приблизно від 0,0001 до 100 мг/кг, та більш звичайно від 0,01 до 5 мг/кг, від маси тіла господаря. Наприклад, дозування може становити 0,3 мг/кг маси тіла, 1 мг/кг маси тіла, 3 мг/кг маси тіла, 5 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг маси тіла, або в межах 1-10 мг/кг. Ілюстративний режим лікування включає введення один раз на тиждень, один раз кожні два тижні, один раз кожні три тижні, один раз кожні чотири тижні, один раз в місяць, один раз кожні 3 місяці або один раз кожні три-шість місяців. Переважні режими дозування для анти-BST1 антитіла за винаходом включають 1 мг/кг маси тіла або 3 мг/кг маси тіла шляхом внутрішньовенного введення, де антитіло дозволяють застосовувати за

однією з наступних схем дозування: (I) кожні чотири тижні впродовж шести дозувань, потім кожні три місяці; (II) кожні три тижні; (III) 3 мг/кг маси тіла один раз з наступною дозою 1 мг/кг маси тіла кожні три тижні.

В деяких способах, два або більше моноклональних антитіла з різними специфічностями зв'язування вводять одночасно, в даному випадку доза кожного введеного антитіла знаходиться в межах вказаних діапазонів. Антитіло зазвичай вводять декілька разів. Інтервали між одиничними дозами можуть бути, наприклад, щотижневими, щомісячними, кожні три місяця або щорічні. Інтервали також можуть бути нерегулярними, як показано шляхом вимірювання рівнів антитіла в крові до цільового антигену пацієнта. В деяких способах, дозування регулюється для досягнення концентрації антитіла в плазмі приблизно 1-1000 мкг/мл та в деяких способах приблизно 25-300 мкг/мл.

Альтернативно, антитіло можуть вводити у вигляді препарату з уповільненим вивільненням, в даному випадку потребується менш часте повторення введення. Дозування та частота змінюються в залежності від періоду напів-виведення антитіла у пацієнта. Загалом, людські антитіла показують самий довгий період напів-виведення, після чого слідує гуманізовані антитіла, химерні антитіла та нелюдські антитіла. Дозування та частота введення може варіювати в залежності від того, лікування є профілактичним або терапевтичним. В профілактичних застосуваннях відносно низьку дозу вводять у відносно нечасті інтервали впродовж тривалого періоду часу. Деякі пацієнти продовжують отримувати лікування впродовж всього свого життя. При терапевтичних застосуваннях відносно високі дози у відносно короткі інтервали часу, які іноді є необхідними до прогресування захворювання, зменшуються або зупиняються, та переважно, до того як пацієнт показує часткове або повне покращення симптомів захворювання. Після цього пацієнту можуть вводити профілактичний режим.

Фактичні рівні доз активних інгредієнтів в фармацевтичних композиціях за представленим винаходом можуть варіювати так, щоб одержати кількість активного інгредієнта, яка є ефективною для досягнення потрібної терапевтичної відповіді у конкретного пацієнта, в композиції та спосіб введення, не будучи токсичним для пацієнта. Вибраний рівень дози буде залежати від різноманіття фармакокінетичних факторів, включаючи активність конкретних композицій за представленим винаходом, які застосовуються, або його складного ефіру, солі або аміду, способу введення, часу введення, швидкості виведення конкретної сполуки, яку застосовують, тривалості лікування, інших лікарських засобів, сполук та/або речовин, що застосовують в комбінації з конкретними композиціями, вік, стать, масу тіла, стан, загальний стан здоров'я та до історії хвороби пацієнта, якого лікують, та тому подібні фактори, добре відомі в галузі медицини з рівня техніки.

"Терапевтично ефективна доза" анти-BST1 антитіла за винаходом в результаті призводить, переважно, до зменшення проявів симптомів захворювання, збільшення частоти та тривалості безсимптомних періодів захворювання, або до попередження порушення або непрацездатності за рахунок пригнічення захворювання. Наприклад, для лікування BST1 опосередкованих пухлин, "терапевтично ефективна доза" переважно інгібує ріст клітин або ріст пухлини, щонайменше, приблизно на 20 %, більш переважно, щонайменше, приблизно на 40 %, ще більш переважно, щонайменше, приблизно на 60 %, та ще більш переважно, щонайменше, приблизно на 80 % по відношенню до суб'єктів, яких не піддавали лікуванню. Здатність сполуки інгібувати ріст пухлини може бути оцінена в системі тваринної моделі, що прогнозує ефективність в людських пухлинах. Альтернативно, дана властивість композиції може бути оцінена шляхом аналізу здатності сполук інгібувати ріст клітин, таке інгібування може бути виміряне *in vitro* шляхом аналізів, відомих кваліфікованому спеціалісту в даній галузі. Терапевтично ефективну кількість терапевтичної сполуки може зменшувати розмір пухлини, або іншим чином полегшити симптоми у суб'єкта. Кваліфікований спеціаліст в даній галузі техніки буде здатний визначити такі кількості, ґрунтуючись на таких факторах, як розмір суб'єкта, важкість симптомів суб'єкта, та конкретні композиції або вибраного способу введення.

Композиція за представленим винаходом може бути введена одним або декількома способами введення, використовуючи один або більше з різноманітності способів, відомих в даній галузі з рівня техніки. Як буде зрозуміло кваліфікованому спеціалісту в даній галузі, спосіб та/або засіб введення буде варіювати в залежності від бажаних результатів. Переважні способи введення для антитіла за винаходом включають внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньошкірний, внутрішньочеревний, підшкірний, спінальний або інші парентеральні способи введення, наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії. Вираз "парентеральне введення", як використовується в даному документі, означає способи введення, інші, ніж ентеральне та місцеве введення, зазвичай шляхом ін'єкції, та включають, без обмеження, внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоартеріальну, інтратекальну, внутрішньокапсульну,

внутрішньоочну, внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, внутрішньочеревну, транстрахеальну, підшкірну, підшкірну, внутрішньосуглобну, субкапсулярну, субарахноїдальну, інтраспінальну, епідуральну та внутрішньом'язову ін'єкцію та інфузію.

Альтернативно, антитіло за винаходом може бути введено, використовуючи непарентеральний шлях, наприклад, місцевий, епідермальний або шляхом введення через слизову, наприклад, інтраназально, перорально, вагінально, ректально, сублінгвально або місцево.

Активні сполуки можуть бути одержані з носіями, які будуть захищати сполуку від швидкого вивільнення, наприклад, препарат з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти, трансдермальні пластири та мікроінкапсульовані системи доставки. Застосованими можуть бути біосумісні полімери, що біорозкладаються, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоєфіри та полімолочна кислота. Багато способів одержання таких препаратів є запатентованими або загалом відомими спеціалістам в даній галузі з рівня техніки [дивись, наприклад, Sustained та Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Терапевтичні композиції можуть бути введені за допомогою медичних пристроїв, відомих в даній галузі з рівня техніки. Наприклад, в переважному варіанті втілення, терапевтична композиція за винаходом може бути введена, використовуючи безголковий підшкірний ін'єкційний пристрій, такий як, пристрої, описані в патенті США № 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; або 4,596,556. Приклади добре відомих імплантатів та модулів прийнятих в представленому винаході, включають: патент США № 4,487,603, який розкриває мікро-інфузійний насос, що імплантується, для видачі ліків з регульованою швидкістю; патент США № 4,486,194, який розкриває терапевтичний пристрій для введення лікарських засобів через шкіру; патент США № 4,447,233, який розкриває лікарський інфузійний насос для доставки лікарського засобу з певною швидкістю інфузії; патент США № 4,447,224, який розкриває інфузійний пристрій, що імплантується, з варіабельним потоком для безперервної доставки лікарського засобу; патент США № 4,439,196, який розкриває осмотичну систему доставки лікарського засобу, що має багатокамерні відсіки; та патент США № 4,475,196, який розкриває осмотичні системи доставки лікарського засобу. Дані патенти є включеними в даний документ у вигляді посилання. Багато інших таких імплантатів, систем доставки, та модулів є відомими для спеціалістів в даній галузі.

В певних варіантах втілення, моноклональні антитіла за винаходом можуть бути сформульовані так, щоб забезпечити належне розподілення *in vivo*. Наприклад, гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) виключає багато високо гідрофільних сполук. Щоб впевнитись, що терапевтичні сполуки за винаходом проникають через ГЕБ (якщо потрібно), вони можуть бути сформульовані, наприклад, в ліпосоми. Для способів виробництва ліпосом, дивись, наприклад, в патентах США 4,522,811; 5,374,548; та 5,399,331. Ліпосоми можуть містити один або більше фрагментів, які селективно транспортуються в певні клітини або органи, таким чином підвищуючи цільову доставку лікарських засобів [дивись, наприклад V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685]. Приклади цільових фрагментів включають фолат або біотин (дивись, наприклад патент США 5,416,016.); манозиди [Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]; антитіла [P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]; рецептор поверхнево-активного протеїну A [Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134]; p120 [Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090]; дивись, також K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

#### Застосування та способи

Антитіла, композиції антитіла та способи за представленим винаходом мають чисельні *in vitro* та *in vivo* діагностичні та терапевтичні переваги, пов'язані з діагностуванням та лікуванням BST1 опосередкованих захворювань.

В деяких варіантах втілення, дані молекули можуть бути введені в клітини в культурі, *in vitro* або *ex vivo*, або в людські організми, наприклад, в *in vivo*, для лікування, попередження та діагностики різних захворювань. Як використовується в даному документі, мається на увазі, що термін "суб'єкт" включає людину та тварину, крім людини. Тварини, крім людини, включають всі хребетні, наприклад, ссавців та не ссавців, такі як нелюдиноподібні примати, вівці, собаки, кішки, корови, коні, кури, амфібії та рептилії. Переважні суб'єкти включають пацієнтів-людей, що мають розлади, опосередковані активністю BST1. Способи є особливо прийнятними для лікування пацієнтів-людей, що мають розлади, пов'язані з експресією аберантних BST1. Коли антитіла до BST1 вводять разом з іншим агентом, то два можуть бути введені в будь-якому порядку або одночасно.

При заданому специфічному зв'язуванні антитіл за винаходом для BST1, антитіла за винаходом можуть бути застосовані для специфічного визначення експресії BST1 на поверхні клітин та, більш того, можуть бути застосовані для очистки BST1 за рахунок імуноафінної очистки.

Крім того, при заданій експресії BST1 на пухлинних клітинах, антитіла, композиції антитіла та способи за представленим винаходом можуть бути застосовані для лікування суб'єкта з пухлиногенним розладом, наприклад, розладом, який характеризується присутністю пухлинних клітин, що експресують BST1, включаючи, наприклад, гостру мієлоїдну лейкемію (AML), В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію, рак молочної залози, рак кишечника, рак нирки, рак голови та шиї, рак легені, рак яєчників та рак підшлункової залози. Продемонстровано, що BST1 інтерналізується при зв'язуванні антитіла, як показано, нижче в прикладі 5, таким чином, дозволяючи антитілам за винаходом бути використаними в будь-якому механізмі дії корисного навантаження, наприклад, ADC підхід, радіоімунокон'югатний або ADEPT підхід.

В одному варіанті втілення, антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули та композиції) за винаходом можуть бути застосовані для виявлення рівнів BST1, або рівнів клітин, які містять BST1 на поверхні їх мембрани, рівні яких потім можуть бути пов'язані з певними симптомами захворювань. Альтернативно, антитіла можуть бути застосовані для інгібування або блокування функції BST1, які, в свою чергу, можуть бути пов'язані з попередженням або полегшенням певних симптомів захворювань, тим самим, включаючи BST1 як медіатор захворювання. Це може бути досягнуто шляхом контактування зразку та контрольного зразку з анти-BST1 антитілом в умовах, які дозволяють формування комплексу між антитілом та BST1. Будь-які комплекси, утворені між антитілом та BST1 виявляються та порівнюються в зразку та контролі.

В іншому варіанті втілення, антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули та композиції) за винаходом можуть бути спочатку досліджені на активність зв'язування, пов'язану з терапевтичним або діагностичним застосуванням *in vitro*. Наприклад, композиції за винаходом можуть бути досліджені, використовуючи проточні цитометричні аналізи, описані в прикладах нижче.

Антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, імунокон'югати та композиції) за винаходом мають додаткову перевагу в терапії та діагностиці, захворювань пов'язаних з BST1. Наприклад, моноклональні антитіла, мультиспецифічні або біспецифічні молекули та імунокон'югати можуть бути застосовані, щоб викликати *in vivo* або *in vitro* одну або більше з наступних біологічних активностей: інгібувати ріст та/або знищення клітини, що експресує BST1; бути посередником фагоцитозу або ADCC клітини, що експресує BST1 в присутності людських ефекторних клітин або блокувати BST1 лігандне зв'язування з BST1.

В конкретному варіанті втілення, антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули та композиції) використовуються *in vivo* для лікування, попередження або діагностики різних захворювань, пов'язаних з BST1. Приклади захворювань, пов'язаних з BST1 включають, серед іншого, людські ракові тканини, що представляють собою гостру мієлоїдну лейкемію (AML), В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію, рак молочної залози, рак кишечника, рак нирки, рак голови та шиї, рак легені, рак яєчників та рак підшлункової залози.

Прийнятні способи введення композицій антитіла (наприклад, моноклональних антитіл, мультиспецифічних та біспецифічних молекул та імунокон'югатів) за винаходом *in vivo* та *in vitro* є добре відомими в даній галузі з рівня техніки та можуть бути вибрані спеціалістами. Наприклад, композиції антитіла можуть вводитися у вигляді ін'єкції (наприклад, внутрішньовенної або підшкірної). Прийнятні використовувані дозування молекул будуть залежати від віку та маси суб'єкта та концентрації та/або складу композиції антитіла.

Як раніше описано, анти-BST1 антитіла за винаходом можуть разом вводиться з одним або більше іншими терапевтичними агентами, наприклад, цитотоксичним агентом, радіотоксичним агентом або імунодепресантом. Антитіло може бути зв'язане з агентом (як імунокомплекс) або може вводиться окремо від агенту. В останньому випадку (роздільне введення), антитіло може бути введене до, після або одночасно з агентом або може бути разом введене з іншими відомими терапіями, наприклад, протираковою терапією, наприклад випроміненням. Такі терапевтичні агенти включають, серед іншого, протипухлинні агенти, такі як доксорубіцин (адриаміцин), цисплатин, блеоміцину сульфат, кармустин, хлорамбуцил та циклофосфамідгідроксисечовину, які, самі по собі, є ефективними тільки на рівнях, які є токсичними або субтоксичними для пацієнта. Цисплатин вводять внутрішньовенно у вигляді дози 100 мг/кг один раз в чотири тижні та адриаміцин внутрішньовенно вводять у вигляді дози

60-75 мг/мл один раз кожні 21 день. Інші агенти, прийнятні для сумісного введення з антитілами за винаходом включають інші агенти, які застосовують для лікування раку, наприклад, гострої мієлоїдної лейкемії (AML), В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії, раку молочної залози, раку кишечника, раку нирки, раку голови та шиї, раку легень, раку яєчників або раку підшлункової залози, такі як Авастин®, 5FU та гемцитабін. Сумісне введення анти-BST1 антитіл, або їх антиген-зв'язуючих фрагментів, за представленим винаходом з хіміотерапевтичними агентами передбачає два протиракових агента, які діють за різним механізмом, які дають цитотоксичний ефект щодо людської пухлинної клітини. Таке сумісне введення може вирішити проблеми, пов'язані з розвитком резистентності до лікарських засобів або зі зміною антигенності пухлинних клітин, які зробили б їх nereакційноздатними по відношенню до антитіл.

Мішень-специфічні ефекторні клітини, наприклад, ефекторні клітини зв'язані з композиціями (наприклад, моноклональних антитіл, мультиспецифічних та біспецифічних молекул) за винаходом також можуть бути застосовані в якості терапевтичних агентів. Ефекторні клітини для таргетингу можуть бути людськими лейкоцитами, такими як макрофаги, нейтрофіли або моноцити. Інші клітини включають еозинофіли, природні клітини-кілери та інші клітини, які несуть IgG- або IgA-рецептори. Якщо необхідно, ефекторні клітини можуть бути одержані від суб'єкта, який потребує лікування. Мішень-специфічні ефекторні клітини можуть вводиться у вигляді суспензії клітин в фізіологічно прийнятному розчині. Кількість клітин, що вводиться, може становити порядку  $10^8$ - $10^9$ , але буде варіювати в залежності від терапевтичної мети. В загальному випадку, кількість буде достатньою, щоб одержати локалізації в клітині-мішені, наприклад, в пухлинній клітині, що експресують BST1, та впливати на знищення клітин, наприклад, шляхом фагоцитозу. Способи введення також можуть варіювати.

Терапія мішень-специфічними ефекторними клітинами може бути виконана в поєднанні з іншими способами для видалення клітин-мішеней. Наприклад, протипухлинна терапія із застосуванням композицій (наприклад, з моноклональними антитілами, мультиспецифічними та біспецифічними молекулами) за винаходом та/або ефекторними клітинами, що містяться в цих композиціях, можуть бути застосованими в поєднанні з хіміотерапією. Крім того, комбінаційна імунотерапія може бути використана, щоб спрямувати дві різні цитотоксичні ефекторні сукупності на відторгнення пухлинних клітин. Наприклад, анти-BST1 антитіла зв'язані з анти-Fc-гамма R1 або анти-CD3 можуть бути застосовані в поєднанні з агентами специфічно зв'язуючими IgG- або IgA-рецептори.

Біспецифічні та мультиспецифічні молекули за винаходом також можуть бути застосовані для модуляції FcγR або FcγR рівнів на ефекторних клітинах, таких як шляхом обмеження та ліквідації рецепторів на поверхні клітини. Суміші анти-Fc-рецепторів також можуть бути застосовані для даної мети.

Композиції (наприклад, моноклональних антитіл, мультиспецифічних та біспецифічних молекул та імунокон'югатів) за винаходом, які мають комплєменти, які зв'язують сайти, такі як частини від IgG1, -2, або -3 або IgM, які зв'язують комплємент, також можуть бути застосовані в присутності комплєменту. В одному варіанті втілення, ex vivo лікування популяції клітин, що містять клітини-мішені із зв'язуючим агентом за винаходом та відповідні ефекторні клітини можуть бути доповнені додаванням комплєменту або сироватки, що містить комплємент. Фагоцитоз клітин-мішеней, покритих зв'язуючим агентом за винаходом, може бути покращений шляхом зв'язування комплєменту протеїнів. В іншому варіанті втілення клітини-мішені, покриті композиціями (наприклад, моноклональних антитіл, мультиспецифічних та біспецифічних молекул) за винаходом також можуть лізувати комплєментом. В ще іншому варіанті втілення, композиції за винаходом не активують комплємент.

Композиції (наприклад, моноклональних антитіл, мультиспецифічних та біспецифічних молекул та імунокон'югатів) за винаходом також можуть вводиться разом з комплєментом. В певних варіантах втілення, представлене розкриття передбачає композиції, що містять антитіла, мультиспецифічні або біспецифічні молекули та сироватку або комплємент. Дані композиції можуть бути корисними, коли комплємент розташований в безпосередній близькості до антитіл, мультиспецифічних або біспецифічних молекул. Альтернативно, антитіла, мультиспецифічні або біспецифічні молекули за винаходом та комплємент або сироватка можуть вводиться окремо.

Крім того, в межах представленого винаходу знаходяться набори, що містять композиції антитіла за винаходом (наприклад, моноклональних антитіл, біспецифічних або мультиспецифічних молекул або імунокон'югатів) та інструкції щодо застосування. Набір може додатково містити один або більше додаткових реагентів, таких як імунодепресант, цитотоксичний агент або радіотоксичний агент, або одну або більше додаткових антитіл за винаходом (наприклад, антитіла, що мають комплєментарну активність, які зв'язуються з

епітопом в BST1 антигені, який відрізняється від першого антитіла).

Відповідно, пацієнтам, що отримували композиції антитіла за винаходом, можуть додатково вводити (до, одночасно або після введення антитіла за винаходом) інший терапевтичний агент, такий як цитотоксичний або радіотоксичний агент, який посилює або збільшує терапевтичний ефект антитіла.

В інших варіантах втілення, суб'єкт може додатково отримувати агент, який модулює, наприклад, посилює або інгібує, експресію або активність Fcγ або Fcγ рецепторів, наприклад, за допомогою лікування суб'єкта цитокином. Переважні цитокини для введення під час лікування мультиспецифічними молекулами включають гранулоцит колонієстимулюючий фактор (G-CSF), гранулоцит-макрофаг колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), інтерферон-γ (IFN-γ) та фактор некрозу пухлини (TNF).

Композиції (наприклад, антитіл, мультиспецифічних та біспецифічних молекул) за винаходом також можуть бути застосовані в клітинах-мішенях, що експресують FcγR або BST1, наприклад, для маркування таких клітин. Для такого застосування, зв'язуючий агент може бути зв'язаним з молекулою, яка може бути виявлена. Таким чином, винахід передбачає способи локалізації ex vivo або in vitro клітини, що експресує Fc рецептори, такі як FcγR або BST1. Мітка, яка детектується, може представляти собою, наприклад, радіоізотоп, флуоресцентну сполуку, фермент або ферментний спів-фактор.

В конкретному варіанті втілення, винахід передбачає способи детектування BST1 антигену, що є присутнім в зразку, або вимірювання кількості BST1 антигену, що містить контактуючий зразок та контрольний зразок, з моноклональним антитілом, або його антиген-зв'язуючою частиною, які специфічно зв'язуються з BST1, в умовах, які дозволяють формування комплексу між антитілом або його частиною та BST1. Утворення комплексу потім детектують, де утворення різних комплексів між зразком, порівнюється з контрольним зразком, вказує на присутність BST1 антигену в зразку.

В інших варіантах втілення, винахід передбачає способи лікування BST1 опосередкованого розладу у суб'єкта, наприклад, раку людини та запального захворювання людини, включаючи захворювання за винаходом.

В ще іншому варіанті втілення, імунокон'югати за винаходом можуть бути застосовані до цільових сполук (наприклад, терапевтичних агентів, міток, цитотоксинів, радіотоксинів, імунодепресантів, тощо.), до клітин, які мають BST1 клітинні поверхневі рецептори, шляхом зв'язування таких сполук з антитілом. Наприклад, анти-BST1 антитіло може бути кон'югованим з будь-якою зі сполук-токсинів, описаних в патенті США № 6,281,354 та 6,548,530, публікації патентів США № 2003/0050331, 2003/0064984, 2003/0073852 та 2004/0087497, або опубліковані в WO 03/022806. Таким чином, винахід, крім того, передбачає способи локалізації ex vivo або in vivo клітин, що експресують BST1 (наприклад, з міткою, що детектується, такою як, радіоактивний ізотоп, флуоресцентна сполука, фермент або ферментний спів-фактор). Альтернативно, імунокон'югати можуть бути застосовані, щоб знищувати клітини, які мають BST1 клітинні поверхневі рецептори, шляхом таргетингу цитотоксинів або радіотоксинів з BST1.

Всі посилання, що цитуються в даному описі, включаючи, без обмеження всіх статей, публікації, патенти, заявки на патенти, презентації, тексти, доповіді, рукописи, брошури, книги, інтернет-повідомлення, журнальні статті, періодичні видання, фактичні надруковані продукти, тощо, включені в даний документ в якості посилання на даний опис в повному своєму обсязі. Обговорення посилань в даному документі призначене, щоб просто підсумувати твердження, зроблені їх авторами, та не роблять припущень, що будь-яке посилання становить попередній рівень техніки та заявники зберігають право заперечувати точність та актуальність наведених посилань.

Незважаючи на те, що зазначений вище винахід було описано більш детально шляхом ілюстрацій та прикладів з метою ясності розуміння, будуть очевидними кваліфікованим спеціалістам в даній галузі в світлі ідеї даного винаходу, що може внести певні зміни та модифікації без відходу від суті або об'єму залежних пунктів формули винаходу.

Представлений винахід надалі ілюструється наступними прикладами, які не слід розглядати як подальше обмеження.

Приклад 1: Конструкція бібліотеки фагового дисплею

Рекомбінантний протеїн, складений з амінокислот 29-292 з BST1 (SEQ ID NO: 44), був еукаріотично синтезований за стандартними рекомбінантними способами, та використаний як антиген для імунізації.

Імунізація та виділення мРНК

Бібліотека фагового дисплею для ідентифікації молекул, що пов'язують BST1 була сконструйована як наведено далі. A/J миші (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.) Імунізували

внутрішньо рекомбінантним BST1 антигеном (позаклітинним доменом), зі застосуванням 100 мкг протеїну в повному ад'юванті Фрейнда, на 0 день, та 100 мкг антигену на 28 -й день. Тести на кровотечу у мишей були одержані, використовуючи прокол ретро-орбітального синуса. Якщо, шляхом дослідження титрів, вони були визнані високими за ELISA, використовуючи біотинільований BST1 антиген, іммобілізований за допомогою нейтралізатору (Reacti-Bind™) NeutrAvidin (TM) - закриті пінополістирольні планшети, Pierce, Rockford, IL), мишам збільшували з 100 мкг протеїну на 70, 71 та 72 день, з наступним умертвінням та спленектомією на 77 день. Якщо титри антитіла не були визнані задовільними, мишам збільшували з 100 мкг антигену на день 56 та зразок крові брали на 63 день. Якщо були одержані задовільні титри, тварин повторно імунізували 100 мкг антигену на 98, 99, та 100 день та селезінки збирали на 105 день.

Селезінки збирали в ламінарному боксі та переносили в чашці Петрі, відокремлюючи та відкидаючи жир та сполучну тканину. Селезінки швидко вимочували, використовуючи поршень зі стерильного 5 см<sup>3</sup> шприца в присутності 1,0 мл розчину D (25,0 г гуанідину тіоціанату (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 29,3 мл стерильної води, 1,76 мл 0,75 M розчину цитрату натрію, pH 7,0, 2,64 мл 10 % саркозину (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 0,36 мл 2-меркаптоетанолу (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). Дану суспензію селезінки витягали, використовуючи голку 18 калібру до тих пір, поки всі клітини не лізуться та в'язкий розчин переносили в мікроцентрифужну пробірку. Чашку Петрі промивали 100 мкл розчину D, щоб відновити будь-яку селезінку, що залишилася. Дану суспензію потім протягають через голку 22 калібру додатково 5-10 разів.

Зразок був розділений порівну між двома мікроцентрифужними пробірками і потім додавали по черзі, з перемішуванням шляхом перевертання після кожного додавання: 50 мкл 2 M розчину натрію ацетату pH 4,0, 0,5 мл води насиченої фенолом (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 100 мкл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт 49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). Розчин струшували впродовж 10 с. і інкубували на кризі впродовж 15 хв. Після центрифугування на 14 тисячах оборотів на хвилину впродовж 20 хвилин при 2-8 °C, водну фазу переносили в свіжу пробірку. Додавали рівний об'єм води, насиченої фенолом:хлороформ:ізоаміловий спирт (50:49:1), і пробірку струшували впродовж десяти секунд. Після 15 хвилин інкубування на кризі, зразок центрифугували впродовж 20 хвилин при 2-8 °C, і водну фазу переносили в свіжу пробірку і осаджували рівним об'ємом ізопропанолу при -20 °C впродовж як мінімум 30 хвилин. Після центрифугування на 14 тисячах оборотів на хвилину впродовж 20 хвилин при 4 °C, супернатант відсмоктували, пробірку коротко центрифугували і всі сліди рідини видаляли з РНК пелети.

РНК пелети розчиняли кожну в 300 мкл розчину D, об'єднували та осаджували рівним об'ємом ізопропанолу при -20 °C впродовж як мінімум 30 хвилин. Зразок центрифугували на 14 тисячах оборотів на хвилину впродовж 20 хвилин при 4 °C, супернатант відсмоктували, як і раніше, та зразок промивали 100 мкл охолодженого кригою 70 % етанолу. Зразок знову центрифугували на 14 тисячах оборотів на хвилину впродовж 20 хвилин при 4 °C, прокачували 70 %-ний розчин етанолу та РНК пелету сушили у вакуумі. Пелету ресуспендували в 100 мкл стерильної води, обробленої діетилпірокарбонатом. Концентрації визначали, використовуючи оптичну щільність A260 1,0 для концентрації 40 мкг/мл. РНК зберігали при -80 °C.

Одержання комплементарної ДНК (кДНК)

Загальну РНК очищали від мишачої селезінки, як описано вище, використовували безпосередньо в якості матриці для отримання кДНК. РНК (50 мкг) розбавляли в 100 мкл стерильної води, та додавали 10 мкл 130 нг/мкл оліго-DT12 (синтезованого на ДНК синтезаторі Applied Biosystems Model 392). Зразок нагрівали впродовж 10 хвилин при 70 °C, потім охолоджували на кризі. Сорок мкл 5 \* першого ланцюгового буфера додавали (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), разом з 20 мкл 0,1 M дитіотреїтолу (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), 10 мкл 20 mM дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP's, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), та 10 мкл води на кризі. Потім зразок інкубували при 37 °C впродовж 2 хвилин. Додавали десять мкл зворотної транскриптази (Superscript™) II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) і інкубування продовжували при 37 °C впродовж 1 години. Продукти кДНК були використані безпосередньо для полімеразної ланцюгової реакції (PCR).

Ампліфікація генів антитіла за допомогою PCR

Для ампліфікації були вибрані, по суті, всі гени H та L ланцюгів, використовуючи PCR, праймери, що відповідає, по суті, всім опублікованим послідовностям. Оскільки нуклеотидні послідовності аміно кінців H та L містять значну різноманітність, 33 олігонуклеотиди були синтезовані, щоб слугувати в якості 5' праймерів для H-ланцюгів, та 29 олігонуклеотидів були синтезовані, щоб слугувати в якості 5' праймерів для капа L-ланцюгів, як описано в US 6,555,310. Константна ділянка нуклеотидних послідовностей для кожного ланцюга вимагала тільки один 3' праймер для H-ланцюгів та один 3' праймер для капа L-ланцюгів.

50 мкл реакційної суміші готували для кожної пари праймерів з 50 мкмоль 5' праймера, 50 мкмоль 3' праймера, 0,25 мкл Taq ДНК полімерази (5 од/мкл, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 3 мкл кДНК (отриманої як описано), 5 мкл 2 мМ dNTP's, 5 мкл 10 \*Taq ДНК-полімеразного буфера з MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), та H<sub>2</sub>O до 50 мкл. Ампліфікацію проводили з використанням GeneAmp (R) 9600 термоциклера (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) з наступною термоциклічною програмою: 94 °C впродовж 1 хвилини; 30 циклів при 94 °C впродовж 20 сек, 55 °C впродовж 30 сек, та 72 °C впродовж 30 сек, 72 °C впродовж 6 хвилин; 4 °C.

Продукти dsДНК процесу PCR піддавали асиметричному PCR, використовуючи тільки 3' праймер для генерації, по суті, тільки анти-смыслового ланцюга генів-мішеней. 100 мкл реакційної суміші готували для кожного продукту dsДНК з 200 мкмоль 3' праймера, 2 мкл ds-ДНК продукту, 0,5 мкл Taq ДНК-полімерази, 10 мкл 2 мМ dNTP's, 10 мкл 10\*Taq ДНК-полімеразного буфера з MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), і H<sub>2</sub>O до 100 мкл. Ця ж програма PCR як і та, що описана вище, була використана для ампліфікації одноланцюгової (ss)-ДНК.

Очистка одноланцюгової ДНК за допомогою високоефективної рідинної хроматографії та кінзінг одноланцюгової ДНК

Н-ланцюгові продукти ss-PCR та L-ланцюгові одноланцюгові продукти PCR осаджують етанолом шляхом додавання 2,5 об'ємів етанолу та 0,2 об'ємів 7,5 М ацетату амонію та інкубували при -20 °C протягом, щонайменше, 30 хвилин. ДНК пелетювали шляхом центрифугування в центрифугу Еппендорф на 14 тисячах оборотах на хвилину впродовж 10 хвилин при температурі 2-8 °C. Супернатант обережно відсмоктували, та пробірки коротко центрифугували 2-ий раз. Останні краплі супернатанту видаляли за допомогою піпетки. ДНК сушили у вакуумі впродовж 10 хвилин при середньому нагріванні. Продукти Н-ланцюга були об'єднані в 210 мкл води та продукти L-ланцюга були об'єднані окремо в 210 мкл води. Одноланцюгову ДНК очищали з використанням високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), використовуючи Hewlett Packard 1090 HPLC і Gen-PakTM) FAX аніонообмінну колонку (Millipore Corp., Milford, Mass.). Градієнти, використані для очищення одноланцюгової ДНК, показані в таблиці 1, та температура печі становила 60 °C. Поглинання контролювали при 260 нм. Одноланцюгову ДНК елюювали з ВЕРХ та збирали в 0,5 хвилинних фракціях. Фракції, що містять одноланцюгову ДНК, осаджували етанолом, пелетювали та сушили, як описано вище. Висушені пелети ДНК, збирали в 200 мкл стерильної води.

Таблица 1

ВЕРХ градієнт для очищення ss - ДНК

Час (хв.)	%A	%B	%C	Потік (мл/хв)
0	70	30	0	0,75
2	40	60	0	0,75
17	15	85	0	0,75
18	0	100	0	0,75
23	0	100	0	0,75
24	0	0	100	0,75
28	0	0	100	0,75
29	0	100	0	0,75
34	0	100	0	0,75
35	70	30	0	0,75

Буфер А являє собою 25 мМ Tris, 1 мМ ЕДТО, pH 8,0.

Буфер В являє собою 25 мМ Tris, 1 мМ ЕДТО, 1 М NaCl, pH 8,0.

Буфер С являє собою 40 мМ фосфорну кислоту.

Одноланцюгову ДНК 5'- фосфорилували в процесі підготовки до мутагенезу. Двадцять чотири мкл 10\*кіназного буфера (United States Biochemical, Cleveland, Ohio), 10,4 мкл 10 мМ аденозин-5'-трифосфату (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), та 2 мкл полінуклеотидкінази (30 одиниць/мкл, United States Biochemical, Cleveland, Ohio) додавали до кожного зразку, та пробірки інкубували при 37 °C впродовж 1 години. Реакції зупиняли шляхом інкубування пробірок при +70 °C впродовж 10 хвилин. ДНК очищали за допомогою однієї екстракції сумішшю фенол, урівноважений Tris (pH> 8,0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio):хлороформ:ізоаміловий спирт (50:49:1) та однієї екстракції сумішшю

хлороформ:ізоаміловий спирт (49:1). Після екстракції, ДНК осаджували етанолом та пелетювали, як описано вище. ДНК пелети сушили, потім розчиняли в 50 мкл стерильної води. Концентрацію визначали шляхом вимірювання оптичної щільності аліквоти ДНК при 260 нм, використовуючи 33 мкг/мл для оптичної щільності 1,0. Зразки зберігали при -20 °С.

5 Одержання темплету урацилу, використовуваного в поколінні фагових бібліотек антитіл селезінки

Один мл *E. coli* CJ236 (BioRAD, Hercules, Calif.) впродовж ночі культуру додавали до 50 мл 2\*YT в 250 мл колбу з перегородками та струшували. Культуру вирощували при 37 °С до OD 600=0,6, інокулювали 10 мкл при 1/100 розбавлені з BS45 стокового векторного фагу (описаний в US 6,555,310), та вирощування продовжували впродовж 6 годин. Приблизно 40 мл культури центрифугували при 12 тисячах обертів на хвилину впродовж 15 хвилин при 4 °С. Супернатант (30 мл) переносили в свіжу центрифужну пробірку та інкубували при кімнатній температурі впродовж 15 хв. після додавання 15 мкл 10 мг/мл RNaseA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.). Фаги осаджували додаванням 7,5 мл 20 % поліетиленгліколю 8000 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)/3,5 М ацетату амонію (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) та інкубували на кризі впродовж 30 хвилин. Зразок центрифугували при 12 тисячах обертів на хвилину впродовж 15 хвилин при 2-8 °С. Супернатант обережно видаляли, та пробірку коротко центрифугували, щоб видалити всі сліди супернатанту. Пелети ресуспендували в 400 мкл високосольовим буфером (300 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTU), та переносили в 1,5 мл пробірку.

20 Вихідний розчин фагів екстрагували повторно рівним об'ємом рівноважної суміші фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт (50:49:1) до тих пір, поки не були помітні сліди на білій внутрішній поверхні, та потім, екстрагували рівним об'ємом суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (49:1). ДНК осаджували 2,5 об'ємами етанолу та 1/5 об'єму 7,5 М амонію ацетату, та інкубували впродовж 30 хвилин при -20° С. ДНК центрифугували на 14 тисячах обертів на хвилину впродовж 10 хвилин при 4 °С, пелету промивали один раз холодним 70 % етанолом та сушили у вакуумі. Урациловий темплет ДНК розчиняли в 30 мкл стерильної води, та концентрацію визначали при A260, використовуючи поглинання 1,0 для концентрації 40 мкг/мл. Темплету розбавляли до 250 нг/мкл стерильною водою, відбирали аліквоту та зберігали при -20 °С.

30 Мутагенез темплету урацилу з ss-ДНК та електропорації в *E.coli* для створення фагових бібліотек антитіл

Бібліотеки фагового дисплею антитіл створювали шляхом одночасного введення одноланцюгових генів важкого та легкого ланцюга на темплет урацилу вектора фагового дисплея. Типовий мутагенез проводили на 2 мкг лусочок шляхом змішування наступних в 0,2 мл пробірці PCR - реакції: 8 мкл (250 нг/мкл) темплети урацилу, 8 мкл 10\*гібридизаційного буферу (200 mM Tris pH 7,0, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl), 3,33 мкл кіназованої одноланцюгової вставки важкого ланцюга (100 нг/мкл), 3,1 мкл кіназованої одноланцюгової вставки легкого ланцюга (100 нг/мкл), та стерильну воду до 80 мкл. ДНК гібридизували в GeneAmp (R) 9600 термічному циклері, використовуючи наступний температурний профіль: 20 сек. при 94 °С, 85 °С впродовж 60 сек, 85 °С до 55 °С рампи впродовж 30 хвилин, витримуючи при 55 °С впродовж 15 хв. ДНК переносили на кригу після того, як програма закінчилася. Розширення/лігування здійснювали шляхом додавання 8 мкл 10 \* буфера синтезу (5 mM кожного dNTP, 10 mM АТФ, 100 mM Tris pH 7,4, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT), 8 мкл T4 ДНК лігази (1 од./Мкл, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 8 мкл розбавленої T7 ДНК полімерази (1 од./мкл, New England BioLabs, Beverly, Mass.) та інкубування при 37 °С впродовж 30 хвилин. Реакцію зупиняли 300 мкл буфера, який зупиняє мутагенез (10 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTU). Мутагенезний ДНК екстрагували один раз сумішшю врівноважений фенол, (pH> 8):хлороформ:ізоаміловий спирт (50:49:1), один раз сумішшю хлороформ:ізоаміловий спирт (49:1), та ДНК осаджували етанолом при -20 °С, щонайменше, впродовж 30 хвилин. ДНК пелетювали, та супернатант обережно видаляли, як описано вище. Зразок коротко центрифугували знову та всі сліди етанолу видаляли за допомогою автоматичної піпетки Pipetman. Пелету сушили у вакуумі. ДНК ресуспендували в 4 мкл стерильної води.

Один мкл мутагенезованої ДНК (500 нг) переносили в 40 мкл електрокомпетентної *E. Coli* DH12S (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), використовуючи електропорацію. Трансформовані клітини змішували з приблизно 1,0 мл XL-1 клітин впродовж ночі, які розбавляли 2 \* YT бульйоном до 60 % від початкового об'єму. Дану суміш потім переносили в 15 - мл пробірку зі стерильною культурою та 9 мл верхнього агару додавали для посіву на 150-мм LB чашки з агаром. Планшети інкубували впродовж 4 год. при 37 °С та потім переносили до 20 °С впродовж ночі. Перший цикл фагу антитіла проводили, елюючи фаг з даних планшетів в 10 мл 2 \* YT, перемішуючи залишки, та забираючи супернатант. Дані зразки являють собою бібліотеки

фагового дисплея антитіла, які використовують для вибору антитіла проти BST1. Ефективність електропорації вимірювали шляхом посіву 10 мкл  $10^{-4}$  розбавлення суспендованих клітин на LB чашках з агаром, з подальшим інкубуванням планшетів впродовж ночі при 37 °C Ефективність розраховували шляхом множення кількості бляшок на  $10^{-4}$  розбавлення планшета на 106.

Ефективність бібліотеки електропорації є, як правило, більшою, ніж  $1 \times 10^7$  фагів в даних умовах.

Трансформація E.coli, шляхом електропорації

Електрокомпетентні клітини E.coli відтавали на кризі. ДНК змішували з 40 л даних клітин, обережно піпеткою клітини зтягували та випускали 2-3 рази, дотримуючись обережності, щоб не ввести повітряний пухирець. Клітини переносили в кювету Gene Pulser (0,2 см пропуск, BioRAD, Hercules, Calif.), яку охолоджували на кризі, знову обережно намагаючись не ввести повітряний пухирець при перенесенні. Кювету поміщали в E. coli Pulser (BioRad, Hercules, CA) та електропорували з напругою, встановленою на 1,88 кВ відповідно до рекомендації виробника. Трансформований зразок відразу ж ресуспендували в 1 мл 2 \* YT бульйону або 1 мл суміші 400 мкл 2\* YT/600 мкл впродовж ночі XL-1 клітин, та оброблених, як передбачено процедурою.

Культивування M13 фагу або клітин, трансформованих реакцією мутагенезу вектора фагового дисплея антитіла

Зразки фага були додані до 200 мкл нічної культури E. coli XL1-Blue, коли культивування на 100 мм чашках з агаром LB, або 600 мкл клітин впродовж ночі, коли культивування на 150 мм чашках в стерильних 15 мл пробірках з культурою. Після додавання LB верхнього агару (3 мл на 100 мм чашки або 9 мл на 150 мм чашках), верхній агар зберігався при 55 °C (дивись, Appendix A1, Sambrook et al., Supra.), суміш рівномірно розподіляли по LB агару чашки, яку попередньо нагрівали (37° C-55° C), щоб видалити будь-яку надлишкову вологу на поверхні агару. Чашки охолоджували при кімнатній температурі до тих пір, поки верхній агар не затвердне. Чашки перевертали і інкубували при 37° C, як зазначено.

Одержання біотинільованої АДФ-рібосилциклази 2 та біотинільованого антитіла

Концентрований рекомбінантний BST1 антиген (повнодовжинний позаклітинний домен) піддавали сильному діалізу в BBS (20 mM бората, 150 mM NaCl, 0,1 % Na<sub>3</sub>N, pH 8,0). Після діалізу 1 мг BST1 (1 мг/мл в BBS) піддавали взаємодії з 15-кратним мольним надлишком біотин-XX-NHS складним ефіром (Molecular Probes, Eugene, Oreg., вихідний розчин 40 mM в ДМСО). Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі впродовж 90 хвилин та потім гасили таурином (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) у кінцевій концентрації 20 mM. Реакційну суміш біотинільовання потім піддавали діалізу проти BBS при 2-8° C. Після діалізу біотинільований BST1 розбавляли в пеннінг буфері (40 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 мг/мл BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,5), відбирали аліквоти та зберігали при -80 °C до використання.

Антитіла піддавали взаємодії з 3-(N-малеїмідилпропіоніл)біоцитином (Molecular Probes, Eugene, Oreg.), використовуючи вільний цистеїн, розташований в карбоксикінці важкого ланцюга. Антитіла відновлювали додаванням DTT до кінцевої концентрації 1 mM впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі. Відновлене антитіло пропускали через Sephadex G50 колонку знесолення, врівноважену 50 mM фосфату калію, 10 mM борної кислоти, 150 mM NaCl, pH 7,0. 3-(N-малеїмідилпропіоніл)біоцитин додавали до кінцевої концентрації 1 mM, та реакції давали продовжитися при кімнатній температурі впродовж 60 хв. Потім зразки піддавали діалізу проти BBS та зберігали при 2-8 °C.

Одержання магнітного латексу авідину

Магнітний латекс (Estapor, 10 % твердих речовин, Bangs Laboratories, Fishers, Ind.) ретельно ресуспендували та відбирали 2 мл аліквоти в 15 мл конічну пробірку. Магнітний латекс суспендували в 12 мл дистильованої води та відокремлювали від розчину впродовж 10 хвилин за допомогою магніту PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.). Потім, при збереженні поділ магнітного латексу з магнітом, рідину обережно видаляли, використовуючи 10 мл стерильну піпетку. Даний процес промивання повторювали ще тричі. Після останньої промивки, латекс ресуспендували в 2 мл дистильованої води. В окремій 50 мл конічній пробірці, 10 мг авідина-HS (NeutrAvidin, Pierce, Rockford, Ill.) розчиняли в 18 мл 40 mM Tris, 0,15 M хлориду натрію, pH 7,5 (TBS). Під час струшування, 2 мл промитого магнітного латексу додавали в розбавлений авідин-HS, та суміш змішували впродовж додаткових 30 секунд. Дану суміш інкубували при 45 °C впродовж 2 годин, струшуючи кожні 30 хв. Авідин магнітний латекс відокремлювали від розчину, використовуючи магніт, та промивали три рази 20 мл BBS, як описано вище. Після останньої промивки, латекс ресуспендували в 10 мл BBS та зберігали при 4 °C.

Безпосередньо перед застосуванням, авідиновий магнітний латекс врівноважували в пенінговому буфері (40 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 мг/мл BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,5). Авідиновий магнітний латекс, необхідний для експерименту пенінгу (200 мкл/зразок), додавали в стерильну 15 мл центрифужну пробірку та доводили до 10 мл пенінговим буфером. Пробірку

поміщали на магніт впродовж 10 хвилин, щоб відокремити латекс. Розчин обережно видаляли за допомогою 10 мл стерильної піпетки, як описано вище. Магнітний латекс ресуспендували в 10 мл пенінгового буфера, щоб почати друге промивання. Магнітний латекс промивали в цілому 3 рази пенінговим буфером. Після останньої промивки, латекс ресуспендували в пенінговому

5 буфері до початкового об'єму.

Приклад 2: Вибір рекомбінантних поліклональних антитіл до BST1 антигену

Реагенти зв'язування, які специфічно зв'язуються з BST1, вибирали з фагових бібліотек, створених з гіперімунізованих мишей, як описано в прикладі 1.

Пенінг

10 Фаги антитіла першого циклу були одержані, як описано в прикладі 1, використовуючи BS45 темплет урацилу. Електропорації мутагенезу ДНК проводили з одержанням зразків фагів, одержаних від різних імунізованих мишей. Щоб створити більше різноманіття в рекомбінантній поліклональній бібліотеці, кожен зразок фагу розділяли способом пенінгу.

15 Перед першим циклом функціонального пенінгу з біотинільованим BST1 антигеном, фагові бібліотеки антитіла вибирали з фагового відображення, як важких, так і легких ланцюгів на їх поверхні за допомогою пенінгу з 7F11-магнітним латексом (як описано в прикладах 21 та 22 з US 6,555,310). Функціональний пенінг даних покращених бібліотек проводили, в принципі, як описано в прикладі 16 з US 6,555,310. Зокрема, 10 мкл  $1 \times 10^{-6}$  М біотинільованого BST1 антигену добавляли в зразки фагів (приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М кінцевої концентрації BST1), та суміші

20 давали прийти в рівновагу впродовж ночі при 2-8 °C.

Після досягнення рівноваги, зразки пенінгували з авідиновим магнітним латексом, щоб захопити фаг антитіла, зв'язаний з BST1. Урівноважений авідиновий магнітний латекс (приклад 1), 200 мкл латексу на зразок, інкубували з фагом впродовж 10 хвилин при кімнатній температурі. Через 10 хвилин приблизно 9 мл пенінгового буфера додавали до кожного зразку

25 фага, та магнітний латекс виділяють з розчину за допомогою магніту. Після десяти хвилин розділення, незв'язаний фаг обережно видаляли, використовуючи 10 мл стерильну піпетку. Магнітний латекс потім ресуспендували в 10 мл пенінгового буфера, щоб почати другу промивку. Латекс промивали загалом три рази, як описано вище. Для кожної промивки, пробірки були в контакт з магнітом впродовж 10 хвилин, щоб виділити незв'язаний фаг з магнітного

30 латексу. Після третьої промивки, магнітний латекс ресуспендували в 1 мл пенінгового буфера та переносили в 1,5 мл пробірки. Весь об'єм магнітного латексу для кожного зразку, потім збирали та ресуспендували в 200 мкл 2\*YT та висівали в 150 мм LB-чашки, як описано в прикладі 1, щоб ампліфікувати зв'язаний фаг. Чашки інкубували при 37 °C впродовж 4 годин, потім впродовж ночі при 20 °C.

35 150 мм чашки, які використовують, щоб ампліфікувати зв'язаний фаг, застосовували для створення чергового циклу фага антитіла. Після інкубування впродовж ночі, фаг антитіла другого циклу елюювали з 150 мм чашок за допомогою 10 мл піпетки 2\*YT середовища на газон, та обережно струшуючи планшет при кімнатній температурі впродовж 20 хвилин. Зразки фагів потім переносили в 15 мл одноразові стерильні центрифужні пробірки з пробкою

40 закупорюючого ковпачка, та уламки з LB чашки осаджували шляхом центрифугування пробірок впродовж 15 хвилин при 3500 оборотах на хвилину. Супернатант, який містить фаг антитіло другого циклу, потім переносили в нову пробірку.

Другий цикл функціонального пенінгу встановлювали шляхом розбавлення 100 мкл кожного вихідного фагу 900 мкл пенінгового буфера в 15 мл одноразових стерильних центрифужних

45 пробірках. Біотинільований BST1 антиген потім додавали в кожен зразок, як описано для першого циклу пенінгу, та зразки фагів інкубували впродовж 1 години при кімнатній температурі. Зразки фагів потім пенінгували з авідиновим магнітним латексом, як описано вище. Прогрес пенінгу контролювали в даній точці шляхом культивування аліквот кожного зразку латексу на 100 мм чашках з агаром LB, щоб визначити відсоток капа позитивів. Більшість латексу від

50 другого пенінгу (99 %) висівали на 150 мм чашках з агаром LB, щоб ампліфікувати фаг, зв'язаний з латексом. 100 мм чашки з агаром LB інкубували при 37 °C впродовж 6-7 годин, після чого чашки переносили до кімнатної температури, та нітроцелюлозні фільтри (розмір пор 0,45 мм, BA85 Protran, Schleicher та Schuell, Keene, NH) переносили на бляшки.

Чашки з нітроцелюлозними фільтрами інкубували впродовж ночі при кімнатній температурі

55 та потім розробляли з козячим анти-мишачим капа лужним фосфатазним кон'югатом, щоб визначити відсоток капа позитиву, як описано нижче. Зразки фагів з низьким відсотком (<70 %) капа позитивів в популяції піддавали дії циклу пенінгу з 7F11-магнітним латексом перед виконанням третього функціонального циклу пенінгу впродовж ночі при 2-8 °C, використовуючи біотинільований BST1 антиген при приблизно  $2 \times 10^{-9}$  М. Даний цикл пенінгу також контролювали

60 для капа позитивів. Конкретні зразки фагів, які мали відсоток капа позитиву більше, ніж 80 %

об'єднували та піддавали дії кінцевого циклу пенінгу впродовж ночі при 2-8 °C в концентрації  $5 \cdot 10^{-9}$  М. Гени BST1 антитіла, що містяться в елюйованому фазі з даного четвертого циклу функціонального пенінгу субклонували в вектор, що експресує, pBRncoH3.

Процес субклонування, як правило, здійснювали, як описано в прикладі 18 з US 6,555,310.

- 5 Після субклонування, вектор, що експресує, електропорювали в DH10B клітинах та суміші вирощували впродовж ночі в 2\*YT, що містить 1 % гліцерину та 10 мкг/мл тетрацикліну. Після другого циклу росту та відбору в тетрацикліні, аліквоти клітин заморожували при -80 °C, як джерело для продукування BST1 поліклонального антитіла. Моноклональні антитіла вибирали з даних поліклональних сумішей шляхом культивування зразку суміші на чашках з агаром LB, які
- 10 містять 10 мкг/мл тетрацикліну, та скринінгу антитіл, які розпізнаються BST1.

Експресія та очистка рекомбінантних антитіл від АДФ-рибозилциклази 2

- Інокулят в колбі, що струшували, генерували впродовж ночі при -70 °C з банку клітин в Innova 4330 шейкері інкубатору (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.) при 37 °C, 300 обертів на хвилину. Посівний матеріал був використаний, щоб засіяти 20 л ферментер Applikon, Foster
- 15 City, Calif.), який містить певне культуральне середовище [Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277] з додаванням 3 г/л L-лейцину, 3 г/л L-ізолейцину, 12 г/л казеїнового гідролізату (Difco, Detroit, Mich.), 12,5 г/л гліцерину та 10 мкг/мл тетрацикліну. Температуру, pH та розчинений кисень в ферментері контролювали при 26 °C, 6,0-6,8 та 25 % насиченості, відповідно. Піну контролювали додаванням поліпропіленгліколю (Dow, Midland, Mich.). Гліцерин
- 20 додавали в ферментер в режимі підпитки. Fab експресію індукували додаванням L(+)-арабінози (Sigma, St. Louis, Mo.) до 2 г/л впродовж пізньої логарифмічної фази росту. Густина клітин вимірювали за оптичною щільністю при 600 нм в УФ-1201 спектрофотометрі (Shimadzu, Columbia, Md.). Після завершення виконання та регулювання pH до 6,0, культуру двічі пропускали через мікрофлюїдизатор M-210B-EH Microfluidizer (Microfluidics, Newton, Mass.) в 17
- 25 000 фунтів на кв. дюйм. Гомогенізація високого тиску клітин вивільняла Fab в супернатант культури.

- Першу стадію з очистки проводили за допомогою афінної хроматографії з застосуванням іммобілізованих металів в шарі, який розширюється (EB-IMAC). Streamline™ хелатуючі смоли (Pharmacia, Piscataway, N.J.) загрузали з 0,1 М NiCl<sub>2</sub> та потім розширювали та врівноважували в
- 30 50 мМ ацетаті, 200 мМ NaCl, 10 мМ імідазолі, 0,01 % NaN<sub>3</sub>, pH 6,0 буфері, що протікає в напрямку догори. Вихідний розчин був використаний, щоб внести культуру гомогенату в 10 мМ імідазолу, після чого її розбавляли в два рази або більше урівноважуючим буфером для зниження вмісту вологих твердих речовин до менше, ніж 5 % за масою. Потім суміш наносили на колонку Streamline, що протікає в напрямку догори з поверхневою швидкістю 300 см/годину.
- 35 Уламки клітин проходили безперешкодно, але Fab був захоплений за рахунок взаємодії з високою афінністю нікелю та тега гексагістидину на Fab важкого ланцюга. Після промивки розширений шар був перетворений в ущільнений шар та Fab елюювали буфером 20 мМ борату, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазолу, 0,01 % NaN<sub>3</sub>, pH 8,0, що протікає в напрямку вниз.

- Друга стадія з очистки використовувала іонообмінну хроматографію (IEC). Смола Q Sepharose FastFlow (Pharmacia, Piscataway, N.J.) врівноважували 20 мМ борату, 37,5 мМ NaCl, 0,01 % NaN<sub>3</sub>, pH 8,0. Fab пул елюювання зі стадії EB-IMAC розбавляли в чотири рази 20 мМ борату, 0,01 % NaN<sub>3</sub>, pH 8,0 та наносили на колонку IEC. Після промивки Fab елюювали 37,5-200 мМ NaCl з градієнтом солі. Елюйовані фракції оцінювали на чистоту, використовуючи систему Xcell II™ SDS-PAGE (Novex, San Diego, Calif.) перед об'єднанням. В кінці, Fab пул
- 45 концентрували та піддавали діалізації в 20 мМ борату, 150 мМ NaCl, 0,01 % NaN<sub>3</sub>, pH 8,0 буфері для зберігання. Це було досягнуто в системі Sartoclon Slice™ обладнаній 10,000 MWCO касетою (Sartorius, Bohemia, N.Y.). Кінцеві виходи очистки становили, як правило, 50 %. Концентрацію очищеного Fab вимірювали за УФ-поглинанням при 280 нм, припускаючи оптичну щільність 1,6 для розчину 1 мг/мл.

- 50 Приклад 3: Специфічність моноклональних антитіл к BST1, визначена за аналізом проточної цитометрії

- Специфічність антитіл проти BST1, вибраної в прикладі 2, досліджували шляхом проточної цитометрії. Щоб дослідити здатність антитіла щодо зв'язування з клітинною поверхнею BST1 протеїну, антитіла інкубували з клітинами, що експресують BST1, A549 та H226, від
- 55 аденокарциноми легень людини та плоскоклітинної карциноми легень людини, відповідно. Клітини промивали в FACS буфері (DPBS, 2 % FBS), центрифугували та ресуспендували в 100 мкл розбавленого первинного BST1 антитіла (також розбавляли в FACS буфері). комплекс антитіло-A549 інкубували на кризі впродовж 60 хвилин та потім двічі промивали FACS буфером, як описано вище. Пелету клітина-антитіло ресуспендували в 100 мкл розбавленого вторинного
- 60 антитіла (також розбавленого в FACS буфері) та інкубували на кризі впродовж 60 хвилин.

Пелету промивали, як і раніше, та ресуспендували в 200 мкл FACS буферу. Зразки загрузали до проточного цитрометру BD FACScanto II та дані аналізували за допомогою програмного забезпечення BD FACSDiva.

#### РЕЗУЛЬТАТИ

Результати аналізу проточної цитометрії продемонстрували, що 4 моноклональні антитіла, позначені BST1\_A1, BST1\_A2 та BST\_A3, ефективно зв'язувались з клітинним поверхневим людським BST1. Фігура 3a показує специфічність зв'язування як BST1\_A1, так і BST1\_A2 з BST1 на A549 та H226 клітинах, відповідно. Фігура 3b показує специфічність зв'язування BST1\_A3 з BST1 на A549 та H226 клітинах. Результати показують сильне зв'язування даних антитіл з BST1 на A549 та H226.

#### Приклад 4: Структурна характеристика моноклональних антитіл з BST1

Послідовності кДНК, що кодують варіабельну ділянку важкого та легкого ланцюгів BST1\_A2 та BST1\_A1 моноклональних антитіл, були одержані, використовуючи стандартні ПЦР способи та були впорядковані, використовуючи стандартні способи ДНК секвенування.

Послідовності антитіла можуть бути піддані мутагенезу, щоб повернутися до залишків зародкової лінії в одному або декількох залишках.

Нуклеотидна та амінокислотна послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга BST1\_A2 представляють собою SEQ ID NO: 10 та 2, відповідно.

Нуклеотидна та амінокислотна послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга BST1\_A2 представляють собою SEQ ID NO: 14 та 6, відповідно.

Порівняння послідовності BST1\_A2 важкого ланцюга імуноглобуліну з відомими послідовностями важкого ланцюга імуноглобуліну мишачої зародкової лінії продемонструвало, що BST1\_A2 важкий ланцюг використовує сегмент V<sub>H</sub> від мишачої зародкової лінії VH 1-39. Подальший аналіз BST1\_A2 V<sub>H</sub> послідовності із застосуванням системи Кабат визначення CDR ділянки призвів до розмежування важкого ланцюга на CDR1, CDR2 та CDR3 ділянки, як показано в SEQ ID NO: 38, 42 та 46, відповідно. Вирівнювання BST1\_A2 CDR1 та CDR2 V<sub>H</sub> послідовностей до послідовностей зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-39 показані на фігурах 1a та 1b.

Порівняння послідовності BST1\_A2 легкого ланцюга імуноглобуліну з відомими послідовностями легкого ланцюга імуноглобуліну мишачої зародкової лінії продемонструвало, що BST1\_A2 легкий ланцюг використовує сегмент V<sub>K</sub> від мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-55. Подальший аналіз BST1\_A2 V<sub>K</sub> послідовності із застосуванням системи Кабат визначення CDR ділянки призвів до розмежування легкого ланцюга на CDR1, CDR2 та CDR3 ділянки, як показано в SEQ ID NO: 49, 52 та 55, відповідно. Вирівнювання BST1\_A2 CDR1, CDR2 та CDR3 V<sub>K</sub> послідовностей до послідовностей зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-55 показані на фігурах 2a, 2b та 2c.

Нуклеотидна та амінокислотна послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга BST1\_A1 представляють собою SEQ ID NO: 9 та 1, відповідно.

Нуклеотидна та амінокислотна послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга BST1\_A1 представляють собою SEQ ID NO: 13 та 5, відповідно.

Порівняння послідовності BST1\_A1 важкого ланцюга імуноглобуліну з відомими послідовностями важкого ланцюга імуноглобуліну мишачої зародкової лінії продемонструвало, що BST1\_A1 важкий ланцюг використовує сегмент V<sub>H</sub> від мишачої зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-80. Подальший аналіз BST1\_A1 V<sub>H</sub> послідовності з застосуванням системи Кабат визначення CDR ділянки призвів до розмежування важкого ланцюга на CDR1, CDR2 та CDR3 ділянки, як показано в SEQ ID NO: 37, 41 та 45, відповідно. Вирівнювання BST1\_A1 CDR1 та CDR2 V<sub>H</sub> послідовностей до послідовностей зародкової лінії V<sub>H</sub> 1-80 показані на фігурах 1a та 1b.

Порівняння послідовності BST1\_A1 легкого ланцюга імуноглобуліну з відомими послідовностями легкого ланцюга імуноглобуліну мишачої зародкової лінії продемонструвало, що BST1\_A1 легкий ланцюг використовує сегмент V<sub>K</sub> від мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-74. Подальший аналіз BST1\_A1 V<sub>K</sub> послідовності із застосуванням системи Кабат визначення CDR ділянки призвів до розмежування легкого ланцюга на CDR1, CDR2 та CDR3 ділянки, як показано в SEQ ID NOs: 48, 51 та 54, відповідно. Вирівнювання BST1\_A1 CDR1, CDR2 та CDR3 V<sub>K</sub> послідовностей до послідовностей зародкової лінії V<sub>K</sub> 4-74 показані на фігурах 2a, 2b та 2c.

Нуклеотидна та амінокислотна послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга BST1\_A3 представляють собою SEQ ID NO: 54 та 52, відповідно.

Нуклеотидна та амінокислотна послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга BST1\_A3 представляють собою SEQ ID NO: 55 та 53, відповідно.

Порівняння послідовності BST1\_A3 важкого ланцюга імуноглобуліну з відомими послідовностями важкого ланцюга імуноглобуліну мишачої зародкової лінії продемонструвало, що BST1\_A3 важкий ланцюг використовує сегмент V<sub>H</sub> від мишачої зародкової лінії V<sub>H</sub> 69-1. Подальший аналіз BST1\_A3 V<sub>H</sub> послідовності з застосуванням системи Кабат визначення CDR

ділянки призвів до розмежування важкого ланцюга на CDR1, CDR2 та CDR3 ділянки, як показано в SEQ ID NO: 56, 57 та 58, відповідно. Вирівнювання BST1\_A3 CDR1 та CDR2 V<sub>H</sub> послідовностей до послідовностей мишачої V<sub>H</sub> зародкової лінії 69-1 показані на фігурах 1a та 1b.

Порівняння послідовності BST1\_A3 легкого ланцюга імуноглобуліну з відомими послідовностями легкого ланцюга імуноглобуліну мишачої зародкової лінії продемонструвало, що BST1\_A3 легкий ланцюг використовує сегмент V<sub>K</sub> від мишачої зародкової лінії V<sub>K</sub> 44-1. Подальший аналіз BST1\_A3 V<sub>K</sub> послідовності з застосуванням системи Кабат визначення CDR ділянки призвів до розмежування легкого ланцюга CDR1, CDR2 та CDR3 ділянок, як показано в SEQ ID NO: 59, 60 та 61, відповідно. Вирівнювання BST1\_A3 CDR1, CDR2 та CDR3 V<sub>K</sub> послідовностей до послідовностей мишачої V<sub>K</sub> зародкової лінії 44-1 показані на фігурах 2a, 2b та 2c.

Приклад 5: Інтерналізація та MabZAP з BST1\_A1 та BST1\_A2 в A549 та H226 клітинах.

Інтерналізація з BST1\_A1 та BST1\_A2 за H226 та A549 була досліджена, використовуючи MabZAP аналіз. MabZAP аналіз показав інтерналізацію анти-BST1 моноклональних антитіл через зв'язування анти-людського IgG вторинного антитіла, кон'югованого з токсином сапорину. (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100). По-перше, BST1 Fab зв'язували з поверхнею клітин. Потім MabZAP антитіла зв'язували з первинними антитілами. Далі, MabZAP комплекс інтерналізаціоналізували клітинами. Вхід сапорину в клітини в результаті призводив до інгібування синтезу протеїну та можливої смерті клітини.

MabZAP аналіз проводили наступним чином. Кожну з клітин висівали з щільністю  $5 \times 10^3$  клітин на лунку. Анти-BST1 моноклональні антитіла або контроль ізотипу людського IgG серійно розбавляли, потім додавали до клітин та інкубували впродовж 15 хвилин при 25 °C. Потім додавали MabZAP та інкубували впродовж 72 годин при 37 °C. Життєздатність клітин в чашках виявляли, використовуючи набір для люмінесцентного аналізу на життєздатність клітин CellTiter-Glo® (Promega, G7571) та планшети зчитували та аналізували, використовуючи Promega Glomax. Загибель клітин була пропорційною до концентрації анти-BST1 моноклональних антитіл. Фігури 4a та 4b показують, що анти-BST1 моноклональні антитіла, BST1\_A1 та BST1\_A2 були ефективно інтерналізовані H226 та A549, в порівнянні з анти-людським IgG ізотипом контрольного антитіла.

Приклад 6: Гуманізація BST1\_A2

Для розробки гуманізованої послідовності BST1\_A2 V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub>, структурні амінокислоти важливі для формування структури CDR були ідентифіковані, використовуючи тривимірну модель. Людські V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> послідовності з високою гомологією з BST1\_A2 також були вибрані з бази даних GenBank. CDR послідовності разом з ідентифікованими структурними амінокислотними залишками були прищеплені від BST1\_A2 в людські структурні послідовності (Фігури 5-7).

Приклад 7 Антитіло-залежна клітинна цитотоксичність опосередкована анти-BST1 mAbs

По-перше, 25мкл батьківських та нефукозилізованих анти-BST1 антитіл (BST1\_A2 та BST1\_A2\_NF) в концентраціях в діапазоні від 10 нм/л до 0,1 нм/л додавали, щоб відокремити лунки v-донного 96-лункового планшету разом з 50 мкл BST1-експресуючими A549 та U937 клітинами. 25 мкл ефекторних клітин потім додавали в лунки, щоб одержати кінцеве співвідношення ефектор:мішень (E:T) 10:1 та 25:1. Планшет потім обережно центрифугували при 1000 оборотах в хвилину впродовж 2 хвилин, після чого його інкубували впродовж 4 годин при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-інкубатор. Через 3 години після інкубування 10 мкл лізисного розчину додавали в кожен з лунок, яка містить клітини, що експресують BST1 самостійно, щоб виміряти максимальне вивільнення LDH, та один набір лунок, що містять одне середовище для контролювання об'ємної поправки.

Після інкубування, клітини центрифугували на 1000 оборотах в хвилину впродовж 2 хвилин, після чого 50 мкл супернатанту переносили в плоскодонний 96-лунковий планшет. Застосування Cytotox 96® нерадіоактивного аналізу на цитотоксичність, доступного від Promega (Cat #: G1780), компоненти набору відновлювали у відповідності до специфікацій виробника, та 50 мкл суміші субстрату потім додавали в кожен лунку. Планшет потім накривали та залишали інкубувати впродовж 30 хвилин при 25 °C, в захищеному від світла місці. Після цього 50 мкл стоп-розчину додавали в кожен лунку, та записували оптичну щільність на 490 нм, використовуючи планшетний рідер varioskan.

Застосовували відомі антитіла для стимулювання клітин-кілерів через ADCC в якості позитивного контролю та людський IgG1 контрольний ізотип в якості негативного контролю, результати показують, що BST1\_A2 та BST1\_A2\_NF були здатними викликати ADCC на A549 та U937 клітинах, що експресують BST1. На A549 клітинах, що експресують BST1, BST1\_A2\_NF

показали приблизно 45 % лізису в 10 нмоль/л (Фігура 8а). На U937 клітинах, що експресують BST1, BST1\_A2 показали приблизно 20 % лізису в 1 нмоль/л та BST1\_A2\_NF показали приблизно 45 % лізису в 1 нмоль/л (Фігура 8б).

Приклад 8: Специфічність моноклональних антитіл к BST1, визначена, використовуючи аналіз проточної цитометрії у пацієнтів з AML

Здатність BST\_A2 зв'язуватися з лімфобластами пацієнтів з AML досліджували, використовуючи аналіз проточної цитометрії. Кров брали у 20 пацієнтів з AML. Використовуючи спосіб, як описано в прикладі 3, було показано, що BST\_A2 зв'язуються з AML бластами приблизно у 80 % пацієнтів з AML.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID No	Запис	Послідовність
1	aa VH_A1	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVKLQQSGAELVRPGSSSVKISCKASG YAFSNSWINWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDYDTNYNGKFKGKATLT ADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGGSIYYGNLGGFDVWGAG TTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTV TWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVA HPASSTKVDKIVPRDCHHHHHHHH
2	aa VH_A2	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKAS GYSFIEYTINWVKQSHGKSLEWIGNIDPYGTTYNQMF TGKATLT DQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARGSAWFPYWGQGLTVSA AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSSG LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKIVPRDCHHHHHHHH
3	aa VK_A1	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTQSPAIMSTSLGERVTMTCT ASSRVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSG TSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPYTFGGGKLEIKRADAAPT SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNES
4	aa VK_A2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVVPRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEDTATYYCQQWSNYPLTFGAGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN WTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNES
5	nt VH_A1	acgcttgtacatggagaaaataaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctct tattaccctgtggcaaaagcccagggtgaagctcagcagctccgggctgagctggtaggc ctgggtcctcagtgaagatttctgcaaggcttctggctacgcattcagtaactcctggataaact gggtgaagcagaggcctggacagggtcttgagtgattggacagattatcctggagattatgat actaactacaattgaaaattcaagggtaaagccacactgactgcagactactcctccagcaca gcctacatgcagctcaacagcctaactcaggactctgcggtctattctgtgcaaggggggg gatcgatctactatggaacctcggttctcgatgtctggggcgaggaccacgggtcaccgtct cctcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctgtgcccactaa ctccatggtagacctgggtgctgctgcaagggtatttccctgagccagtgacagtgacctgga actctggatccctgtccagcgggtgtgcacacctcccagctgtcctgcagctgacctctacactct gagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgtgtgc ccacccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgccagggtgattgtcatcatcacc atcaccatcactaattgacagcttatcatcgatangct
6	nt VH_A2	aaaaccctggcgttaccacgcttgtacatggagaaaataaagtgaacaaagcactattgc actggcactctaccgctcttattaccctgtggcaaaagcccagggtatctacagcagctgg acctgagctggtagggctggcgctcagtgagatgtcctgcaaggctctgtggtactcattcatt gagtacaccataaactgggtgaaacagagccatggaagagccttgagtgattggaatatt gatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacgggcaaggccacattgactgtagac caatctccaacactgcctacatgcagctcaagagcctgacatctgaggactctgcagctctatttc tgtgcaagaggctccgctggttcttactggggccaggggactctagtcactgtctctgcagcc aaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctgtgcccactaaactcattggt gacctgtggatgcctgggtcaagggtatttccctgagccagtgacagtgacctggaactctgga

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID No	Запис	Послідовність
		tcctgtccagcgggtgtgcacacctcccagctgtcctgcagtctgacctctacactctgagcagc tcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgttgcccacccg gccagcagcaccgaaggtggacaagaaaattgtgccagggattgtcatcatcaccatcaccat cactaattgacagcttatcatcgat
7	nt VK_A1	gttttttgatggagtgaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactc gctgcccaccagccatggccgaaatggttctcaccagctcctcagcaatcatgtctacatctct aggggaacgggtcaccatgacctgcactgccagctcacgtgtaagttccagttactgactggg accagcagaagccaggatctccccaaactctggattatagtacatccaacctggcttctgg agtcccagctcgttcagtggcagtgggtctgggacctcttactctctacaatcagcagcatgg aggctgaagatgctgccattattactgccaccagtatcatcgttccccgtacacgttcggagg gggaccaagctggaaataaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatcc agtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgttctgaacaacttctaccccaaga catcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgctctgaacagttggac tgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacgttgaccaaggac gagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattg tcaagagcttaacaggaatgagtccttaagtattagctaattctagaacg
8	nt VK_A2	actctactgtttctccatacccggttttttgatggagtgaacgatgaaatacctattgcctacgg cagccgctggattgttattactcgtgcccaccagccatggccgacatcggtatgtctcagctcc agcaatcatgtctgcatctccaggggagaagggtcaccatgacctgcagtggcagctcaagtg aacttacatgtactggtaccagcagaagccaggatctccccagactcctgattatgacacat ccaacctggcttctggagtccctgttcgcttcagtggcagtgggtctgggacctcttactctcac aatcagccgaatggaggctgaagatactgccattattactgccagcagtggagtaattacca ctcaggttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatcca tctcccaccatccagtgcaggttaacatctggagggtgcctcagtcgtgtgttctgaacaactt ctaccccaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgctct gaacagttgactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacg tgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatc aacttaccattgtcaagagcttaacaggaatgagtccttaagtattagctaattctagaacgc gtcactggcactggccgctggttta
9	aa VH_CDR1_A1	GYAFNSWINW
10	aa VH_CDR1_A2	GYSFIEYTINW
11	aa VH_CDR2_A1	GQIYPGDYDTNYNGKFK
12	aa VH_CDR2_A2	GNIDPYYGTTYNQMF
13	aa VH_CDR3_A1	ARGGSIYYGNLGFDFV
14	aa VH_CDR3_A2	ARGSAWFPY
15	aa VK_CDR1_A1	TASSRVSSSYLH
16	aa VK_CDR1_A2	SASSSVTYMY
17	aa VK_CDR2_A1	STSNLAS
18	aa VK_CDR2_A2	DTSNLAS
19	aa VK_CDR3_A1	HQYHRSPYT
20	aa VK_CDR3_A2	QQWSNYPLT
21	nt VH_CDR1_A1	ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
22	nt VH_CDR1_A2	ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
23	nt VH_CDR2_A1	ggacagatttatcctggagattatgataactacaatggaaaattcaag
24	nt VH_CDR2_A2	ggaaatattgatccttattatggaaccattattacaatcagatgttcacg
25	nt VH_CDR3_A1	gcaaggggggggatcgatctactatggaacctcgggttctcgtatgtc
26	nt VH_CDR3_A2	gcaagaggctccgctggttccttac
27	nt VK_CDR1_A1	actgccagctcacgtgtaagttccagttactgcac
28	nt VK_CDR1_A2	agtgccagctcaagtgttaacttacatgtac
29	nt VK_CDR2_A1	agtacatccaacctggcttct
30	nt VK_CDR2_A2	gacacatccaacctggcttct
31	nt VK_CDR3_A1	caccagtatcatcgttccccgtacacg
32	nt VK_CDR3_A2	cagcagtgaggtaattaccactcacg
33	IGHV1-80*01 (Genebank: AC160990)	ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID No	Запис	Послідовність
	Musmus) nt 138392-138424	
34	IGHV1-80*01 (Genebank: AC160990 Musmus) nt 138461-138511	ggacagatttatcctggagatggtgataactacaacggaaagtcaag
35	IGHV1-39*01 (Genebank: AC079181 Musmus) nt 153362-153394	ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
36	IGHV1-39*01 (Genebank: AC079181 Musmus) nt 153431-153481	ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagtcaag
37	IGKV4-74*01 (Genebank: AJ231217 Musmus) nt 496-531	actgccagctcaagtgaagttccagttactgcac
38	IGKV4-74*01 (Genebank: AJ231217 Musmus) nt 577-597	agcacatccaacctggcttct
39	IGKV4-74*01 (Genebank: AJ231217 Musmus) nt 691-718	caccagtatcatcggtccccaccca
40	IGKV4-55*01 (Genebank: AJ231225 Musmus) nt 523-552	agtgccagctcaagtgaagttacatgtac
41	IGKV4-55*01 (Genebank: AJ231225 Musmus) nt 598-618	gacacatccaacctggcttct
42	IGKV4-55*01 (Genebank: AJ231225 Musmus) nt 715-739	cagcagtgaggagtagttaccaccca
43	ADP-рибозилциклаза 2 (CD157; BST1)	MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSPDYDL FINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVA DFLSWCRQKNDGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIYQSKD SSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVVMHEI GGPNVESCCEGSMKVLEKRLKDMGMFQYSCINDYRPVKLLQCVDHS THPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQIRAGLIPLFLVLASRTQL
44	aa 29 - 292 °F ADP-рибозилциклаза 2 (CD157; BST1)	GARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEA FKVALDKDPCSVLPSPDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFA DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGLDYQSCPTSEDCEN NPVDSFWKRASIYQSKDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEI PNLQKEKITRIEIVVMHEIGGPNVESCCEGSMKVLEKRLKDMGMFQY SCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRK
45	A2 VH (амінокислоти 21-137 SEQ ID No:2)	QAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYNTINWVKQSHGKSLE WIGNIDPYYGTTYNQMFRTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSA VYFCARGSAWFYWGQGTLLVTVSA
46	VH1 - Гуманізована VH_A2	QVQLVQSGA EVKKGPGASVK VSCKASGYSF IEYNTINWVRQ APGQGLEWIGNIDPYYGTTY NQMFTGRATL TVDTSISTAY MELSLRSDDTAVYYCARGSAWF PYWGQGTLLV TVSS
47	BF238102 VH	QVQLVQSGA EVKKGPGASVK VSCKASGYSF TXXXXXWVRQ APGQGLEWMG XXXXXXXXXXX XXXXXXRVTL TRDTSISTAY MELSLRSDDTAVYYCARXXXXX XXXWGQGTLLV PVSS
48	A2 VL (амінокислоти 22-128 SEQ ID No:4)	DIVMSQSPA IMSASPGKEV TMTCSAS-SS VTYMYWYQQKPGSSPRLLIY DTSNLSAGVP VRFSGSGSGT

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID No	Запис	Послідовність
		SYSLTISRMEAEDTATYYCQ QWSNYPLTFG AGTKLELK
49	VL1 - Гуманізована VK_A2	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCSAS-SS VTYMYWYQQKPGKAPKLLIY DTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQ QWSNYPLTFG QGTVKVEIK
50	X72441 VL	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCXXXXXX XXXXXWYQQKPGKAPKLLIY XXXXXXXXGVP SRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCX XXXXXXXXFG QGTVKVEIK
51	VH1_CDR2	NIDPYYGTYYNQMFQ
52	aa VH_A3	MKQSTIALALLPLFTPVAKAQVQLQQSRAELVMPGASVKMSCKTS GYTFSDYWVHWVRQRPQGGLWIGAI DGSDTFNDYSQKFKGRAT LTVDESSSTVYMQLSLTSSEDAVYYCARGGLLQYWGGTTLTVS SAKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAPASS TKVDKKIVPRDCHHHHHHH
53	aa VK_A3	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPMADIQLTQSPASLSASVGETVTITCRA SENIYSYLA WYQQKPGKSPQLLVYNKTLGEGVPSRFSGSGSGTQ FSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTFGSGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDYSTMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNES
54	nt VH_A3	gtgaaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggcaaaagccca ggccagctgcagcagctctagggtgaactgtgatgcctgggcttcagtgaaagatgcctgca agactctggctacacattctctgactactgggtacactgggtgagggcagaggcctggacaagg ccttgagtggatcggagcgattgatggtctgatactttaatgactacagtcagaagttaagggc agggccacattgactgtagacgaatcctccagcacagctctacatgcaactcagcagcctgaca tctgaggactctgcggtctattactgtgcaaggggggcttctcagctactggggccaaggcac cactctcacagctcctcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctg ctgcccactaactccatggtagccctggatgcctggtagcagggtatttccctgagccagtg acagtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacacctccagctgtcctgcagct gacctctacactctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtc acctgcaacgtgcccacccggccagcagcaccaagggtggacaagaaaattgtgccaggg attgtcatcatcaccatcaccatcactaa
55	nt VK_A3	atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgcccacccagccatggc cgacattcagctgacccagctcctcagcctccctatctgcactctgtgggagaaactgtcccatca catgtcgagcaagtgaaaacatttacagttatttagcatggatcagcagaaacagggaaaatc tcctcagctcctggtctataatacaaaaaccttaggagaagggtgtccatcaagggtcagtgga gtggatcgggcacacaatttctctgaagatcaacagcctgcagcctgaagatttgggagttatt actgtcaacatcattatggtactccattcaggtcgggtcggggacaaagtggaaataaaacggg gctgatgtgcaccaactgtatccatctccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgc ctcagtcgtgtgcttctgaacaacttctaccccaagacatcaatgtcaagtgaagattgatgg cagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaaagacagcacc tacagcatgagcagcaccctcaggtgaccaaggacgagatgaacgacataacagctatac ctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagctcaacaggaatgagtctt aa
56	aa VH_CDR1_A3	GYTFSDYWVHW
57	aa VH_CDR2_A3	GAIDGSDTFNDYSQKFK
58	aa VH_CDR3_A3	ARGGLLQY
59	aa VK_CDR1_A3	RASENIYSYLA
60	aa VK_CDR2_A3	NTKTLGE
61	aa VK_CDR3_A3	QHGYGTPTT
62	nt VH_CDR1_A3	ggctacacattctctgactactgggtacactgg
63	nt VH_CDR2_A3	ggagcgattgatggtctgatactttaatgactacagtcagaagttaag
64	nt VH_CDR3_A3	gcaagggggggccttctcagtac
65	nt VK_CDR1_A3	cgagcaagtgaaaacatttacagttatttagca
66	nt VK_CDR2_A3	aatacaaaaaccttaggagaa

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID No	Запис	Послідовність
67	nt VK_CDR3_A3	caacatcattatggtactccattcacg
68	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg
69	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggagagattgatcctctgatagttataactacaatcaaaagttcaag
70	IGKV12-44*01 (AJ235955)	cgagcaagtgagaatatttacagttatttagca
71	IGKV12-44*01 (AJ235955)	aatgcaaaaaccttagcagaa
72	IGKV12-44*01 (AJ235955)	caacatcattatggtactcctcc

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Антитіло або його антигензв'язуюча частина, що специфічно зв'язується з BST1, де вказане антитіло містить:

а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить:

i) першу vhCDR, яка містить SEQ ID NO:10;

10 ii) другу vhCDR, яка містить послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:12 та SEQ ID NO:51; та

iii) третю vhCDR, яка містить SEQ ID NO:14; та

b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить:

i) першу vlCDR, яка містить SEQ ID NO:16;

15 ii) другу vlCDR, яка містить SEQ ID NO:18; та

iii) третю vlCDR, яка містить SEQ ID NO:20.

2. Антитіло або його антигензв'язуюча частина за п. 1, що містить: важкий ланцюг, щонайменше на 95 % ідентичний SEQ ID NO:2, та легкий ланцюг, щонайменше на 95 % ідентичний SEQ ID NO:4.

20 3. Антитіло або його антигензв'язуюча частина за п. 1, що містить: варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO:2, та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO:4.

4. Антитіло або його антигензв'язуюча частина за п. 1, що містить: важкий ланцюг, щонайменше на 95 % ідентичний SEQ ID NO:46, та легкий ланцюг, щонайменше на 95 % ідентичний SEQ ID NO:49.

25 5. Антитіло або його антигензв'язуюча частина за п. 4, що містить: варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO:46, та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO:49.

30 6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, де антитіло являє собою повнорозмірне антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 ізо типу.

7. Антитіло або його антигензв'язуюча частина, за будь-яким одним з пп. 1-6, що додатково містить ковалентно приєднаний фрагмент.

8. Антитіло або його антигензв'язуюча частина за п. 7, де зазначений фрагмент являє собою лікарський засіб.

35 9. Антитіло або його антигензв'язуюча частина за п. 8, де вказаний лікарський засіб вибраний з групи, що складається з майтанзиноїду, доластатину, ауристатину, трихотецену, каліхеаміцину, CC1065 та їх похідних.

10. Виділене антитіло за будь-яким з пп. 1-9, де вказане антитіло індукує антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC), комплементзалежну цитотоксичність (CDC) та/або Т-клітинну цитотоксичність.

40 11. Виділене антитіло за п. 10, де антитіло являє собою сконструйоване антитіло, що має підвищене зв'язування з Fc рецепторами та/або підвищену ефективність щодо ADCC та/або біспецифічного антитіла.

45 12. Виділене антитіло або його антигензв'язуюча частина за будь-яким одним з пп. 1-11, де антитіло являє собою біспецифічне або мультиспецифічне антитіло, яке специфічно зв'язується

з першим антигеном, що містить BST1 та другим антигеном, вибраним з групи, яка складається з CD3 антигену та CD5 антигену.

13. Нуклеїнова кислота, що кодує важкий ланцюг антитіла або його антигензв'язуючу частину за будь-яким з попередніх пунктів.

5 14. Нуклеїнова кислота, що кодує легкий ланцюг антитіла або його антигензв'язуючу частину за будь-яким з попередніх пунктів.

15. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за пп. 13 та/або 14.

16. Спосіб одержання антитіла за будь-яким одним з пп. 1-12, у якому культивують клітину-хазяїна за п. 15 в умовах, за яких експресується антитіло або його антигензв'язуюча частина, та необов'язково виділяють антитіло або його антигензв'язуючу частину.

10 17. Спосіб лікування захворювання, у якому пацієнту, що цього потребує, вводять антитіло або його антигензв'язуючу частину, за будь-яким з пп. 1-12, де антитіло або його антигензв'язуючу частину інтерналізовано клітинами, що експресують BST1, причому вказане антитіло містить ковалентно приєднаний кон'югат лікарського засобу.

15 18. Спосіб лікування захворювання, у якому пацієнту, що цього потребує, вводять антитіло за будь-яким з пп. 1-12, причому антитіло індукує антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC), комплемент-залежну цитотоксичність (CDC) та/або Т-клітинну цитотоксичність.

20 19. Спосіб за будь-яким з пп. 17-18, де вказаним захворюванням є рак, включаючи гостру мієлоїдну лейкемію (AML), В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію, рак молочної залози, рак кишечника, рак нирки, рак голови та шиї, рак легені, рак яєчників та рак підшлункової залози.

20. Антитіло за будь-яким з пп. 1-12 для застосування в терапії або для застосування як лікарського засобу.

#### VH CDR1 Вирівнювання

##### A1

SEQ ID No: 21	ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
SEQ ID No: 33	ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg
	***** ** *

##### A2

SEQ ID No: 22	ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
SEQ ID No: 35	ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
	***** *** * *

##### A3

SEQ ID No: 62	ggctacacattctctgactactgggtacactgg
SEQ ID No: 68	ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg
	***** * * * *

Fig. 1a

**VH CDR2** Вирівнювання**A1**

```

SEQ ID No: 23      ggacagatttatcctggagattatgataactaactacaatggaaaattcaag
SEQ ID No: 34      ggacagatttatcctggagatggtgataactaactacaacggaaagttcaag
                    *****

```

**A2**

```

SEQ ID No: 24      ggaaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacg
SEQ ID No: 36      ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagttcaag
                    ***      *** ***** * ***** ** ***** ***** *

```

**A3**

```

SEQ ID No: 63      ggagcagattgatggttctgatacttttaatgactacagtcagaagtttaag
SEQ ID No: 69      ggagagattgatccttctgatagttataactaactacaatcaaaagttcaag
                    **** ***** ***** ** * * ***** ** ***** **

```

**Fig. 1b****VK CDR1** Вирівнювання**A1**

```

SEQ ID No: 27      actgccagctcacgtgtaagttccagttacttgcac
SEQ ID No: 37      actgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcac
                    *****

```

**A2**

```

SEQ ID No: 28      agtgccagctcaagtgtaacttacatgtac
SEQ ID No: 40      agtgccagctcaagtgtaagttacatgtac
                    *****

```

**A3**

```

SEQ ID No: 65      cgagcaagtgaaaacatttacagttatntagca
SEQ ID No: 70      cgagcaagtgagaatatattacagttatntagca
                    ***** ** *****

```

**Fig. 2a****VK CDR2** Вирівнювання**A1**

```

SEQ ID No: 29      agtacatccaacctggcttct
SEQ ID No: 38      agcacatccaacctggcttct
                    ** *****

```

**A2**

```

SEQ ID No: 30      gacacatccaacctggcttct
SEQ ID No: 41      gacacatccaacctggcttct
                    *****

```

**A3**

```

SEQ ID No: 66      aatacaaaaaccttaggagaa
SEQ ID No: 71      aatgcaaaaaccttagcagaa
                    *** *****

```

**Fig. 2b**

### VK CDR3 Вирівнювання

#### A1

```
SEQ ID No: 31      caccagtatcatcggtcccccgtacacg
SEQ ID No: 39      caccagtatcatcggtcccccaccca--
                    *****
```

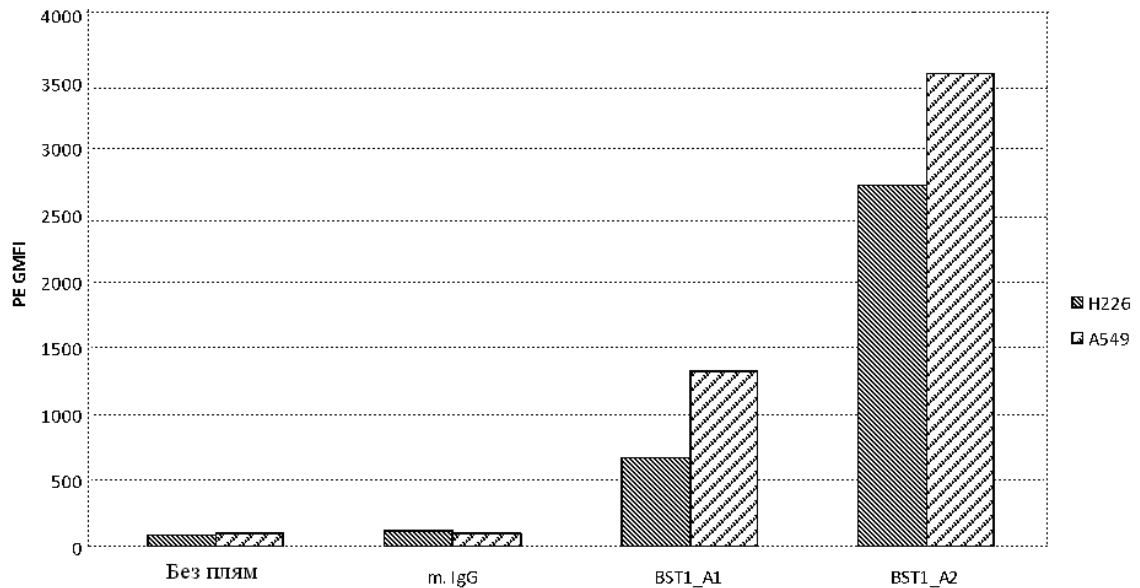
#### A2

```
SEQ ID No: 32      cagcagtggagtaattaccactcagc
SEQ ID No: 42      cagcagtggagtagttaccaccca--
                    *****
```

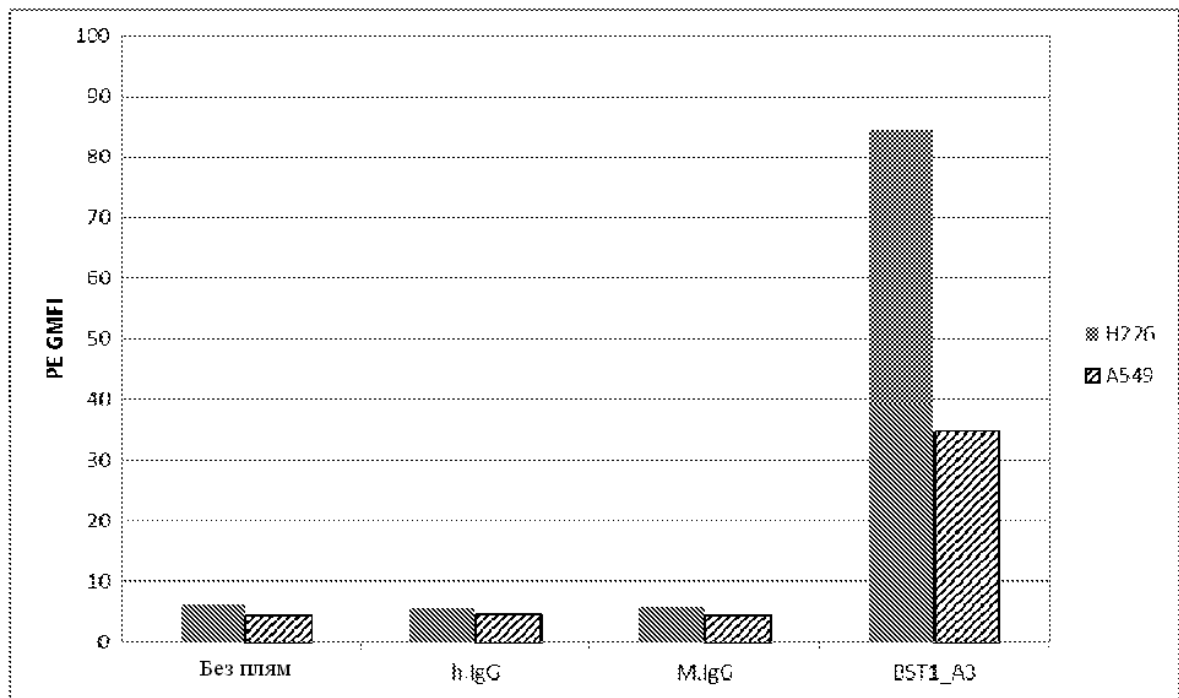
#### A3

```
SEQ ID No: 67      caacatcattatggtactccattcagc
SEQ ID No: 72      caacatcattatggtactcctcc---
                    *****
```

Фіг. 2с

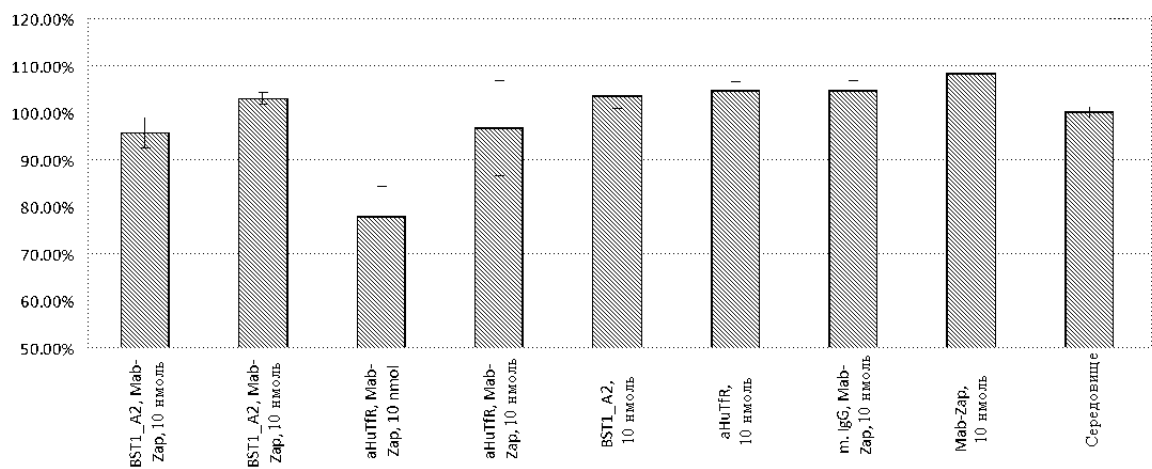


Фіг. 3а



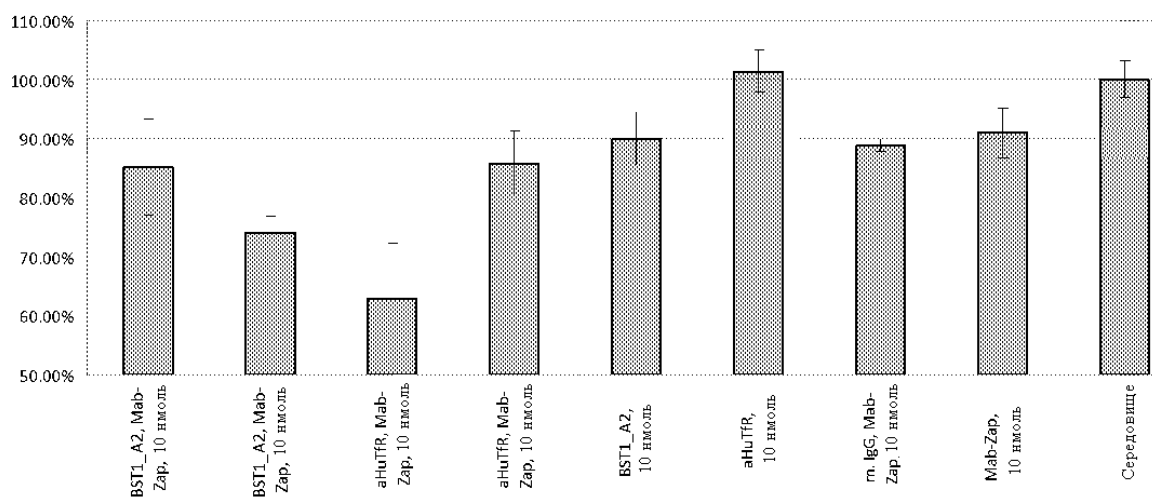
Фіг. 3b

Інтерналізація : BST1\_A2 vs H226



Фіг. 4a

Інтерналізація : BST1\_A2 vs A549



Фіг. 4b

	1	2	3	4
SEQ ID No: 45	123456789 0123456789 0123456789 0123456789			
SEQ ID No: 46	QAYLQQSGP ELVKAGASVK MSCKASGYSF <b>LEYTIN</b> WVKQ SHGKSLEWIG			
SEQ ID No: 47	QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYSF <b>LEYTIN</b> WVRQ APGQGLEWIG			

	5	6	7	8
SEQ ID No: 45	01223456789 0123456789 0123456789 0122223456789			
SEQ ID No: 46	<b>NIDPYYGTTY</b> <b>NQMF</b> TGKATL TVDQSSNTAY MQLKSLTSEDSAV			
SEQ ID No: 47	<b>NIDPYYGTTY</b> <b>NQMF</b> TGKATL TVDTSISTAY MELSRLRSDDTAV			

	1	1
SEQ ID No: 45	9 0 1	
SEQ ID No: 46	0123456789 0123456789 0123	
SEQ ID No: 47	YFCARGSAWF -PYWGQGTILV TVSA	

Фіг. 5

	1	2	3
SEQ ID No: 48	123456789 0123456789 0123456789 0123456789		
SEQ ID No: 49	DIVMSQSPA IMSASPGKEV TMTCSAS-SS <b>VTYMYWYQ</b> QK		
SEQ ID No: 50	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCSAS-SS <b>VTYMYWYQ</b> QK		

	4	5	6	7
SEQ ID No: 48	0123456789 0123456789 0123456789 0123456789			
SEQ ID No: 49	PGSSPRLLIY <b>DTSNLAS</b> GVP VRFSGSGSGT SYSLTISRME			
SEQ ID No: 50	PGKAPKLLIY <b>DTSNLAS</b> GVP SRFGSGSGT DYTLTISLQ			

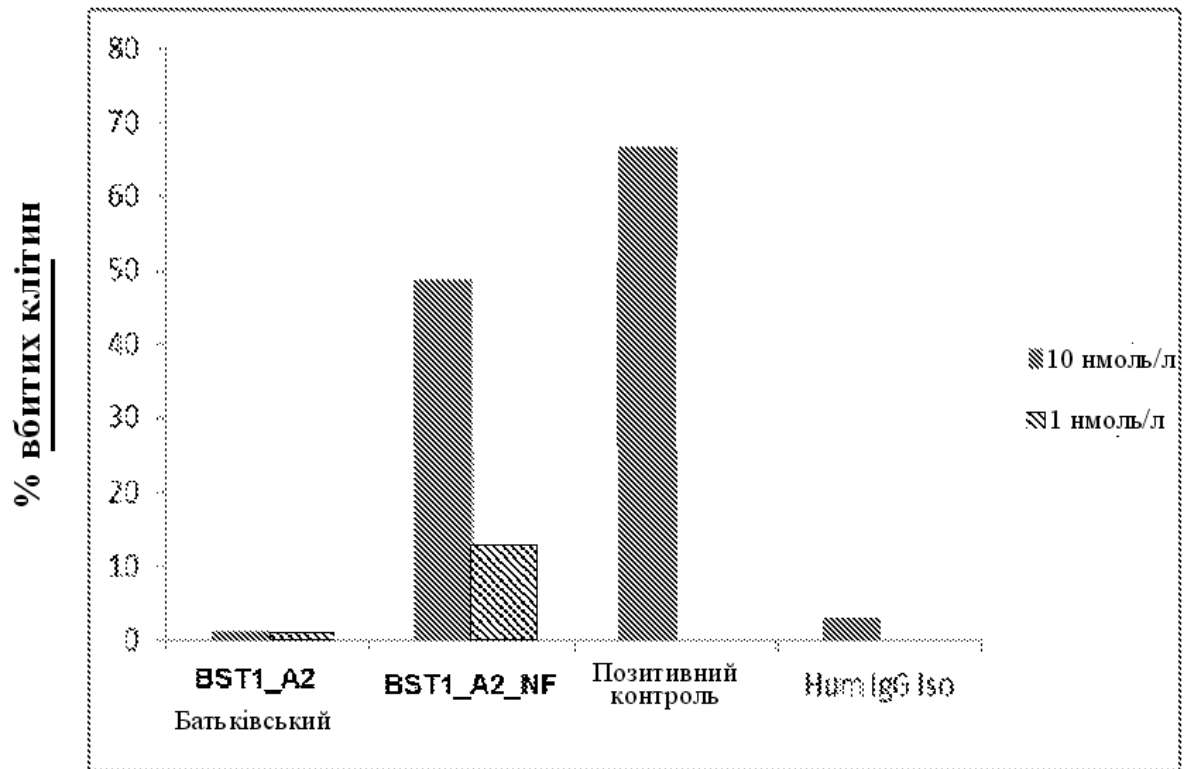
  

	1
SEQ ID No: 48	8 9 0
SEQ ID No: 49	0123456789 0123456789 01234567
SEQ ID No: 50	AEDTATYYCQ <b>QWSNYPLTF</b> G AGTKLELK

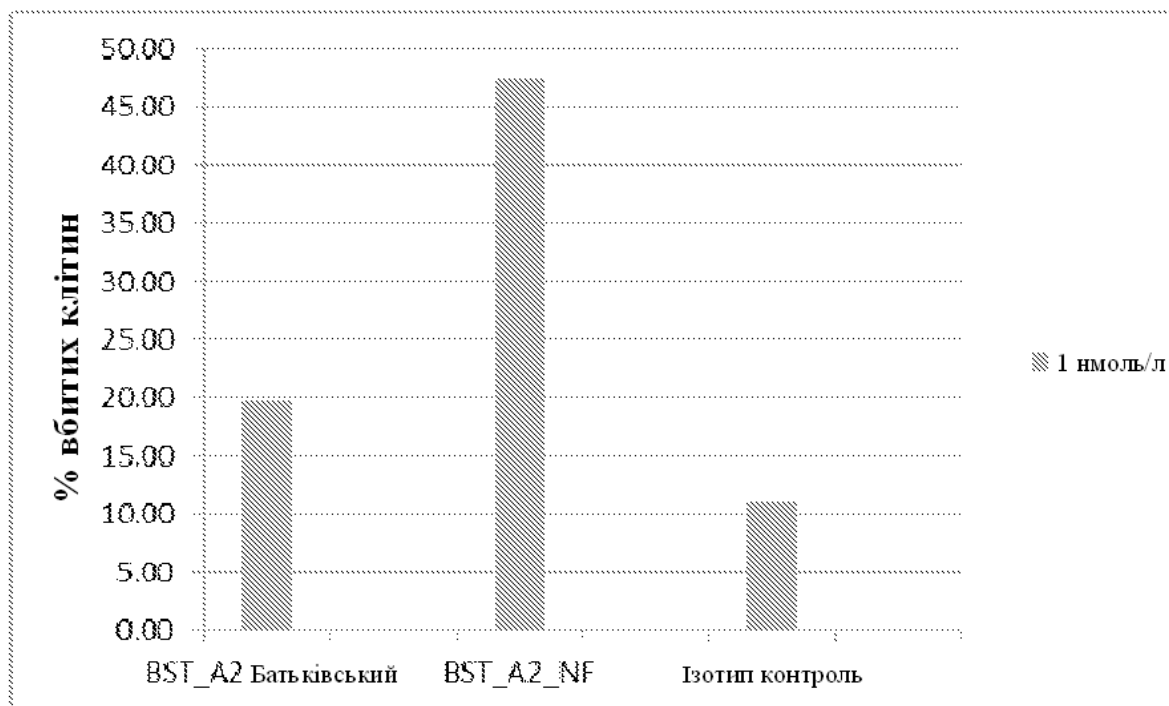
Фіг. 6

SEQ ID No: 12	GNIDPYYGTTYNQMF
SEQ ID No: 51	GNIDPYYGTTYNQMFQ

Фіг. 7



Фіг. 8a



Фіг. 8b

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601