



(51) МПК

*C07K 16/28* (2006.01)*C12N 15/06* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2012109004/10, 23.08.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.08.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

21.08.2009 EP 09305777.6;

21.08.2009 US 61/235,864;

25.05.2010 US 61/348,005

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2013 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 20.04.2016 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 21.03.2012(86) Заявка РСТ:  
EP 2010/062271 (23.08.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/020925 (24.02.2011)Адрес для переписки:  
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-  
ПАТЕНТ"

(72) Автор(ы):

**ГЁТШ Лилиан (FR),****ЖУАННО Александра (FR)**

(73) Патентообладатель(и):

**ПЬЕР ФАБР МЕДИКАМЕНТ (FR)****(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ сMet И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ  
РАКА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителу или его функциональному фрагменту, которые способны связываться с сMet. Также раскрыты мышинная гибридома, способная секретировать указное антитело, нуклеиновая кислота, которая экспрессирует указанное антитело и набор для прогнозирования эффективности лечения онкогенного расстройства, включающий указанное антитело. Раскрыты способ обнаружения сMet-экспрессирующей опухоли, способ диагностики

сMet-экспрессирующей опухоли, способ определения прогноза развития сMet-экспрессирующей опухоли и способ прогнозирования эффективности лечения онкогенного расстройства, с помощью заявленного анти-сMet-антитела. Изобретение обладает способностью специфически связываться с с-Met, что позволяет эффективно лечить заболевания, ассоциированные с экспрессией полипептида с-Met. 10 н. и 12 з.п. ф-лы, 12 ил., 6 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

WO 2009007427 A2, от 15.01.2009. US 0007476724 B2, от 13.01.2009. US 20050118165 A1, от 02.06.2005. US 20080286825 A1, от 20.11.2008. RU 2361879 C2, от 20.07.2009..

R U 2 5 8 2 2 6 5 C 2

R U 2 5 8 2 2 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012109004/10, 23.08.2010**  
(24) Effective date for property rights:  
**23.08.2010**  
Priority:  
(30) Convention priority:  
**21.08.2009 EP 09305777.6;**  
**21.08.2009 US 61/235,864;**  
**25.05.2010 US 61/348,005**  
(43) Application published: **27.09.2013** Bull. № 27  
(45) Date of publication: **20.04.2016** Bull. № 11  
(85) Commencement of national phase: **21.03.2012**  
(86) PCT application:  
**EP 2010/062271 (23.08.2010)**  
(87) PCT publication:  
**WO 2011/020925 (24.02.2011)**  
Mail address:  
**197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT"**

(72) Inventor(s):  
**GETSH Lilian (FR),**  
**ZHUANNO Aleksandra (FR)**  
(73) Proprietor(s):  
**PER FABR MEDIKAMENT (FR)**

(54) **ANTI-cMet ANTIBODY AND USE THEREOF FOR DETECTION AND DIAGNOSIS OF CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.  
SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, particularly to an antibody or a functional fragment thereof, which are capable of binding with cMet. The invention also discloses a murine hybridoma capable of secreting the said antibody, a nucleic acid which expresses the said antibody and a kit for the prognosis of the effectiveness of treating an oncogenic disorder, which includes the said antibody. The invention discloses a method of detecting a cMet-expressing tumour, a method of diagnosing the cMet-expressing

tumour, a method of determining the prognosis of the development of the cMet-expressing tumour and a method for the prognosis of the effectiveness of treating an oncogenic disorder using the disclosed anti-cMet antibody.

EFFECT: invention is capable of specifically binding with cMet, which provides the effective treatment of diseases associated with cMet polypeptide expression.

22 cl, 12 dwg, 6 tbl, 4 ex

RU 2 582 265 C 2

RU 2 582 265 C 2

Данное изобретение относится к области прогнозирования и/или диагностики пролиферативного заболевания у пациента. В частности, изобретение относится к новому антителу, способному специфически связываться с человеческим рецептором cMet, а также к аминокислотной и нуклеиновокислотной последовательностям, которые кодируют это антитело. Изобретение также включает применение указанного антитела и соответствующие способы для определения и диагностики патологических гиперпролиферативных онкогенных расстройств, связанных с экспрессией cMet. В некоторых воплощениях расстройства являются онкогенными расстройствами, связанными с повышенной экспрессией полипептида cMet по сравнению с нормой, или любой другой патологией, связанной со сверхэкспрессией cMet. Наконец, изобретение включает продукты и/или композиции или наборы, включающие по меньшей мере такое антитело для прогнозирования или диагностики некоторых видов рака.

Агенты, нацеленные на рецептор тирозинкиназы (RTK), такие как ингибиторы трастузумаб, цетуксимаб, бевацизумаб, иматиниб и гефитиниб, продемонстрировали интерес нацеливания на этот класс белков для лечения отдельных видов рака.

cMet является прототипным членом подсемейства RTK, которое также включает RON и SEA. Семейство RTK cMet структурно отличается от других семейств RTK и является единственным известным высоко аффинным рецептором для фактора роста гепатоцитов (HGF), также называемого рассеивающим фактором (SF) [D.P. Bottaro et al., *Science* 1991, 251:802-804; L. Naldini et al., *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 1991, 10:2867-2878]. cMet и HGF широко экспрессированы в различных тканях, и их экспрессия, как правило, ограничена клетками эпителиального и мезенхимального происхождения, соответственно [M.F. Di Renzo et al., *Oncogene* 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., *J. Cell. Biol.* 1993, 123:223-235]. Они оба необходимы для нормального развития млекопитающих, и было показано, что особенно важны в миграции клеток, морфогенной дифференциации и организации трехмерных трубчатых структур, а также росте и ангиогенезе [F. Baldt et al., *Nature* 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., *Nature*. 1995:373:699-702; Tsarfaty et al., *Science* 1994, 263:98-101]. Так как было показано, что контролируемое регулирование cMet и HGF играет важную роль в развитии млекопитающих, поддержании и репарации тканей [Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., *Brain Res.* 2004, 5:999(2):155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307(1):146-51], нарушение их регуляции вовлечено в прогрессию раков.

Нарушенная сигнализация, управляемая несоответствующей активацией cMet, является одним из наиболее частых изменений, наблюдаемых в человеческих раках, и играет важнейшую роль в развитии опухолей и метастазов [Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].

Несоответствующая активация cMet может возникнуть путем лиганд-зависимого и лиганд-независимого механизмов, которые включают сверхэкспрессию cMet и/или паракринную или аутокринную активацию, или через усиление функции мутации [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., *Cancer Letters.* 2005, 226:1-26]. Тем не менее, олигомеризация cMet-рецептора, в присутствии или в отсутствие лиганда, необходима для регуляции аффинности связывания и кинетики связывания киназы с АТФ и тирозин-содержащими пептидными субстратами [Hays JL, Watowich SJ, *Biochemistry*, 2004 Aug 17, 43:10570-8]. Активированный cMet привлекает эффекторы сигналинга к своему мультидоковому сайту, расположенному в цитоплазматическом домене, приводя к активации нескольких ключевых сигнальных путей, в том числе Ras-MAPK, PI3K, Src

и Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene. 2000, 19(49):5582-9]. Эти пути имеют важное значение для пролиферации опухолевых клеток, инвазии и ангиогенеза и для уклонения от апоптоза [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000, 19(49):5582-9; Gu H, Neel BG, Trends Cell Biol. 2003 Mar, 13(3):122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, Oncogene. 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. Кроме того, уникальным аспектом сMet-сигналинга по сравнению с другими RTK является его взаимодействие с фокальными комплексами адгезии и некиназными связывающими партнерами, такими как  $\alpha 6$ (34)-интегрины [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, Cell. 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, J Biol Chem. 1999, 274(10):6499-506], плексин B1 или семафорины [Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene. 2004, 23:5131-7], которые также могут увеличить сложность регуляции клеточной функции этим рецептором. Наконец, последние данные показывают, что сMet может быть вовлечен в устойчивость опухоли к gefитинибу или эрлотинибу, подтверждая, что сочетание соединения, нацеленного и на EGFR, и на сMet, может быть весьма интересным [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].

В последние несколько лет много различных стратегий было разработано для ослабления сMet-сигналинга в линиях раковых клеток. Эти стратегии включают i) нейтрализующие антитела против сMet или HGF/SF [Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci USA. 2001, 98(13):7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] или применение HGF/SF-антагониста NK4 для предотвращения связывания лиганда с сMet [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) малые ингибиторы АТФ-связывающих сайтов с сMet, которые блокируют киназную активность [Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) разработанный SH2-доменный полипептид, который препятствует доступу к мультидоковому сайту, и РНКи или рибозим, которые уменьшают экспрессию рецептора или лиганда. Большинство из этих подходов отображают селективное ингибирование сMet, приводящее к ингибированию опухоли и показывающее, что сMet может представлять интерес для терапевтического вмешательства при раке.

Данное изобретение призвано обеспечить по меньшей мере одним реагентом, который может быть использован в качестве диагностического или прогностического биомаркера для обнаружения и/или мониторинга онкогенных расстройств, особенно тех, которые характеризуются экспрессией сMet, или тех, которые опосредованы ненормальной экспрессией сMet.

О предыдущих попытках разработать полезное антитело, которое может быть использовано в качестве диагностического и прогностического инструмента, не сообщалось. Описанные в данном документе антитела являются новыми антителами, которые отвечают этим критериям.

Другие особенности и преимущества изобретения будут очевидны из подробного описания и примеров, приведенных ниже.

В первом аспекте предметом изобретения является выделенное антитело или один

из его функциональных фрагментов или производных, которое связывается с рецептором сMet (сMet), предпочтительно человеческим сMet, с высокой аффинностью, и поэтому может быть полезным в способах диагностики патологических гиперпролиферативных онкогенных расстройств, опосредованных экспрессией сMet.

5 Выражение «функциональный фрагмент(ы) и/или производное(ые)» подробно будет определено позже в данном описании.

Здесь следует понимать, что изобретение не связано с антителами в их природной форме, т.е. они не находятся в их природной среде, но они могут быть выделены или получены путем очистки из природных источников, либо получены путем генетической  
10 рекомбинации или путем химического синтеза, и что они могут содержать неприродные аминокислоты, как будет описано далее.

В частности, в соответствии с другим аспектом изобретения предполагается выделенное антитело или один из его функциональных фрагментов или производных, способных специфически связываться с сMet, при этом указанное антитело  
15 характеризуется тем, что оно включает по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность (CDR), выбранную из CDR, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID №№1-12 или 29-39, или по меньшей мере одну CDR, последовательность которой по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности 1-12 или 29-39 после оптимального  
20 выравнивания.

Понятие «функциональный фрагмент» антитела обозначает, в частности, фрагмент антитела, такой как фрагменты Fv, scFv (sc обозначает одну цепь), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc, или димерные антитела, или любой фрагмент, время полужизни которого было  
увеличено. Такие функциональные фрагменты будут подробно описаны ниже в данном  
25 описании.

Понятие «производное соединение» или «производное» антитела обозначает, в частности, белок, состоящий из пептидного остова и по меньшей мере одной CDR исходного антитела для того, чтобы он сохранил свою способность быть распознанным. Такие производные соединения, хорошо известные специалистам в данной области,  
30 будут описаны более подробно в данном описании.

Более предпочтительно, изобретение содержит антитела, их производные соединения или функциональные фрагменты в соответствии с данным изобретением, полученные путем генетической рекомбинации или химического синтеза.

В соответствии с предпочтительным воплощением антитело изобретения или его  
35 производные соединения или функциональные фрагменты характеризуются тем, что они состоят из моноклонального антитела.

Под «моноклональным антителом» понимается антитело, происходящее из почти однородной популяции антитела. Более конкретно, отдельные антитела популяции идентичны, за исключением нескольких возможных природных мутаций, которые могут  
40 быть найдены в минимальных пропорциях. Другими словами, моноклональное антитело состоит из однородного антитела, полученного при выращивании одного клона клеток (например, гибридомы, эукариотической клетки-хозяина, трансфицированной молекулой ДНК, кодирующей однородное антитело, прокариотической клетки-хозяина, трансфицированной молекулой ДНК, кодирующей однородное антитело, и т.д.) и, как  
45 правило, характеризуется тяжелыми цепями одного и только одного класса и подкласса, и легкими цепями только одного типа. Моноклональные антитела высоко специфичны и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела,

направленные против различных детерминант, или эпитопов, каждое моноклональное антитело направлено против одного эпитопа антигена.

Следует понимать, что изобретение не связано с антителами в их природной форме, т.е. они взяты не из их природной среды, а выделены или получены путем очистки из природных источников или получены путем генетической рекомбинации или химического синтеза и, следовательно, они могут нести неприродные аминокислоты, как будет описано ниже.

В первом и предпочтительном воплощении изобретения CDR антитела будут определены в соответствии с системой нумерации IMGT.

Уникальная нумерация IMGT была создана для сравнения вариабельных доменов независимо от антигенного рецептора, типа цепи или вида [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. В уникальной нумерации IMGT консервативные аминокислоты всегда занимают одну и ту же позицию, например цистеин 23 (1-CYS), триптофан 41 (CONSERVED-TRP), гидрофобная аминокислота 89, цистеин 104 (2-CYS), фенилаланин или триптофан 118 (J-PHE или J-TRP). Уникальная нумерация IMGT предусматривает стандартизированное разграничение каркасных областей (FR1-IMGT: позиции 1-26, FR2-IMGT: 39-55, FR3-IMGT: 66-104 и FR4-IMGT: 118-128) и областей, определяющих комплементарность: CDR1-IMGT: 27-38, CDR2-IMGT: 56-65 и CDR3-IMGT: 105-117. Т.к. разрывы представляют собой незанятые позиции, то длины CDR-IMGT (показаны в скобках и разделены точками, например [8.8.13]) становятся важной информацией. Уникальная нумерация IMGT используется в 2D-графическом представлении, обозначенном как IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], и в 3D-структурах в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Существует три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи. Термин «CDR» в единственном или множественном числе применяется здесь для обозначения, в зависимости от случая, одного или более или даже всех этих участков, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за аффинное связывание антитела с антигеном или эпитопом, который оно распознает.

Более конкретно, в соответствии с первым аспектом изобретения относится к выделенному, антителу или функциональному фрагменту или его производному, способному специфически связываться с сMet-белком, состоящему из i) тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере одну из следующих CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID №55, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №56, и CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №57; и/или ii) легкой цепи, содержащей по меньшей мере одну из следующих CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT, где CDR-L1 включает последовательность SEQ ID №58, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID №59, и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID №60.

В предпочтительном воплощении данное изобретение направлено на выделенное антитело или функциональный фрагмент или его производное, способное специфически связываться с сMet-белком, отличающееся тем, что оно состоит из i) тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере следующие три CDR: CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT, где CDR-H1 включает

последовательность SEQ ID №55, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №56, и CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №57; и/или ii) легкой цепи, содержащей по меньшей мере следующие три CDR: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT, где CDR-L1 включает последовательность SEQ ID №58, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID №59, и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID №60.

Для ясности консенсусные последовательности SEQ ID №№55-60 изобретения приведены в следующей таблице 1.

Таблица 1		
	SEQ ID №	Последовательность (IMGT)
CDR-H1	55	GYX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> TSX <sub>3</sub> YX <sub>4</sub>
CDR-H2	56	INX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> GX <sub>8</sub> X <sub>9</sub>
CDR-H3	57	X <sub>10</sub> RX <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub> Y
CDR-L1	58	X <sub>18</sub> X <sub>19</sub> X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> X <sub>22</sub> Y
CDR-L2	59	X <sub>23</sub> X <sub>24</sub> S
CDR-L3	60	QQX <sub>25</sub> NSX <sub>26</sub> PX <sub>27</sub> T

C:

X<sub>1</sub>: S или T X<sub>2</sub>: I или F

X<sub>3</sub>: A или -

X<sub>4</sub>: F или W

X<sub>5</sub>: Y или P X<sub>6</sub>: D или S

X<sub>7</sub>: - или N

X<sub>8</sub>: T или R

X<sub>9</sub>: N или T X<sub>10</sub>: T или A

X<sub>11</sub>: D или R

X<sub>12</sub>: R или V

X<sub>13</sub>: T или G X<sub>14</sub>: F или Y

X<sub>15</sub>: A или L

X<sub>16</sub>: - или M

X<sub>17</sub>: - или D X<sub>18</sub>: Q или -

X<sub>19</sub>: R или S

X<sub>20</sub>: I или S

X<sub>21</sub>: Y или V X<sub>22</sub>: N или S

X<sub>23</sub>: Y или D

X<sub>24</sub>: A или T

X<sub>25</sub>: S или W X<sub>26</sub>: W или N

X<sub>27</sub>: L или P

«-» - обозначение для «утерянных» (делеция аминокислотного остатка в этой позиции).

В соответствии с конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает тяжелую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID №7, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №2, и CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №8.

В соответствии с конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает легкую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает последовательность SEQ ID №4, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID №5, и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID №6.

В соответствии с конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает тяжелую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT: соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID №29, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №30, и CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №31.

В соответствии с конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает легкую цепь, включающую следующие три CDR, как они определены в соответствии с

системой нумерации IMGT: соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает последовательность SEQ ID №32, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID №33, и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID №34.

Другими словами, изобретение также может быть описано как антитело или один из его функциональных фрагментов или производных, которое характеризуется тем, что включает тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из:

а) тяжелой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT: соответственно CDR-H1 с последовательностью SEQ ID №7, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID №2 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID №8; и

б) тяжелой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT: соответственно CDR-H1 с последовательностью SEQ ID №29, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID №30 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID №31.

Изобретение также может быть описано как антитело или один из его функциональных фрагментов или производных, которое характеризуется тем, что включает легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из:

а) легкой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT: соответственно CDR-L1 с последовательностью SEQ ID №4, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID №5 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID №6; и

б) легкой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации IMGT: соответственно CDR-L1 с последовательностью SEQ ID №32, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID №33 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID №34.

В другом воплощении области, определяющие комплементарность, или CDR, означают гипервариабельные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, как они определены Кабат и соавт. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, и более поздние издания). Существует три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи. Термин «CDR» в единственном или множественном числе применяется здесь для обозначения, в зависимости от случая, одного или более или даже всех этих участков, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за аффинное связывание антитела с антигеном или эпитопом, который оно распознает.

В соответствии с другим конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает тяжелую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с Кабат: соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID №9, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №10, и CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №3.

В соответствии с другим конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает легкую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с Кабат: соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает последовательность 11, CDR-L2 включает последовательность 12, и CDR-L3 включает последовательность 6.

В соответствии с другим конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает

тяжелую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации Кабат: соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID №35, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №36, и CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №37.

5 В соответствии с другим конкретным воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает легкую цепь со следующими тремя CDR, как они определены в соответствии с системой нумерации Кабат: соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает последовательность SEQ ID №38, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID №39,  
10 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID №34.

Еще один способ определить CDR антител в соответствии с изобретением может состоять в определении общих остатков для каждой CDR в соответствии с IMGT и Кабат.

15 В соответствии с другим воплощением антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну из трех CDR-последовательностей SEQ ID №№1, 2 или 3 или по меньшей мере одну последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №№1, 2 или 3 после оптимального выравнивания.

20 В частности, антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает легкую цепь, включающую по меньшей мере одну из трех CDR-последовательностей SEQ ID №№4, 5 или 6 или по меньшей мере одну последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №№4,  
25 5 или 6 после оптимального выравнивания.

Предпочтительным образом, антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает тяжелую цепь со следующими тремя CDR, соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где:

- CDR-H1 включает последовательность SEQ ID №1, 7, 9, 29 или 35 или  
30 последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №1, 7, 9, 29 или 35 после оптимального выравнивания;

- CDR-H2 включает последовательность SEQ ID №2, 10, 30 или 36 или последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%,  
35 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №2, 10, 30 или 36 после оптимального выравнивания; и

- CDR-H3 включает последовательность SEQ ID №3, 8, 31 или 37 или последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №3, 8, 31 или 37 после оптимального  
40 выравнивания.

Еще более предпочтительно антитело изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает легкую цепь со следующими тремя CDR, соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

- CDR-L1 включает последовательность SEQ ID №4, 11, 32 или 38 или  
45 последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №4, 11, 32 или 38 после оптимального выравнивания;

- CDR-L2 включает последовательность SEQ ID №5, 12, 33 или 39 или

последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №5, 12, 33 или 39 после оптимального выравнивания; и

5 - CDR-L3 включает последовательность SEQ ID №6 или 34 или последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентична последовательности SEQ ID №6 или 34 после оптимального выравнивания.

В еще одном воплощении изобретение также может быть описано как антитело или его функциональный фрагмент или производное, которое характеризуется тем, что выбрано из группы, состоящей из:

10 а) антитела или его функционального фрагмента или производного, состоящего из:  
- тяжелой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-H1 с последовательностью SEQ ID №7, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID №2 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID №8; и

15 - легкой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-L1 с последовательностью SEQ ID №4, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID №5 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID №6; и

б) антитела или его функционального фрагмента или производного, состоящего из:  
- тяжелой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-H1 с последовательностью SEQ ID №29, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID №30 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID №31.

20 - легкой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-L1 с последовательностью SEQ ID №32, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID №33 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID №34.

В данном описании термины «полипептиды», «полипептидные последовательности», «пептиды» и «белки», применяемые по отношению к соединениям антителам или их последовательностям, являются взаимозаменяемыми.

Здесь следует понимать, что изобретение не относится к антителам в природной форме, т.е. они взяты не из их природной среды, а выделены или получены путем очистки из природных источников, либо получены путем генетической рекомбинации, либо 30 путем химического синтеза, и, таким образом, они могут содержать неприродные аминокислоты, как будет описано ниже.

Для большей ясности, необходимо понимать, что в следующем описании, и в частности в таблицах 3а и , CDR антитела, называемого 224D10, будут определены по нумерации IMGT, нумерации Кабата и общей нумерации.

35 Общая нумерация объединяет остаточные части каждой CDR, которые являются общими для CDR, определенных в соответствии с системами нумерации IMGT и Кабата.

Система нумерации IMGT определяет CDR в соответствии с IMGT-системой, как определено выше, в то время как система нумерации Кабата определяет CDR в соответствии с системой Кабата, как определено выше.

40 В частности, CDR-H1 содержит SEQ ID №1 (TSAYF) в общей системе нумерации, SEQ ID №7 (GYSITSAYF) в системе нумерации IMGT и SEQ ID №9 (TSAYFWS) в системе нумерации Кабата.

CDR-H2 содержит SEQ ID №2 (INYDGTN) в общей системе нумерации и системе нумерации IMGT и SEQ ID №10 (FINYDGTNNYNPSLKN) в системе нумерации Кабата.

45 CDR-H3 содержит SEQ ID №3 (DRTFAY) в общей системе нумерации и системе нумерации Кабата, в то время как в системе нумерации IMGT он содержит SEQ ID №8 (TRDRTFAY).

Для легкой цепи, CDR-L1 содержит SEQ ID №4 (QRIYNY) в общей системе нумерации

и системе нумерации IMGT и SEQ ID №11 (RASQRIYNYLH) в системе нумерации Кабата.

Что касается CDR-L2, он содержит SEQ ID №5 (YAS) в общей системе нумерации и системе нумерации IMGT и SEQ ID №12 (YASQSIG) в системе нумерации Кабата.

5 Наконец, CDR-L3 содержит SEQ ID №6 (QQNSWPLT) в каждой из трех систем нумерации.

То же самое специалист в данной области легко сделает для антитела 221C9.

Параллельно с этим, для большей ясности, необходимо понимать, что в последующем описании, и в частности в таблице 3b и 4b, CDR антитела, называемого 221C9, будут определены по нумерации IMGT и нумерации Кабата.

10 В контексте данного изобретения «процент идентичности» двух нуклеиновокислотных или аминокислотных последовательностей обозначает процент идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков в двух сравниваемых последовательностях, полученный после оптимального выравнивания; этот процент чисто статистический, и различия между двумя последовательностями распределяются случайным образом по всей их  
15 длине. Сравнение двух нуклеиновокислотных или аминокислотных последовательностей традиционно проводится путем сравнения этих последовательностей после выравнивания их оптимальным образом; указанное сравнение может осуществляться по сегментам или с помощью «окна сравнения». Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть осуществлено, в дополнение к ручному,  
20 с помощью алгоритма локальной гомологии Смита-Уотермана (1981) [Ad. App. Math. 2:482], с помощью алгоритма локальной гомологии Нидлмана-Вунша (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], с помощью способа поиска сходства Пирсона и Липмана (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] или с помощью компьютерного программного обеспечения с использованием этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете  
25 программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, либо с помощью программного обеспечения для сравнения BLAST NR или BLAST P).

Процент идентичности двух нуклеиновокислотных или аминокислотных последовательностей определяют путем сравнения двух последовательностей,  
30 выровненных оптимальным образом, при этом сравниваемая нуклеиновокислотная или аминокислотная последовательность может включать добавления или делеции по сравнению с референсной последовательностью для оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Процент идентичности рассчитывается путем определения числа позиций, в которых нуклеотид или аминокислотный остаток идентичен в двух  
35 последовательностях, деления этого количества идентичных позиций на общее количество позиций в окне выравнивания и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процент идентичности этих двух последовательностей.

Например, программа BLAST «BLAST 2 sequences» (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:  
40 247-250), доступная на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, может быть использована с параметрами по умолчанию (в частности, с параметрами «штраф за открытие делеции»: 5 и «штраф за удлинение делеции»: 2; выбранной матрицей будет, например, матрица «BLOSUM 62», предложенная в программе); процентная идентичность двух сравниваемых последовательностей рассчитывается непосредственно  
45 в программе.

Среди аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичность с референсной аминокислотной последовательностью, предпочтительными примерами являются те, которые содержат

референсную последовательность, определенные модификации, в частности делецию, добавление или замену по меньшей мере одной аминокислоты, усечение или удлинение. В случае замены одной или более последовательных или непоследовательных аминокислот предпочтительными являются такие замены, в которых замененные аминокислоты заменены «эквивалентными» аминокислотами. Выражение «эквивалентные аминокислоты» используется здесь для обозначения любых аминокислот, которые могут быть заменены одной из структурных аминокислот, но без значительной модификации биологических активностей соответствующих антител и таких специфических примеров, какие будут определены позже.

Эквивалентные аминокислоты могут быть определены либо на основании их структурной гомологии с аминокислотами, которые они заменяют, либо по результатам сравнительных анализов биологической активности различных антител, на которую они способны.

В качестве неограничивающего примера приведенная ниже таблица 2 показывает замены, возможные без получения значительной модификации биологической активности соответствующего модифицированного антитела; обратные замены, разумеется, также возможны в тех же условиях.

Таблица 2	
Исходный остаток	Замена(ы)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Специалистам в данной области известно, что на текущем уровне техники наибольшая вариабельность (по длине и составу) среди шести CDR находится в трех CDR тяжелой цепи и, в частности, в CDR-H3 этой тяжелой цепи.

В конкретном воплощении данное изобретение относится к мышиному антителу или его производным соединениям или функциональным фрагментам.

Другое воплощение изобретения раскрывает антитело 224D10 или один из его функциональных фрагментов или производных, содержащих тяжелую цепь с тремя следующими CDR, основанными на «общем» определении CDR:

- CDR-H1 последовательности SEQ ID №1 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №1;

- CDR-H2 последовательности SEQ ID №2 или последовательности, по меньшей мере

на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №2; и

- CDR-H3 последовательности SEQ ID №3 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

5 выравнивания последовательности SEQ ID №3; и

легкую цепь с тремя следующими CDR:

- CDR-L1 последовательности SEQ ID №4 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

10 выравнивания последовательности SEQ ID №4;  
- CDR-L2 последовательности SEQ ID №5 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

выравнивания последовательности SEQ ID №5; и  
- CDR-L3 последовательности SEQ ID №6 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

15 выравнивания последовательности SEQ ID №6.

Еще одно воплощение изобретения раскрывает антитело 224D10 или один из его функциональных фрагментов или производных, содержащих тяжелую цепь с тремя следующими CDR, основанными на системе нумерации IMGT:

- CDR-H1 последовательности SEQ ID №7 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

20 выравнивания последовательности SEQ ID №7;  
- CDR-H2 последовательности SEQ ID №2 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

25 выравнивания последовательности SEQ ID №2; и  
- CDR-H3 последовательности SEQ ID №8 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

выравнивания последовательности SEQ ID №8; и

легкую цепь с тремя следующими CDR:

- CDR-L1 последовательности SEQ ID №4 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

30 выравнивания последовательности SEQ ID №4;  
- CDR-L2 последовательности SEQ ID №5 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

35 выравнивания последовательности SEQ ID №5; и  
- CDR-L3 последовательности SEQ ID №6 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

40 выравнивания последовательности SEQ ID №6.  
Еще одно воплощение изобретения раскрывает антитело 224D10 или или один из его функциональных фрагментов или производных, содержащих тяжелую цепь с тремя

45 следующими CDR, основанными на системе нумерации Кабата:  
- CDR-H1 последовательности SEQ ID №9 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

выравнивания последовательности SEQ ID №9;  
- CDR-H2 последовательности SEQ ID №10 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

выравнивания последовательности SEQ ID №10; и  
- CDR-H3 последовательности SEQ ID №3 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

выравнивания последовательности SEQ ID №3; и

легкую цепь с тремя следующими CDR:

- CDR-L1 последовательности SEQ ID №11 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №11;

- CDR-L2 последовательности SEQ ID №12 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №12; и

- CDR-L3 последовательности SEQ ID №6 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №6.

Антитело 224D10 или один из его функциональных фрагментов или производных в соответствии с изобретением характеризуется тем, что содержит в соответствии с «общей» системой нумерации:

- тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID №1, CDR-H2 последовательности SEQ ID №2 и CDR-H3 последовательности SEQ ID №3; и

- легкую цепь, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID №4, CDR-L2 последовательности SEQ ID №5 и CDR-L3 последовательности SEQ ID №6.

В другом воплощении антитело 224D10 или один из его функциональных фрагментов или производных в соответствии с изобретением характеризуется тем, что содержит в соответствии с системой нумерации IMGT:

- тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID №7, CDR-H2 последовательности SEQ ID №2 и CDR-H3 последовательности SEQ ID №8; и

- легкую цепь, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID №4, CDR-L2 последовательности SEQ ID №5 и CDR-L3 последовательности SEQ ID №6.

В другом воплощении антитело 224D10 или один из его функциональных фрагментов или производных в соответствии с изобретением характеризуется тем, что содержит в соответствии с системой нумерации Кабата:

- тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID №9, CDR-H2 последовательности SEQ ID №10 и CDR-H3 последовательности SEQ ID №3; и

- легкую цепь, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID №11, CDR-L2 последовательности SEQ ID №12 и CDR-L3 последовательности SEQ ID №6.

В соответствии с еще одним воплощением антитело 224D10 изобретения или его производные соединения или функциональные фрагменты характеризуются тем, что содержат последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №13 или последовательностью, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №13; и тем, что они содержат последовательность переменного домена легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №14 или последовательностью, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №14.

Более конкретно, антитело изобретения, его производное соединение или функциональный фрагмент включает:

а) последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №13, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичную после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №14; и

б) характеризуется тем, что указанное антитело или функциональный фрагмент или его производное

- 5 - способно специфически связывать сMet-белок и, предпочтительно,  
- не блокирует связывание лиганда HGF сMet-белком. В другом воплощении изобретения оно раскрывает антитело 221C9 или один из его функциональных фрагментов или производных, содержащих тяжелую цепь с тремя следующими CDR:
- 10 - CDR-H1 последовательности SEQ ID №29 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №29;  
- CDR-H2 последовательности SEQ ID №30 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №30; и
- 15 - CDR-H3 последовательности SEQ ID №31 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №31, и легкую цепь с тремя следующими CDR:
- CDR-L1 последовательности SEQ ID №32 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №32;
- 20 - CDR-L2 последовательности SEQ ID №33 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №33; и
- 25 - CDR-L3 последовательности SEQ ID №34 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №34.

Еще одно воплощение изобретения раскрывает антитело 221 C9 или один из его функциональных фрагментов или производных, содержащих тяжелую цепь с тремя следующими CDR:

30

- CDR-H1 последовательности SEQ ID №35 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной с последовательностью SEQ ID №35 после оптимального выравнивания;
- 35 - CDR-H2 последовательности SEQ ID №36 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №36; и
- CDR-H3 последовательности SEQ ID №37 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №37, и
- 40 легкую цепь с тремя следующими CDR:
- CDR-L1 последовательности SEQ ID №38 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №38;
- 45 - CDR-L2 последовательности SEQ ID №39 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №39; и
- CDR-L3 последовательности SEQ ID №34 или последовательности, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального

выравнивания последовательности SEQ ID №34.

Другими словами, выделенное антитело 221 С9 или один из его функциональных фрагментов или производных в соответствии с изобретением характеризуется тем, что включает, в соответствии с системой нумерации IMGT:

- 5 - тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID №29, CDR-H2 последовательности SEQ ID №30 и CDR-H3 последовательности SEQ ID №31; и
- легкую цепь, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID №32, CDR-L2 последовательности SEQ ID №33 и CDR-L3 последовательности SEQ ID №34.

10 В другом воплощении выделенное антитело 221С9 или один из его функциональных фрагментов или производных в соответствии с изобретением характеризуется тем, что включает, в соответствии с системой нумерации Кабата:

- тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID №35, CDR-H2 последовательности SEQ ID №36 и CDR-H3 последовательности SEQ ID №37; и
- 15 - легкую цепь, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID №38, CDR-L2 последовательности SEQ ID №39 и CDR-L3 последовательности SEQ ID №34.

В соответствии с еще одним воплощением антитело 221 С9 изобретения или один из его функциональных фрагментов или производных характеризуется тем, что включает последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №40 или последовательностью, по меньшей мере на 80%,  
20 предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №40; и/или тем, что включает последовательность переменного домена легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №41 или последовательностью, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности  
25 SEQ ID №41.

Более конкретно, антитело изобретения, его производное соединение или функциональный фрагмент включает:

- а) последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и  
30 98% идентичной после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №40, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичную после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID №41; и

б) характеризуется тем, что указанное антитело или функциональный фрагмент или  
35 его производное

- способно специфически связывать сMet-белок и, предпочтительно,
- не блокирует связывание лиганда HGF сMet-белком.

Другими словами, изобретение также может быть описано как антитело или его функциональный фрагмент или производное, которое характеризуется тем, что оно  
40 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его функционального фрагмента или производного, содержащего последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №13 и последовательность переменного домена легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №14; и

б) антитела или его функционального фрагмента или производного, содержащего последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №40 и последовательность переменного домена легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №41.

Как было сказано выше, изобретение также относится к любому соединению, полученному из антитела, описанного в изобретении.

Более конкретно, антитело изобретения или его производные соединения или функциональные фрагменты характеризуются тем, что указанное производное  
5 соединение состоит из связывающего белка, содержащего пептидную матрицу, к которой привита по меньшей мере одна CDR для сохранения целиком или частично свойств паратопа исходного антитела по распознаванию.

На различных иммуноглобулиновых белковых матрицах может присутствовать одна или более последовательность из числа шести CDR-последовательностей, описанных  
10 в данном изобретении. В этом случае белковая матрица делает возможным воспроизведение белкового скелета с соответствующим сворачиванием привитых CDR, тем самым позволяя их паратопу сохранять свойства по распознаванию антигена.

Как правило, специалистам в данной области известно, как выбирать тип белковой матрицы, на которую можно привить по меньшей мере одну CDR, взятую из исходного  
15 антитела. Более конкретно, известно, что такие матрицы, чтобы быть выбранными, должны соответствовать максимальному количеству следующих критериев (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13,2000, 167-187):

- филогенетически хорошая сохранность;
  - известная трехмерная структура (например, с помощью кристаллографии, ЯМР-  
20 спектроскопии или любых других методик, известных специалистам в данной области);
  - малый размер;
  - отсутствие или наличие только в малой степени посттрансляционных модификаций;
- и/или
- легкость продукции, экспрессии и очистки.

Такая белковая матрица может быть структурой, выбранной среди:  
25 фибронектина, и предпочтительно десятого домена фибронектина III типа, липокалина, антикалина (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), белка Z, полученного из домена В белка A Staphylococcus aureus, тиоредоксина А или белков с повторяющимся мотивом, таким как «анкириновый повтор» (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-  
30 1705), «повтор Армадилла», «повтор, богатый лейцином» и «тетратрикопептидный повтор».

Также можно упомянуть матрицы, полученные из токсинов, таких как, например, токсины скорпионов, насекомых, растений, моллюсков и т.д., или белковых ингибиторов нейронной синтазы оксида азота (PIN).

В качестве неограничивающего примера таких гибридных конструкций можно  
35 отметить вставку CDR-H1 (тяжелая цепь) анти-CD4-антитела, а именно антитела 13B8.2, в одну из петель PIN; связывающие свойства полученного таким образом нового связывающего белка остаются похожими на связывающие свойства исходного антитела (Bes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). Чисто иллюстративно  
40 можно также упомянуть прививку CDR-H3 (тяжелая цепь) анти-лизоцим-VHH-антитела в петлю неокарциностаина (Nicaise et al., Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891).

Наконец, как упоминалось выше, такие пептидные матрицы могут содержать от одной до шести CDR из исходного антитела. Предпочтительно, но без каких-либо  
45 ограничений, специалист в данной области может выбрать по меньшей мере одну CDR из тяжелой цепи, которая, как известно, главным образом ответственна за специфичность антитела. Выбор одной или более релевантной CDR будет очевидным для специалиста в данной области, который также выберет подходящую из известных методик (Bes et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Таким образом, данное изобретение относится к антителу или его производным соединениям или функциональным фрагментам, характеризующимся тем, что пептидная матрица выбрана среди белков, которые обладают а) филогенетически хорошей сохранностью, б) надежной архитектурой, в) хорошо известной трехмерной организацией, г) малым размером и/или д) содержат области, которые можно модифицировать путем делеции и/или вставки без модификации свойств стабильности.

В соответствии с предпочтительным воплощением антитело изобретения или его производные соединения или функциональные фрагменты характеризуются тем, что указанная пептидная матрица выбрана среди i) матриц, полученных из фибронектина, предпочтительно десятого домена фибронектина III типа, липокалина, антикалина, белка Z, полученного из домена В белка A *Staphylococcus aureus*, тиоредоксина А или белков с повторяющимся мотивом, таким как «анкириновый повтор» (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), «повтор Армадилла», «повтор, богатый лейцином» и «тетратрикопептидный повтор», или iii) белковых ингибиторов нейронной синтазы оксида азота (PIN).

Другой аспект изобретения относится к функциональным фрагментам антитела, описанным выше.

Более конкретно, изобретение нацелено на антитело или его производные соединения или функциональные фрагменты, характеризующиеся тем, что указанный функциональный фрагмент выбран среди фрагментов Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv, scFv-Fc или димерных антител или любых фрагментов, время полужизни которых было увеличено, например пегилированных фрагментов.

Такие функциональные фрагменты антитела в соответствии с изобретением состоят, например, из фрагментов Fv, scFv (sc обозначает одну цепь), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc или димерных антител или любых фрагментов, время полужизни которых было увеличено путем химической модификации, такой как добавление полиалкиленгликоля, такого как полиэтиленгликоль (пегилирование) (пегилированные фрагменты называются Fv-ПЭГ, ScFv-ПЭГ, Fab-ПЭГ, F(ab')<sub>2</sub>-ПЭГ или Fab'-ПЭГ), либо путем включения в липосому; микросферу или PLGA (частицы на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот), при этом указанный фрагмент имеет по меньшей мере один характерный CDR изобретения, который способен проявлять в общем виде даже частичную активность антитела, из которого он взят.

Предпочтительно указанные функциональные фрагменты будут состоять из или включать частичную последовательность вариабельной тяжелой или легкой цепи антитела, из которого они получены, при этом указанная частичная последовательность должна быть достаточной, чтобы сохранить такую же специфичность связывания, как у антитела, из которого она получена, и достаточную аффинность, предпочтительно равную по меньшей мере 1/100, более предпочтительно по меньшей мере 1/10 аффинности антитела, из которого она получена.

Такой функциональный фрагмент будет содержать как минимум 5 аминокислот, предпочтительно 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 или 100 последовательных аминокислот из последовательности антитела, из которого он получен.

Предпочтительно этими функциональными фрагментами будут фрагменты типа Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), scFv-Fc или димерные антитела, которые в целом имеют такую же специфичность связывания, как и антитело, из которого они получены. В соответствии с данным изобретением фрагменты антитела изобретения могут быть получены из описанных выше антител такими способами, как расщепление ферментами, такими

как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных мостиков путем химического восстановления. Фрагменты антитела также могут быть получены с помощью методик генетической рекомбинации, также известных специалистам в данной области, или путем пептидного синтеза, например с помощью автоматических пептидных синтезаторов, например поставляемых компанией Applied Biosystems, и т.д.

Для большей ясности в таблице 3а ниже представлены различные аминокислотные последовательности, соответствующие антителу изобретения 224D10.

10

15

20

25

Антитело	Нумерация CDR	Тяжелая цепь	Легкая цепь	SEQ ID №	
224D10	Общая	CDR-H1		1	
		CDR-H2		2	
		CDR-H3		3	
			CDR-L1	4	
			CDR-L2	5	
			CDR-L3	6	
	IMGT	CDR-H1			7
		CDR-H2			2
		CDR-H3			8
			CDR-L1	4	
			CDR-L2	5	
			CDR-L3	6	
	Кабата	CDR-H1			9
		CDR-H2			10
CDR-H3				3	
		CDR-L1	11		
		CDR-L2	12		
		CDR-L3	6		
	М. переменный домен			13	
		М. переменный домен		14	

Для большей ясности в таблице 3б ниже представлены различные аминокислотные последовательности, соответствующие антителу изобретения 221С9.

30

35

40

Антитело	Нумерация CDR	Тяжелая цепь	Легкая цепь	SEQ ID №	
221С9	IMGT	CDR-H1		29	
		CDR-H2		30	
		CDR-H3		31	
			CDR-L1	32	
			CDR-L2	33	
			CDR-L3	34	
	Кабата	CDR-H1			35
		CDR-H2			36
		CDR-H3			37
			CDR-L1	38	
			CDR-L2	39	
			CDR-L3	34	
		М. переменный домен			40
			М. переменный домен		41

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к мышинной гибридоме, способной секретировать моноклональное антитело в соответствии с изобретением, в частности к гибридоме мышинного происхождения, зарегистрированной во Французской коллекции культур микроорганизмов (CNCM, Институт Пастера, Париж, Франция) 12 марта 2008 года под номером I-3949. Указанная гибридома была получена путем

слияния спленоцитов иммунизированных мышей BALB/c и клеток миеломной линии Sp2/O-Ag 14.

Моноклональное антитело, обозначаемое в данном документе как 22D10, или его производные соединения или функциональные фрагменты, характеризующиеся тем, что указанное антитело секретируется гибридомой, зарегистрированной в CNCM 12 марта 2008 года под номером I-3949, очевидно, является частью данного изобретения.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к мышинной гибридоме, способной секретировать моноклональное антитело в соответствии с изобретением, в частности к гибридоме мышинового происхождения, зарегистрированной во Французской коллекции культур микроорганизмов (CNCM, Институт Пастера, Париж, Франция) 14 января 2010 года под номером I-4273. Указанная гибридома была получена путем слияния спленоцитов иммунизированных мышей BALB/c и клеток миеломной линии Sp2/O-Ag 14.

Моноклональное антитело, обозначаемое в данном документе как 221C9, или его производные соединения или функциональные фрагменты, характеризующиеся тем, что указанное антитело секретируется гибридомой, зарегистрированной в CNCM 14 января 2010 года под номером I-4273, очевидно, является частью данного изобретения.

Новый аспект данного изобретения относится к выделенной нуклеиновой кислоте, характеризующейся тем, что она выбрана среди следующих нуклеиновых кислот:

а) нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, кодирующей антитело или его производное соединение или функциональный фрагмент в соответствии с изобретением;

б) нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID №№15-26 и 42-52, или последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичную последовательностям SEQ ID №№15-26 и 42-52 после оптимального выравнивания;

в) нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID №№27, 28, 53 и/или 54, или последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичную последовательностям SEQ ID №№27, 28, 53 и/или 54 после оптимального выравнивания;

г) РНК, соответствующих нуклеиновым кислотам, определенным в а), б) или в);

д) нуклеиновых кислот, комплементарных нуклеиновым кислотам, определенным в а), б) и в); и

е) нуклеиновой кислоты не менее 18 нуклеотидов, способной к гибридизации в условиях высокой жесткости по меньшей мере с одной CDR нуклеиновокислотных последовательностей SEQ ID №№15-28 или SEQ ID №№42-54, или последовательностей, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, 90%, 95% и 98% идентичных после оптимального выравнивания последовательностям SEQ ID №№15-28 и SEQ ID №№42-54, или последовательностей, комплементарных им.

Ниже в таблице 4а приведены различные нуклеотидные последовательности, касающиеся антитела изобретения 224D10.

Таблица 4а				
Антитело	Нумерация CDR	Тяжелая цепь	Легкая цепь	SEQ ID №
224D10	Общая	CDR-H1		15
		CDR-H2		16
		CDR-H3		17
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19

5	IMGT		CDR-L3	20
		CDR-H1		21
		CDR-H2		16
		CDR-H3		22
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
10	Кабата		CDR-L3	20
		CDR-H1		23
		CDR-H2		24
		CDR-H3		17
			CDR-L1	25
			CDR-L2	26
		М. переменный домен		27
			М. переменный домен	28

Ниже в таблице 4b приведены различные нуклеотидные последовательности, касающиеся антитела изобретения 221C9.

Таблица 4b					
Антитело	Нумерация CDR	Тяжелая цепь	Легкая цепь	SEQ ID №	
221C9	IMGT	CDR-H1		42	
		CDR-H2		43	
		CDR-H3		44	
			CDR-L1	45	
			CDR-L2	46	
			CDR-L3	47	
	Кабата	CDR-H1			48
		CDR-H2			49
		CDR-H3			50
			CDR-L1		51
			CDR-L2		52
			CDR-L3		47
		М. переменный домен			53
			М. переменный домен		54

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность», «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или область нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся, которая является либо двуцепочечной ДНК, либо одноцепочечной ДНК, либо продуктом транскрипции указанных ДНК.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать выделенные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например с помощью клеток-хозяев, или полученные путем химического синтеза.

Под «нуклеиновыми последовательностями, демонстрирующими процент идентичности по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98%, с

предпочтительной последовательностью после оптимального выравнивания» понимают нуклеиновые последовательности, демонстрирующие по сравнению с референсной нуклеиновой последовательностью определенные модификации, такие как, в частности, делецию, усечение, удлинение, химерное слияние и/или замещение, в частности, точечное.

5 Предпочтительно, это последовательности, которые кодируют те же самые аминокислотные последовательности, что и референсная последовательность, и связаны с вырождением генетического кода, или комплементарные последовательности, которые могут специфически гибридизироваться с референсными последовательностями, предпочтительно в условиях высокой жесткости, в частности таких, которые определены

10 ниже.

Гибридизация в условиях высокой жесткости означает, что температурные условия и условия ионной силы выбирают таким образом, чтобы они позволяли сохранять гибридизацию двух комплементарных фрагментов ДНК. Исключительно в качестве

15 примера, условия высокой жесткости этапа гибридизации для определения полинуклеотидных фрагментов, описанных выше, преимущественно являются следующими.

ДНК-ДНК- или ДНК-РНК-гибридизацию осуществляют в два этапа: (1) прегибридизация при 42°C в течение трех часов в фосфатном буфере (20 мМ, рН 7,5), содержащем 5x SSC (цитратно-солевой буфер) (1x SSC соответствует раствору 0,15 М

20 NaCl+0,015 М цитрата натрия), 50% формамида, 7% додецилсульфата натрия (SDS), 10x раствор Денхардта, 5% сульфата декстрана и 1% ДНК спермы лосося; (2) собственно гибридизация в течение 20 часов при температуре в зависимости от длины зонда (например: 42°C для зонда длиной более 100 нуклеотидов), а затем два 20-минутных промывания при температуре 20°C в 2x SSC+2% SDS, одно 20-минутное промывание

25 при 20°C в 0,1x SSC+0,1% SDS. Последнее промывание осуществляют в 0,1x SSC+0,1% SDS в течение 30 минут при температуре 60°C для зонда длиной более 100 нуклеотидов. Гибридизационные условия высокой жесткости, описанные выше для полинуклеотида определенного размера, специалист в данной области может адаптировать для олигонуклеотидов большей или меньшей длины в соответствии с процедурами,

30 описанными в Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

Изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, описанную в изобретении.

Изобретение особенно нацелено на клонирующие и/или экспрессионные векторы,

35 которые содержат такую нуклеотидную последовательность.

Векторы изобретения предпочтительно содержат элементы, которые позволяют экспрессировать и/или секретировать нуклеотидные последовательности в данной клетке-хозяине. Таким образом, вектор должен содержать промотор, сигналы инициации и терминации трансляции, а также подходящие участки регуляции транскрипции. Он

40 должен быть способен поддерживать в стабильном состоянии клетку-хозяина и дополнительно может иметь специфические сигналы, которые обуславливают секрецию транслированного белка. Специалисты в данной области выбирают и оптимизируют эти различные элементы в соответствии с используемой клеткой-хозяином. С этой целью нуклеотидные последовательности могут быть введены в векторах автономной

45 репликации в выбранного хозяина или могут быть интегративными векторами выбранного хозяина.

Такие векторы получают с помощью способов, использующихся в настоящее время специалистами в данной области, и полученные клоны могут быть введены в

подходящего хозяина с помощью стандартных способов, таких как липофекция, электропорация, тепловой шок или химические способы.

Векторы представляют собой, например, векторы плазмидного или вирусного происхождения. Они используются для трансформации клеток-хозяев, чтобы  
5 клонировать или экспрессировать нуклеотидные последовательности изобретения.

Изобретение также включает клетки-хозяева, трансформированные с помощью вектора, описанного в данном изобретении, или содержащие его.

Клетка-хозяин может быть выбрана из прокариотических или эукариотических систем, например бактериальных клеток, а также дрожжевых клеток или клеток  
10 животных, в частности клеток млекопитающих. Можно также использовать клетки насекомых или растений.

Изобретение также касается животных, за исключением человека, которые содержат по меньшей мере одну трансформированную клетку в соответствии с изобретением.

Другой аспект изобретения связан со способом продукции антитела в соответствии  
15 с изобретением или одного из его функциональных фрагментов, который характеризуется тем, что включает следующие этапы:

а) культивирование клетки-хозяина в соответствии с изобретением в среде в подходящих культуральных условиях; и

б) восстановление указанного антитела или одного из его функциональных  
20 фрагментов, полученных таким образом, из культуральной среды или указанных культивируемых клеток.

Трансформированные клетки в соответствии с изобретением могут быть использованы в способах получения рекомбинантных полипептидов в соответствии с изобретением. Способы получения полипептида в соответствии с изобретением в  
25 рекомбинантной форме, характеризующиеся использованием вектора и/или клетки, трансформированной вектором в соответствии с изобретением, также входят в данное изобретение. Предпочтительно клетку, трансформированную вектором в соответствии с изобретением, культивируют в условиях, которые позволяют экспрессировать указанный полипептид, и указанный рекомбинантный пептид восстанавливают.

Как уже было сказано, клетка-хозяин может быть выбрана из прокариотических или эукариотических систем. В частности, можно определить нуклеотидные последовательности изобретения, содействующие секреции в такой прокариотической или эукариотической системе. Вектор в соответствии с изобретением, несущий такую последовательность, таким образом, может быть выгодно использован для продукции  
35 рекомбинантных белков, предназначенных для секреции. Действительно, очистке этих целевых рекомбинантных белков будет способствовать тот факт, что они находятся в супернатанте клеточной культуры, а не внутри клеток-хозяев.

Также можно получить полипептиды изобретения путем химического синтеза. Такой способ получения также является предметом изобретения. Специалисту в данной области известны способы химического синтеза, например методики с использованием твердых фаз [см. Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)] или методики с использованием частично твердых фаз, путем конденсации фрагментов или путем классического синтеза в растворе. Полипептиды, полученные путем химического синтеза и способные содержать соответствующие  
45 неприродные аминокислоты, также входят в изобретение. Антитела или их производные соединения или функциональные фрагменты, скорее всего полученные способом изобретения, также включены в данное изобретение.

Также раскрыто применение антитела изобретения в качестве биомаркера. Способы

могут быть использованы для обнаружения и диагностики различных гиперпролиферативных онкогенных расстройств, связанных с экспрессией cMet, например, но не ограничиваясь ими, рака предстательной железы, остеосарком, рака легкого, рака молочной железы, рака эндометрия, глиобластомы, рака толстой кишки, рака желудка, рака почек или каких-либо других рака, связанного с экспрессией cMet. Как будет понятно специалисту в данной области, уровень экспрессии антитела, связанный с определенным расстройством, будет варьировать в зависимости от характера и/или тяжести уже существующего состояния.

Введение антител данного изобретения любым из стандартных способов, известных специалистам в данной области (например, местно, парентерально, внутримышечно и т.д.), дает чрезвычайно полезный способ обнаружения диспластических клеток в образце, а также позволяет врачу контролировать терапевтический режим пациента, проходящего лечение от гиперпролиферативного расстройства, связанного или опосредованного экспрессией cMet.

В другом воплощении изобретение относится к фармацевтической композиции для отображения *in vivo* онкогенного расстройства, связанного с экспрессией cMet, которая содержит описанное выше моноклональное антитело или его фрагмент, который помечен и который связывает cMet *in vivo*, а также фармацевтически приемлемый носитель.

Антитело изобретения или его функциональный фрагмент или производное найдут применение в различных медицинских и научных целях, включая выявление, диагностику и установление стадии различных патологий, связанных с экспрессией cMet.

Определение стадии имеет потенциальное прогностическое значение и обеспечивает критерии для проектирования оптимальной терапии. Simpson et al., J. Clin. Oncology 18: 2059 (2000). Как правило, определение патологической стадии, например, рака молочной железы, является более предпочтительным, чем определение клинической стадии, потому что первое дает более точный прогноз. Тем не менее, определение клинической стадии было бы предпочтительнее, если бы оно было таким же точным, как определение патологической стадии, потому что оно не зависит от инвазивных процедур для получения ткани для патологической оценки.

При использовании с соответствующими метками или другими соответствующими выявляемыми биомолекулами или химическими веществами, антитело данного изобретения является особенно полезным для диагностического и прогностического применения *in vitro* и *in vivo*.

Метки для применения в иммунологических анализах, как правило, известны специалистам в данной области и включают ферменты, радиоизотопы и флуоресцентные, люминесцентные и хромогенные вещества, в том числе окрашенные частицы, такие как коллоидное золото или латексные шарики. Подходящие иммунологические анализы включают иммуноферментный анализ (ИФА). Специалистам в данной области хорошо известны различные типы меток и способы конъюгации меток с антителами изобретения, такие как те, которые изложены ниже.

Используемый в данном документе термин «онкогенное расстройство, связанное с экспрессией cMet» предназначен для включения заболеваний и других расстройств, при которых было показано или подозревалось, что наличие высокого уровня или аномально низкого уровня cMet (отклонения) у субъекта, страдающего от расстройства, несет ответственность за патофизиологию расстройства или является фактором, который вносит свой вклад в ухудшение расстройства. Кроме того, такие расстройства могут быть подтверждены, например, увеличением уровня cMet на поверхности клетки или

увеличением аутофосфорилирования тирозина cMet в пораженных клетках и тканях субъекта, страдающего от расстройства. Увеличение уровней cMet может быть обнаружено, например, с помощью антитела 224D10 изобретения. Более того, оно относится к клеткам, которые демонстрируют относительно автономный рост, так что  
5 они обладают фенотипом аномального роста, который характеризуется значительной потерей контроля клеточной пролиферации. Кроме того, клетки могут экспрессировать нормальные уровни cMet, но отличаются ненормальной пролиферацией.

В некоторых воплощениях понятие «повышенная экспрессия», когда оно используется по отношению к cMet, относится к уровням экспрессии белка или гена, которые  
10 демонстрируют статистически значимое увеличение экспрессий (по измерению экспрессии РНК или экспрессии белка) по сравнению с контролем.

Более конкретно, рассматривается применение антитела или его функционального фрагмента или производного в соответствии с описанием в изобретении для диагностики  
15 *in vitro* онкогенного расстройства, связанного с экспрессией cMet, или для определения *in vitro* прогноза развития онкогенного расстройства, связанного с экспрессией cMet, например рака, связанного с экспрессией cMet.

Другой широкий аспект в соответствии с изобретением относится к способу диагностики патологического гиперпролиферативного онкогенного расстройства или  
20 предрасположенности к патологическому состоянию, связанному с экспрессией cMet у субъекта, который включает определение наличия или отсутствия cMet-несущих клеток в образце и диагностику патологического состояния или предрасположенности к патологическому состоянию в зависимости от наличия или отсутствия указанных cMet-несущих клеток. Диагностические применения антитела изобретения включают  
25 первичные опухоли, раковые метастазы. Антитело может быть представлено в виде иммуноконъюгата или меченого антитела, чтобы получить сигнал, который можно обнаружить и/или количественно оценить.

Более конкретно, предпочтительным предметом в соответствии с изобретением является способ определения присутствия *in vitro* и/или расположения cMet-экспрессирующей опухоли у субъекта, который включает этапы (а) контактирования  
30 образца от субъекта с антителом или его функциональным фрагментом или производным в соответствии с изобретением, и (б) выявления связывания указанного антитела с образцом. Другим аспектом предмета является контроль экспрессии cMet как ответ на cMet-нацеленную терапию во время клинических испытаний, и, в частности, когда подавление и/или разрушение cMet-рецептора является одним из компонентов механизма  
35 действия тестируемого соединения.

Как будет ясно специалисту в данной области, выявление связывания антитела изобретения может быть проведено с помощью различных анализов. Хотя любые средства для проведения анализов совместимы с изобретением, можно отметить, в качестве примеров, FACS, ELISA (ИФА) или ИНС.

Используемый в данном документе термин «образец» обозначает любую биологическую жидкость, клетку, ткань, орган или его часть, которая включает или  
40 потенциально включает неопластическую клетку, такую как клетка из толстой кишки, желудка, прямой кишки, молочной железы, яичника, предстательной железы, почки, легкого, крови, мозга или другого органа или ткани, содержащей или предположительно содержащей неопластическую клетку. Этот термин включает образцы, присутствующие у индивидуума, а также образцы, полученные от индивидуума. Например, образец может быть гистологическим срезом препарата, полученного при биопсии, или клетками, которые находятся или адаптированы к культуре ткани. Образец также может быть

субклеточной фракцией или экстрактом, или сырьевой или существенно чистой нуклеиновокислотной молекулой, или белковым препаратом.

Клинический пример предназначен для охвата различных типов образцов, полученных от субъекта и используемых в процедуре изобретения, такой как, например, 5 диагностический или мониторинговый анализ по определению или обнаружению уровней экспрессии cMet. Определение охватывает твердые образцы тканей, полученные при хирургическом удалении, патологический препарат, сохраненный образец или препарат после биопсии, культуры тканей или клетки, полученные от него, и их потомство, и срезы или мазки, изготовленные из любого из этих источников.

10 Неограничивающими примерами являются образцы, полученные из тканей молочной железы, лимфатических узлов, кишечника, поджелудочной железы, предстательной железы и т.д. Это определение также включает жидкие образцы биологического происхождения, а также может относиться к клеткам или клеточным фрагментам, суспендированным в них, или к жидкой среде и их растворам.

15 Другой аспект в соответствии с изобретением относится к способу определения *in vitro* уровня экспрессии cMet в cMet-экспрессирующей опухоли от субъекта, включающему этапы (а') контактирования образца от субъекта с антителом или его функциональным фрагментом или производным в соответствии с изобретением, и (б') 20 количественной оценки уровня связывания антитела с cMet в указанном образце.

20 Как будет ясно специалистам, уровень связывания антитела с cMet можно измерить рядом способов, таких как различные анализы. Хотя любые средства для проведения анализов совместимы с изобретением, предпочтительный способ включает иммуноферментные способы в соответствии с методикой ИФА, с помощью методик 25 иммунофлуоресценции, иммуногистохимии или радиоиммуноферментного анализа (РИА) или эквивалентных им.

Предпочтительно, биологический образец сформирован из биологической жидкости, такой как сыворотка, цельной крови, клеток, тканей или образцов биопсии человеческого происхождения. Образец может включать, например, биопсированную ткань, которую 30 можно легко проанализировать на наличие патологического гиперпролиферативного онкогенного расстройства, связанного с экспрессией cMet.

После того, как производится определение количества cMet, присутствующего в анализируемом образце, результаты могут быть сопоставлены с данными контрольных образцов, которые получают образом, сходным с анализируемыми образцами, но от 35 людей без гиперпролиферативного онкогенного расстройства, связанного с экспрессией cMet. Если уровень cMet значительно повышен в исследуемом образце, можно сделать вывод, что существует повышенная вероятность, что у субъекта, от которого он был получен, есть или будет развиваться указанное расстройство.

Изобретение относится, в частности, к способу диагностики *in vitro* cMet-экспрессирующей опухоли или определению *in vitro* прогноза развития cMet- 40 экспрессирующей опухоли у субъекта, где указанный способ включает этапы (i) определения уровня экспрессии cMet, как описано выше, и (ii) сравнения уровня экспрессии этапа (i) с референсным уровнем экспрессии cMet в нормальной ткани или в ткани, не экспрессирующей cMet.

Понятие «диагностика» заболевания, используемое в заявке, включает, например, 45 диагностику или определение наличия патологического гиперпролиферативного онкогенного расстройства, связанного или опосредованного экспрессией cMet, мониторинг прогрессирования заболевания, а также выявление или обнаружение клеток или образцов, которые указывают на расстройство, связанное с экспрессией cMet.

Понятие «прогноз», используемое в данной заявке, означает вероятность выздоровления от заболевания или предсказание вероятного развития или исхода заболевания. Например, если образец от субъекта положителен при окрашивании антителом изобретения, то «прогноз» для этого субъекта лучше, чем если бы образец  
5 был отрицательным при сMet-окрашивании. Образцы можно оценить по уровню экспрессии сMet в соответствующем масштабе, как это будет более подробно описано далее.

Тем не менее, другой аспект изобретения также относится к мониторингу экспрессии сMet для терапевтических соединений, которые вызывают деградацию сMet как один  
10 из механизмов действия. В этом случае последующая экспрессия сMet на клеточной мембране может быть важным инструментом для оценки эффективности лечения во время клинических испытаний и «персонализированной» терапии.

Уровень экспрессии сMet предпочтительно сравнивают или измеряют в сравнении с уровнями в контрольной клетке или образце, которые также называют «референсным  
15 уровнем» или «референсным уровнем экспрессии». Понятия «референсный уровень», «референсный уровень экспрессии», «контрольный уровень» и «контроль» используются взаимозаменяемо в данном описании. В широком смысле «контрольный уровень» означает отдельный исходный уровень, измеряемый в сопоставимой контрольной  
20 клетке, которая, как правило, свободна от заболевания или рака. Она может быть взята у того же или у другого индивидуума, который является нормальным или не страдает от того заболевания, которым болен индивидуум, от которого получен образец. В контексте данного изобретения термин «референсный уровень» относится к  
«контрольному уровню» экспрессии сMet, используемому для оценки тестируемого  
25 уровня экспрессии сMet в образце пациента, содержащем раковую клетку. Например, когда уровень сMet в биологическом образце пациента выше, чем референсный уровень сMet, будет считаться, что клетки имеют высокий уровень экспрессии, или сверхэкспрессию, сMet. Референсный уровень может быть определен с помощью ряда  
способов. Уровни экспрессии, таким образом, могут определять клетки, несущие сMet, или же, альтернативно, уровень экспрессии сMet не зависит от числа клеток,  
30 экспрессирующих сMet. Таким образом, референсный уровень для каждого пациента может быть установлен по референсному соотношению сMet, которое может быть определено любым из способов определения референсных уровней, описанных в данном документе.

Например, контроль может быть заданной величиной, которая может принимать  
35 различные формы. Это может быть одно пороговое значение, такое как медиана или среднее значение. «Референсный уровень» может быть одним номером, в равной степени применимым к каждому пациенту индивидуально, или референсный уровень может варьировать в зависимости от конкретной субпопуляции пациентов. Таким образом, например, пожилые люди могут иметь референсный уровень, отличающийся от уровня  
40 у молодых людей с таким же раком, и женщины могут иметь референсный уровень, отличающийся от уровня у мужчин с таким же раком. Кроме того, «референсный уровень» может быть определен путем измерения уровня экспрессии сMet в неонкогенных раковых клетках из той же ткани, что и тестируемые неопластические  
клетки. Кроме того, «референсный уровень» может быть определенным соотношением  
45 уровня сMet в неопластических клетках пациента к уровню сMet в неопухолевых клетках от того же пациента. «Референсный уровень» также может быть уровнем сMet in vitro в культуре клеток, которым можно управлять, чтобы стимулировать опухолевые клетки, или можно управлять каким-либо другим образом, который дает уровни экспрессии,

которые точно определяют референсный уровень. С другой стороны, «референсный уровень» может быть установлен на основании сравнительных групп, например таких, как группы без повышения уровня cMet и группы с повышенным уровнем cMet. Другим примером сравнительных групп могут быть группы с конкретным заболеванием, состоянием или симптомами и группы без заболевания. Заданное значение может быть упорядочено, например, когда тестируемую популяцию делят поровну (или неравномерно) на группы, такие как группа с низким риском, группа со средним риском и группа с высоким риском, или на квадранты или квинтили, при этом самые низкие квадранты или квинтили представляют собой людей с минимальным риском или наибольшим количеством cMet, а высокие квадранты или квинтили представляют собой людей с максимальным риском или минимальным количеством cMet.

Референсный уровень можно определить путем сравнения уровня cMet в популяциях пациентов с одним и тем же раком. Этого можно достигнуть, например, путем анализа гистограммы, в котором вся когорта пациентов представлена графически, где первая ось представляет уровень cMet, а вторая ось представляет число пациентов в когорте, у которых опухолевые клетки экспрессируют cMet на данном уровне. Две или более отдельные группы пациентов могут быть определены путем идентификации подмножеств популяций когорты, которые имеют одинаковые или схожие уровни cMet. Определение референсного уровня может быть сделано на основе уровня, который сильнее всего отличает эти отдельные группы. Референсный уровень также может представлять уровни двух или более маркеров, одним из которых является cMet. Два или более маркера могут быть представлены, например, соотношением значений для уровней каждого маркера.

Кроме того, по-видимому, здоровая популяция будет иметь «нормальный» диапазон, отличный от того, которое имеет популяция, о которой известно, что она имеет состояние, связанное с экспрессией cMet. Таким образом, выбранное заданное значение может привлечь внимание категорию, в которую попадает человек. Соответствующие диапазоны и категории специалист в данной области сможет выбрать с помощью не более чем обычных экспериментов. Под «повышенным», «увеличенным» понимается высокий относительно выбранного контроля. Как правило, контроль будет основан на предположительно здоровых нормальных индивидуумах соответствующей возрастной группы.

Также необходимо понимать, что контролями в соответствии с изобретением могут быть, в дополнение к заданным величинам, образцы материалов, тестируемые в параллелях с экспериментальными материалами. Примеры включают ткани или клетки, полученные в то же самое время от того же самого субъекта, например, части одного биоптата или части одного образца клеток субъекта.

В клинической диагностике или мониторинге пациентов с cMet-опосредованными заболеваниями выявление cMet-экспрессирующих клеток или увеличения уровней cMet по сравнению с уровнями в соответствующем биологическом образце от нормального субъекта или нераковой ткани, как правило, свидетельствует, что пациент имеет или подвержен риску развития cMet-опосредованного расстройства.

В соответствии с вышеизложенным, изобретение предусматривает способ прогнозирования восприимчивости к раку, включающий определение уровня экспрессии cMet в образце ткани, при этом его наличие указывает на восприимчивость к раку, где степень экспрессии cMet коррелирует со степенью восприимчивости. Таким образом, в конкретных воплощениях рассматривается экспрессия cMet, например, в ткани предстательной железы, ткани остеосаркомы, легочной ткани, ткани поджелудочной

железы, ткани толстой кишки, ткани молочной железы, ткани глиобластомы, ткани яичника или любой другой ткани, в которой предполагается наличие клеток, экспрессирующих сMet, при этом присутствие сMet в образце предусматривает указание восприимчивости к раку или возникновение или существование тканеспецифической опухоли.

Также предусматривается способ оценки агрессивности опухоли. В одном воплощении способ наблюдения за прогрессированием злокачественной опухоли у индивидуума с течением времени включает определение уровня сMet, экспрессируемого клетками в образце опухоли, сравнение уровня, определенного таким образом, с уровнем сMet, экспрессированного в эквивалентном образце ткани, взятом от того же индивидуума в другое время, где степень экспрессии сMet в образце опухоли с течением времени предоставляет информацию о прогрессировании рака.

В еще одном воплощении заявка предусматривает способы определения соответствующего терапевтического протокола для субъекта. В частности, антитела изобретения будут очень полезны для мониторинга улучшения злокачественных опухолей человека, особенно в тех случаях, когда субъект находится на лечении сMet-антителом, которое не конкурирует с антителами изобретения в связывании сMet. Наличие или отсутствие или изменение уровня сMet в соответствии с данным изобретением может свидетельствовать о том, что субъект, по-видимому, имеет рецидив или прогрессию или постоянный рак, связанный с сMet. Таким образом, измеряя увеличение числа клеток, экспрессирующих сMet, или изменение концентрации сMet, присутствующего в различных тканях или клетках, можно определить, является ли эффективным конкретный терапевтический режим, направленный на улучшение злокачественности, связанной с сMet.

Другим предметом изобретения является *in vivo* способ визуализации онкогенного расстройства, связанного с экспрессией сMet. Например, такой способ может быть использован на пациентах с симптомами онкогенного расстройства. Например, если пациент имеет повышенный уровень экспрессии сMet, то он, скорее всего, страдает от ракового расстройства. Кроме того, способ может использоваться для мониторинга прогрессирования и/или реакции на лечение у пациентов, которым ранее был диагностирован рак, опосредованный сMet. В соответствии с указанной выше целью изобретения предусматривает реагент для визуализации *in vivo*, включающий антитело изобретения или его функциональный фрагмент или производное, предпочтительно меченое, особенно меченное радиоактивным изотопом, и его применение в медицинской визуализации. Таким образом, общий способ в соответствии с изобретением работает путем введения пациенту эффективного для визуализации количества реагента для визуализации, такого как описанное выше моноклональное антитело, которое помечено, и фармацевтически эффективного носителя, а затем обнаружение агента после того, как она связался с сMet, присутствующим в образце. В некоторых воплощениях способ работает путем введения эффективного для визуализации количества реагента для визуализации, содержащего целевую часть и активную часть. Агент для визуализации вводят в количестве, достаточном для диагностики у млекопитающего, такого как человек, и определяют локализацию и накопление агента для визуализации. Локализацию и накопление агента для визуализации можно обнаружить путем радионуклидной визуализации, радиосцинтиграфии, ядерной магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии, позитронно-эмиссионной томографии, компьютерной осевой томографии, рентгена или магнитно-резонансной томографии, флуоресцентного обнаружения и хемилюминесцентного обнаружения.

Что касается разработки целевой противоопухолевой терапии, диагностика с помощью иммуногистохимических методик дает *in situ* информацию об уровне экспрессии рецепторов и, тем самым, позволяет выбрать пациентов, восприимчивых к лечению в соответствии с уровнем экспрессии рецепторов, необходимым для такого

5

лечения. При иммунотерапии с использованием моноклональных антител, таких как трастузумаб, реакция на лечение зависит от уровня экспрессии целевого рецептора, поэтому в настоящее время, с появлением гуманизованного анти-Her2 моноклонального антитела трастузумаба, определение сверхэкспрессии Her2 в карциноме молочной железы имеет большую клиническую значимость. Демонстрация сверхэкспрессии Her2 является необходимым условием для лечения трастузумабом, так как он действует путем специфического влияния на клетки карциномы со сверхэкспрессией Her2. Точное тестирование на Her2 нужно для того, чтобы дорогостоящее и потенциально токсичное лечение трастузумабом не было назначено

10

15

пациентам с опухолями без сверхэкспрессии, и чтобы каждый пациент, которому может быть полезно лечение трастузумабом, получил соответствующее лечение. Работы с трастузумабом, касающиеся выбора пациентов со сверхэкспрессией Her2, показали пользу определения уровня экспрессии рецептора при применении терапии моноклональным антителом и, в то же время, разработки моноклонального антитела,

20

которое может быть использовано для отбора пациентов. Как следствие, изобретение относится к способу определения *in vitro* cMet-статуса опухоли у субъекта, где указанный способ включает этапы (1) определения уровня экспрессии cMet, как описано выше, (2) оценки указанной опухоли по уровню экспрессии cMet, и (3) сравнение указанной оценки с оценкой, полученной для контрольного

25

образца. Понятие «cMet-статус» в контексте изобретения относится к классификации опухоли на cMet-положительный [cMet(+)] или cMet-отрицательный [cMet(-)] классы на основании определения уровня экспрессии гена cMet, измеренного любыми способами, такими как иммуногистохимия (ИНС), флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), колориметрическая гибридизация *in situ* (CISH), генный чип или другие способы, известные специалистам в данной области.

30

В предпочтительном воплощении антитело для диагностики должно быть в состоянии связать целевой рецептор, когда образцы ткани фиксированы формалином и залиты парафином.

35

Более конкретно, уровень экспрессии cMet измеряется путем иммуногистохимии (ИНС).

В качестве примера, в образцах можно оценить уровень экспрессии cMet по шкале от 0 до 3<sup>+</sup> для уровней окрашивания антитела, где 0 является отрицательным, а 1<sup>+</sup>-3<sup>+</sup> представляют положительное окрашивание по четырем полуколичественным стадиям

40

увеличивающейся интенсивности. Оценки 1<sup>+</sup>-3<sup>+</sup> можно рассматривать как положительные, потому что каждая положительная оценка может быть связана со значительно сниженным риском развития рецидива и смертельного заболевания по сравнению с оценкой 0 (отрицательный), но увеличение интенсивности в положительных оценках может привести к дополнительному снижению риска. Для оценки прогностического значения cMet может быть использован любой традиционный способ анализа риска. Репрезентативные способы анализа включают анализ регрессии Кокса, который является полупараметрическим способом моделирования выживания или времени до момента наступления определенного события в цензурированных случаях

45

(Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972). В отличие от других анализов выживания, например, Life Tables или Каплана-Мейера, анализ Кокса позволяет включать в модели независимые переменные (ковариаты). Используя способ анализа конвенции, например анализ Кокса, можно проверить гипотезы о корреляции статуса экспрессии cMet в  
5 первичной опухоли с временем до начала рецидива заболевания (безрецидивная выживаемость, или время до метастазирования) или с временем до смерти по причине этого заболевания (общая выживаемость). Регрессионный анализ Кокса также известен как анализ пропорциональных рисков Кокса. Этот способ является стандартным для  
10 проверки прогностического значения опухолевого маркера на продолжительность жизни пациента. При использовании в многомерном режиме влияние нескольких ковариат оценивают в параллелях, так что можно идентифицировать отдельные ковариаты, которые имеют независимое прогностическое значение, т.е. самые полезные маркеры. Термин «положительный или отрицательный cMet-статус» [также называемый cMet(+) или cMet(-)] опухолей относится к оценке 0 или оценке 1<sup>+</sup>-3<sup>+</sup> соответственно.

15 Образец может быть «подсчитан» во время диагностики или мониторинга рака, такого как, например, рак молочной железы. В своей простейшей форме подсчет может быть категорически отрицательным или положительным, если судить путем визуального осмотра образцов при иммуногистохимии. Более количественный подсчет подразумевает  
20 оценку по двум параметрам, интенсивность окрашивания и доля окрашенных («положительных») клеток в образце. На основании этих двух параметров могут быть заданы значения, которые отражают повышенные уровни положительного окрашивания. Allred et al. (Allred, Harvey et al. 1998) описали один способ достижения этого, который включает подсчет обоих параметров по шкале от 0 (отрицательный)  
25 до 3<sup>+</sup> и суммирование подсчета отдельных параметров в общий результат. Эти результаты находятся на шкале с возможными значениями 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. (Заметим, что значение 1 невозможно по шкале Оллреда). Несколько более простой способ подсчета объединяет интенсивность ядерного окрашивания и долю клеток,  
30 которые демонстрируют окрашенные ядра в комбинированной шкале от 0 до 3<sup>+</sup>. Любой способ подсчета может быть применен к подсчету интенсивности и доли окрашивания активированных Stat5 в клеточных ядрах. Термины «положительный или отрицательный cMet-статус» опухолей, используемые в данном описании, относятся к уровням экспрессии cMet, которые соответствуют значениям 0 или 1<sup>+</sup>-3<sup>+</sup> по упрощенной шкале,  
соответственно.

35 Как правило, результаты теста или анализа в соответствии с изобретением могут быть представлены в любом из множества форматов. Результаты могут быть представлены в качественном режиме. Например, протокол испытания может указывать только, был ли обнаружен конкретный полипептид, возможно, также с указанием  
40 пределов обнаружения. Результаты могут быть представлены в полуколичественном режиме. Например, могут быть определены различные диапазоны, и диапазоны могут быть обозначены значениями (например, от 1<sup>+</sup> до 3<sup>+</sup>, что обеспечивает определенную степень количественной информации. Такое значение может отражать различные факторы, например, число клеток, в которых обнаружен cMet, интенсивность сигнала  
45 (которая может указывать на уровень экспрессии cMet или cMet-несущих клеток) и т.д. Полученные результаты могут быть представлены в количественном виде, например, как процент клеток, в которых определяется полипептид (cMet), как концентрация белка и т.д. Специалист в данной области примет во внимание, что тип вывода, произведенной с помощью теста, будет меняться в зависимости от технических

ограничений теста и биологического значения, связанного с обнаружением полипептида. Например, в случае некоторых полипептидов чисто качественный вывод (например, обнаружен ли полипептид на определенном уровне обнаружения) предоставляет важную информацию. В других случаях необходимым является более количественный вывод (например, соотношение уровня экспрессии полипептида в тестируемом образце и нормального уровня).

В более предпочтительном воплощении подсчет уровня экспрессии сMet оценивается от 0 до 3 на основании оценки интенсивности продукта реакции и процента положительных клеток. Для большей ясности, далее в таблице 5 приведены эти параметры. Следует рассматривать только полную тангенциальную мембранную реактивность инвазивной опухоли, которая часто напоминает вид «проволочной сетки». В соответствии с действующими руководящими принципами образцы, оцененные как пограничные (оценка 2<sup>+</sup> и более) при сMet ИНС, должны рассматриваться как сMet(+) и должны пройти дополнительную оценку. Анализ ИНС следует отвергнуть и либо повторить, либо подтвердить с помощью FISH или любого другого способа, если, в качестве не ограничивающего примера, контроли не такие, как ожидалось, артефакты включены в большую часть образца, и образец имеет сильную мембранную положительность нормальных протоков молочной железы (внутренний контроль), предполагая чрезмерный поиска антигена.

Таблица 5

Ста-тус сMet	Описание в ИНС
0	Отсутствие реактивности или мембранная реактивность у менее 10% опухолевых клеток
1 <sup>+</sup>	Слабая/едва заметная мембранная реактивность обнаружена в более чем 10% опухолевых клеток. Клетки иммунореактивные только в части мембраны.
2 <sup>+</sup>	Слабая и средняя полная мембранная реактивность проявляется в более чем 10% опухолевых клеток.
3 <sup>+</sup>	Сильная полная реактивность проявляется в более чем 10% опухолевых клеток.

В более предпочтительном воплощении способа в соответствии с изобретением указанный подсчет включает применение соответствующей шкалы на основании двух параметров, которыми являются интенсивность окрашивания и процент положительных клеток.

В предпочтительном воплощении способ в соответствии с изобретением относится к соответствующей шкале от 0 до 3<sup>+</sup>, где отсутствие мембранной реактивности опухолевых клеток оценивается как 0, и сильная полная реактивность в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 3<sup>+</sup>.

Более подробно, как описано выше, указанная соответствующая шкала представляет собой шкалу от 0 до 3, где отсутствие мембранной реактивности опухолевых клеток оценивается как 0; слабо заметная мембранная реактивность в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 1<sup>+</sup>; полная мембранная реактивность от слабой до умеренной в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 2<sup>+</sup>; и сильная полная реактивность в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 3<sup>+</sup>.

В конкретном аспекте изобретения опухоль является сMet(+) с оценкой 2<sup>+</sup>.

В конкретном аспекте изобретения опухоль является сMet(+) с оценкой 3<sup>+</sup>.

В другом конкретном аспекте изобретения опухоль является сMet(+) с оценкой 2<sup>+</sup> или 3<sup>+</sup>.

В соответствии с изобретением также описан способ определения того, поддается ли онкогенное расстройство лечению с помощью анти-сMet-антитела или его фрагмента или его производного, где указанный способ включает следующие этапы: (а) определение *in vitro* сMet-статуса опухоли субъекта, как описано выше, и (б) если статус сMet(+),  
5 определение того, поддается ли онкогенное расстройство лечению с помощью анти-сMet-антитела или его фрагмента или его производного.

В другом аспекте изобретения предложен набор, используемый для такого способа диагностики или прогнозирования, который включает антитело изобретения.

Для удобства в рамки данного изобретения также входит упакованная комбинация  
10 реагентов в заданных количествах с инструкциями для проведения диагностического анализа, т.е. набор (кит, комплект). Набор содержит антитело для обнаружения и количественной оценки сMet *in vitro*, например, в ИФА или вестерн-блоттинге. Антитело данного изобретения может быть представлено в наборе для обнаружения и  
15 количественной оценки сMet *in vitro*, например, в ИФА или вестерн-блоттинге. Если антитело мечено ферментом, в набор будут включены субстраты и кофакторы, необходимые ферментам (например, субстрат-предшественник, который обеспечивает обнаружение хромофора или флуорофора). Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизисный буфер) и т.п. Такой набор может включать коробку, которая разделена на  
20 отсеки и содержит один или более контейнер, такой как флакон, пробирку и т.п., и в таких контейнерах содержатся отдельные элементы изобретения. Например, один контейнер может содержать первое антитело, связанное с нерастворимым или частично растворимым носителем. Второй контейнер может содержать растворимое, меченное для обнаружения второе антитело в лиофилизированной форме или в растворе. Коробка  
25 может включать третий контейнер, содержащий меченное для обнаружения третье антитело в лиофилизированной форме или в растворе. Набор такого рода может быть использован в сэндвич-анализе изобретения. Этикетка или вкладыш могут давать описание композиции, а также инструкции по применению *in vitro* или для диагностики.

Относительные количества различных реагентов могут широко меняться для создания  
30 в растворе концентраций реагентов, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть предоставлены как сухие порошки, как правило, лиофилизированные, включая эксципиенты, которые при растворении дадут раствор реагента с соответствующей концентрацией.

Еще в одном аспекте изобретения моноклональные антитела или их связывающие  
35 фрагменты, подробно описанные в данном документе, помечены выявляемой группировкой, так что они могут быть упакованы и использованы, например, в наборах для диагностики или выявления клеток с вышеупомянутым антигеном.

Неограничивающие примеры таких меток включают флуорофоры, такие как изотиоцианат флуоресцеина, хромофоры, радионуклиды или ферменты. Такие меченые  
40 антитела или связывающие фрагменты могут быть использованы для гистологической локализации антигена, ИФА, сортировки клеток, а также для других иммунологических методик обнаружения и количественной оценки сMet и клеток, несущих этот антиген, например.

Также предложены наборы, которые используются в качестве положительного  
45 контроля для анализа апоптоза, для очистки или иммунопреципитации сMet из клеток. Для выделения и очистки сMet набор может содержать антитела, описанные в данном документе, или их антиген-связывающие фрагменты, связанные с бусинами (например, сефарозными бусинами). Могут быть предложены наборы, содержащие антитела для

обнаружения и количественной оценки cMet *in vitro*, например, в ИФА или вестерн-блоттинге. В соответствии с инструкциями изготовителя набор включает контейнер и этикетку или вкладыш, вложенный или связанный с контейнером. Контейнер содержит композицию, включающую по меньшей мере одно анти-cMet-антитело изобретения или его связывающий фрагмент. Могут быть включены дополнительные контейнеры, которые содержат, например, растворители и буферы, контрольные антитела. Этикетка или вкладыш могут давать описание композиции, а также инструкции по применению *in vitro* или для диагностики.

В частности, изобретение относится к набору для определения cMet-статуса опухоли любым способом, известным специалисту в данной области. В предпочтительном воплощении, как будет описано в примере, изобретение относится к набору для определения cMet-статуса опухоли способами ИНС.

В конкретном воплощении изобретение состоит из набора, включающего по меньшей мере анти-cMet-антитело или его функциональный фрагмент или производное, как выше описано, при этом указанное антитело предпочтительно мечено.

Следует понимать, что специалист в данной области может использовать любой способ мечения, такой как, например, применение меток, описанных выше.

В предпочтительном воплощении набор в соответствии с изобретением, используемый для выявления *in vitro* наличия и/или локализации cMet-экспрессирующей опухоли у субъекта, также содержит реагент, используемый для определения степени связывания указанного анти-cMet антитела и cMet.

В другом предпочтительном воплощении набор изобретения, используемый для выявления *in vitro* уровня экспрессии cMet в cMet-экспрессирующей опухоли, также содержит реагент, используемый для количественной оценки степени связывания указанного меченого антитела и cMet.

В еще одном воплощении набор в соответствии с изобретением, используемый для определения *in vitro* cMet-статуса опухоли, также содержит:

- i) реагент, используемый для определения степени связывания указанного меченого антитела и cMet; и
- ii) положительные и отрицательные контрольные образцы, используемые для оценки уровня экспрессии cMet.

Указанный набор для определения *in vitro* cMet-статуса опухоли может также содержать поликлональное антитело, специфичное для мышинных антител, при этом предпочтительно указанное поликлональное антитело, специфичное к мышинным антителам, является меченым.

Другие характеристики и преимущества изобретения приведены в продолжении описания с примерами и графическими материалами, легенды к которым представлены ниже.

Фиг.1А и 1В:

Распознавание cMet моноклональным антителом m224D10 в ИФА (фиг.А) и FACS (фиг.В).

Фиг.2:

Эксперименты по ингибированию [<sup>125</sup>I]-HGF-связывания. Общее специфическое [<sup>125</sup>I]-HGF-связывание (в %) было изображено в зависимости от концентрации лиганда на полулогарифмическом графике. Значения специфического связывания являются средними значениями экспериментов, проведенных в трех повторах.

Фиг.3А и 3В:

ИНС-анализ парафиновых срезов из ксенотрансплантированных опухолей U87-MG,

меченных изотипическим контролем (фиг.3А) и МКА m224010 (фиг.3В).

Фиг.4:

FACS-распознавание сMet моноклональным антителом m221C9

Фиг.5А и 5В:

5 Кривые титрования МКА 221С9 на иммобилизованном димерном (А) и мономерном (В) сMet-белке.

Фиг.6:

ИНС-окрашивание парафиновых срезов опухолевых тканей молочной железы (А) и желудка (В), экспрессирующих различные уровни сMet с помощью m224D10.

10 Фиг.7:

ИНС-окрашивание парафиновых срезов опухолевых тканей молочной железы (А) и желудка (В), экспрессирующих различные уровни сMet с помощью m221C9.

Фиг.8:

15 Сенсограмма последовательного введения МКА 11Е1 и 224D10 на 201,7 RU захваченного сMet-Fc на проточной ячейке 2 сенсорного чипа CM5, активированного анти-tag-His-антителом.

Фиг.9:

20 Сенсограмма последовательного введения МКА 224G11 и 224D10 на 203,4 RU захваченного сMet-Fc на проточной ячейке 2 сенсорного чипа CM5, активированного анти-tag-His-антителом.

Фиг.10:

Сенсограмма последовательного введения МКА МКА 5D5 и 224D10 на 203,6 RU захваченного сMet-Fc на проточной ячейке 2 сенсорного чипа CM5, активированного анти-tag-His-антителом.

25 Фиг.11:

Схема картирования эпитопа семью анти-сMet-антителами. Стрелки указывают три эксперимента, проведенные для данного исследования. Серые квадраты указывают на антитела, которые не были протестированы с помощью 224D10.

Фиг.12: HGF-конкурентный анализ с МКА m221C9.

30 Пример 1: Создание и выбор антител против сMet, которые могут быть использованы для диагностических целей

- Этап иммунизации

Для создания анти-сMet-антител мышей BALB/c в возрасте 8 недель иммунизировали от 3 до 5 раз подкожно трансфицированной клеточной линией CHO, экспрессирующей сMet на мембране ( $20 \times 10^6$  клеток/доза/мышь), или от 2 до 3 раз сMet-внеклеточным доменом гибридного белка (10-15 мкг/доза/мышь) (R&D Systems, каталоговый №358MT) или фрагментами этого рекомбинантного белка, смешанными с полным адьювантом Фрейнда для первой иммунизации и неполным адьювантом Фрейнда для последующих. Также проведены смешанные протоколы, в которых мыши получали и CHO-сMet-клетки, и рекомбинантные белки. За три дня до слияния клеток мышей бустировали внутрибрюшинно или внутривенно рекомбинантным белком или его фрагментами. Затем собирали селезенки мышей и проводили слияние с клетками миеломы SP2/0-Ag14 (ATCC) и подвергали НАТ-селекции. Как правило, для изготовления моноклональных антител или их функциональных фрагментов, особенно мышинового происхождения, можно сослаться на методики, которые описаны, в частности, в руководстве "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988), или на методики получения гибридом, описанные Kohler и Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

- Этап скрининга на 224D10

Полученные гибридомы вначале проверяли с помощью ИФА на рекомбинантный белок сMet. Вкратце, рекомбинантным человеческим сMet-Fc-белком (R&D Systems) покрывали в течение ночи при 4°C 96-луночные планшеты Immulon II, и после этапа 5 блокировки с помощью 0,5% раствора желатина в течение 1 ч добавляли диапазон доз антитела m224G10 еще на 1 ч при 37°C. Затем планшеты промывали и добавляли антимишиный (Jackson) специфический IgG HRP на 1 ч при 37°C. Развитие реакции осуществляли с помощью раствора ТМБ-субстрата. Затем проводили вторую проверку с помощью анализа FACS на клеточных линиях A459 и NCI-H441, которые 10 экспрессируют сMet от умеренного до высокого уровня, чтобы убедиться, что производимые антитела также могут распознавать нативный рецептор на опухолевых клетках. С этой целью  $2 \times 10^5$  клеток инкубировали с диапазоном концентраций либо неконъюгированного МКА 224D10, либо 9G4 (МКА IgG1 изотипический контроль) в течение 20 мин при 4°C. После трех промываний в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 15 добавлением 1% BSA и 0,01%  $\text{NaN}_3$  клетки инкубировали с вторичным козлинным антимишиным антителом Alexa 488 (разведение 1/500) в течение 20 минут при 4°C. После трех дополнительных промываний в PBS с добавлением 1% BSA и 0,1%  $\text{NaN}_3$  клетки анализировали с помощью FACS (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Для расчета 20 среднего значения интенсивности флуоресценции оценивали по меньшей мере 5000 клеток.

Положительно отреагировавших в этих двух анализах амплифицировали, клонировали, и набор гибридом восстанавливали, очищали и проверяли на отсутствие конкуренции с радиоактивным HGF. Действительно, диагностическое антитело, как 25 правило, необходимо как для отбора пациентов, так и в качестве биомаркера, чтобы следить за поведением целевого рецептора у пациентов, которых лечат терапевтическим антителом. Что касается этого последнего пункта, основным критерием, который нужно учитывать, является то, что диагностическое антитело должно связываться с 30 эпитопом, отличным от того, который распознается терапевтическим антителом. Одной из целей нейтрализующего терапевтического антитела, направленного против рецептора фактора роста, является подавление связывания лиганда. В связи с этим при выборе диагностического антитела можно выбирать те, которые не мешают связыванию лиганда. Для проверки этого свойства проводили конкурентный анализ антител с радиоактивным HGF. Вкратце, 96-луночные микропланшеты FlashPlate с белком А 35 (Perkin Elmer) блокировали 0,5% раствором желатина в PBS (2 ч при комнатной температуре), а затем покрывали в течение ночи при 4°C рекомбинантным сMet-Fc-белком (R&D). Свободные остаточные сайты с белком А также насыщали нерелевантным hIgG в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS после каждого этапа. Для конкурентного анализа связывание [ $^{125}\text{I}$ ]-HGF (удельная 40 активность ~2000 Ки/ммоль) в концентрации 200 пМ с иммобилизованным сMet измеряли в присутствии различных концентраций либо тестируемого моноклонального антитела анти-сMet, либо HGF (R&D Systems) в диапазоне от 0,1 пМ до 1 мкМ в PBS с pH 7,4. Антитела с известной мощностью замещения HGF (224G11, 11E1 и 5D5) вводили в качестве положительных контролей эксперимента. МКА 5D5 представляет собой 45 антитело, созданное Genentech и доступное в качестве гибридомы в АТСС. Мышиное IgG1, описываемое как 9G4, использовали в качестве изотипического контроля. Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 6 часов и оценивали на сцинтилляционном счетчике для микропланшетов Packard Top Count Microplate

Scintillation Counter. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 мкМ HGF.

Наконец, моноклональные антитела, которые соответствуют трем критериям, описанным выше [i) распознавание сMet в ИФА, ii) связывание с нативным сMet и iii) отсутствие конкуренции с радиоактивным лигандом], были отобраны для окончательного анализа сMet-распознавания на парафиновых срезах ксенотрансплантатов опухолей, экспрессирующих сMet. Для этой оценки опухолевые срезы из ксенотрансплантатов U87-MG депарафинизировали, регидратировали и помещали в буфер для демаскировки Target Retrieval Buffer 1X (Dako S1699) на водяной бане, предварительно нагретой до 98°C, для высокотемпературной обработки эпитопов антигенов при 98°C в течение 30 минут, а затем еще в течение 30 минут в буфере Target Retrieval Buffer. После трех промываний в Tris-буфере-физиологическом растворе-0,05% Твин 20 (TBS-T) (Dako S3006) эндогенную активность пероксидазы блокировали с помощью реагента для блокировки пероксидазы Peroxidase Blocking Reagent (Dako K4007) в течение пяти минут. Срезы промывали TBS-T и инкубировали с блокирующим реагентом (UltraV block-TA-125UB- LabVision) в течение 5 минут перед добавлением тестируемого мышинового моноклонального антитела сMet (5 мкг/мл). Мышиный IgG1/kappa (5 мкг/мл, X0931, Dako) использовали в качестве отрицательного контроля. Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C, промывали TBS-T и инкубировали с биотинилированным универсальным антителом (LSAB+, Dako K0679) в течение 15 минут при комнатной температуре. После промывания TBS-T срезы инкубировали в течение 15 последующих минут с универсальным комплексом стрептавидина-пероксидазы (LSAB+, Dako K0679). Диаминобензидин использовали для развития коричневого продукта реакции.

После ряда слияний мышинное антитело 224D10 (m224D10) определяли в качестве кандидата для диагностики сMet-позитивных опухолей. Как показано на фиг. 1, m224D10 способно распознать сMet и в анализе ИФА (фиг. 1А), и на поверхности клеточных линий A549 и NCI-H441, которые, как известно, экспрессируют сMet (фиг. 1В).

Затем m224D10 испытывали в анализе замещения меченного HGF. На фиг. 2 процент от общего специфического [<sup>125</sup>I]-HGF-связывания изображали в зависимости от концентрации лиганда на полулогарифмическом графике, и концентрации различных ингибиторов, необходимые для ингибирования связывания радиолиганда на 50% (IC<sub>50</sub>), определяли графически из полученных сигмоидных конкурентных кривых. Как и ожидалось, немеченый HGF смог полностью вытеснить [<sup>125</sup>I]-HGF, связанный с иммобилизованным сMet, а контрольное антитело 9G4 не показало никакой HGF-блокирующей активности. МКА анти-сMet 224G11, 11E1 и 5D5, используемые в качестве положительных контролей, смогли ингибировать связывание [<sup>125</sup>I]-HGF с иммобилизованным сMet со значениями IC<sub>50</sub> 3,6 нМ, 42 нМ и 4,4 нМ, соответственно. МКА m224D10 не могло заместить [<sup>125</sup>I]-HGF и было выбрано для иммуногистохимических (ИНС) исследований.

Результаты, приведенные на фиг. 3 В, показали, что m224G10 распознает сMet на ксенотрансплантатах опухолей U87-MG, которые, как известно, особенно чувствительны к сMet-нацеленной терапии. Как и ожидалось, отсутствие окрашивания наблюдалось для изотипического контроля IgG1 (фиг. 3А). На основании этих результатов были поставлены эксперименты для определения того, может ли МКА 224D10 быть использовано для подсчета сMet на опухолях.

- Этап скрининга на 221C9

Полученные гибридомы вначале проверяли с помощью ИФА на димерный и мономерный рекомбинантный белок сMet. Вкратце, рекомбинантным человеческим сMet-белком (димерным или мономерным) покрывали в течение ночи при 4°C 96-луночные планшеты Immulon II, и после этапа блокировки с помощью 0,5% раствор желатина в течение 1 ч добавляли чистый супернатант от гибридомы еще на 1 ч при 37°C. Затем планшеты промывали и добавляли козлий антимышинный (Jackson) специфический IgG-HRP на 1 ч при температуре 37°C. Развитие реакции осуществляли с помощью раствора ТМБ-субстрата. Затем проводили вторую проверку с помощью анализа FACS на клеточной линии A459, которая экспрессирует сMet от умеренного до высокого уровня, чтобы убедиться, что производимые антитела также могут распознавать нативный рецептор на опухолевых клетках. С этой целью  $2 \times 10^5$  клеток инкубировали с 10 мкг/мл m221C9 или m10D9 (изотипический контроль МКА IgG1) в течение 20 мин при 4°C. После трех промываний в фосфатно-солевом буфере (PBS) с добавлением 1% BSA и 0,01%  $\text{NaN}_3$  клетки инкубировали с вторичным козлиным антимышинным антителом Alexa 488 (разведение 1/500) в течение 20 минут при 4°C. После трех дополнительных промываний в PBS с добавлением 1% BSA и 0,1%  $\text{NaN}_3$  клетки анализировали с помощью FACS (FacsCalibur, Becton-Dickinson). Для расчета среднего значения интенсивности флуоресценции оценивали по меньшей мере 5000 клеток.

Положительно отреагировавшие в этих двух тестах гибридомы амплифицировали, клонировали, изотипировали и размножали. Затем собирали новые гибридомные супернатанты. Определяли в них содержание IgG. Дополнительный цитометрический анализ проводили на панели из 5 человеческих опухолевых клеточных линий (A549, ВХРС3, MCF7, U87MG и HepG2). Все эти клеточные линии были предоставлены АТСС. Полученные данные представлены на фиг.4, а значения MFI представлены в таблице 6 ниже.

Таблица 6					
Данные цитометрического анализа (MFI), проведенного с МКА 221C9 на 5 опухолевых клеточных линиях (АТСС)					
	A549	ВХРС-3	MCF7	U87MG	HepG2
Только клетки	13,98	11,87	9,87	9,10	10,52
Вторичное антитело	11,98	13,23	11,10	11,20	15,85
Изотипический контроль	11,83	14,77	12,06	11,56	18,12
221C9	243,59	375,57	31,95	71	233,58

Дополнительные эксперименты были проведены с очищенным антителом 221C9. Было выполнено титрование первого антитела и по мономерному сMet-белку, и по димерному сMet-белку.

Кривые титрования представлены на фиг.5. Наблюдалась сходная аффинность с обеими формами сMet-рецептора. Для выполнения этих ИФА человеческий димерный сMet-белок (R&D systems, каталоговый №358MT) сорбировали в концентрации 0,25 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. После насыщения планшет (Costar №3690) 0,5% раствором желатина в течение 2 ч при 37°C супернатанты от гибридом инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывания в PBS в каждую лунку добавляли антимышинное HRP-антитело (Jackson ImmunoResearch, каталоговый №115-035-164) в разведении 1/5000 в буфере для ИФА (0,1% желатин/0,05% Твин-20 в PBS), и планшеты

инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. После трех промываний в PBS активность пероксидазы проявляли путем добавления 50 мкл ТМБ-субстрата (Uptima). Реакция проходила в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл/лунка 1 М раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и регистрировали на планшетном ридере при 450 нм. Такой же протокол выполняли для мономерного сMet, но в этом случае белок сорбировали в концентрации 5 мкг/мл.

В конце концов, МКА 221С9 удовлетворяло двум критериям, описанным выше: (i) сMet-распознавание в ИФА, (ii) связывание с нативным сMet, экспрессированным на поверхности человеческих опухолевых клеточных линий.

Пример 2: Оценка тканей на экспрессию сMet с МКА m224D10 и m221C9

Применяя описанный выше протокол, ряд парафиновых срезов человеческих опухолевых тканей, экспрессирующих различные уровни сMet, окрашивали моноклональными антителами m224D10 и m221C9, соответственно.

Результаты, приведенные на фиг.6 для МКА m224D10 и на фиг.7 для МКА m221C9, показали в двух типах опухолей, что оба МКА, m224D10 и m221C9, способны различать человеческие опухоли с переменными уровнями сMet. С помощью этих антител опухоли можно оценить как:

- 0 или отрицательно: отрицательные опухоли, в которых отсутствует окрашивание мембраны или обнаружено менее 10% клеток с положительными мембранами,
- 1<sup>+</sup>: едва заметное окрашивание более чем 10% опухолевых клеток,
- 2<sup>+</sup>: умеренное полное окрашивание мембраны наблюдается в более чем 10% опухолевых клеток,
- 3<sup>+</sup>: сильное полное окрашивание более 10% опухолевых клеток.

Пример 3: Конкурентные эксперименты 224D10

Как уже было написано выше, диагностическое МКА также может быть использовано в качестве «маркера ответа» для терапевтических антител, которые индуцируют уменьшение количества целевого рецептора. Что касается этого момента, у пациента может быть выполнен забор крови или биопсия и проанализирован сMet-статус. С этой целью диагностическое антитело, которое будет использоваться, должно распознавать эпитоп, отличный от того, который является мишенью терапевтического антитела. Так как терапевтические антитела обычно способны заместить HGF, выбор диагностического антитела, которое не конкурирует за замещение лиганда, может быть полезным в качестве маркера ответа для всех терапевтических МКА.

В этом примере были выполнены конкурентные эксперименты между 224D10 и многими терапевтическими моноклональными антителами, чтобы продемонстрировать, что 224D10 может быть использован в качестве маркера ответа.

Терапевтические анти-сMet МКА 11E1, 227H1, 224G11 и МКА 5D5, которое является мышинной формой 5D5 с одним Fab-участком, коммерчески доступное в качестве гибридомы в АТСС, изучали в эксперименте Bioscore. Вкратце, в сенсорном чипе CM5 активировали проточные ячейки 1 и 2 путем ковалентного связывания анти-полигистидинового МКА с помощью набора для аминного связывания, следуя инструкции производителя. Рабочим буфером служил HBS-EP-буфер. Эксперименты проводили при температуре 25°C при скорости потока 30 мкл/мин. HGF-R/Fc химерный белок использовали в концентрации 10 мкг/мл в рабочем буфере и вводили в течение 1 минуты через проточную ячейку 2. Как правило, захватывали примерно 190 RU сMet-Fc. Проточная ячейка 1 выступала в качестве эталона для оценки неспецифического связывания МКА. Первое МКА (20 мкг/мл) вводили в течение 2 минут в обе проточные

ячейки. Затем второе антитело (20 мкг/мл) вводили в обе проточные ячейки. Записывали дифференциальный резонансный сигнал Fc2-Fc1. В конце каждого цикла сенсорный чип регенерировали, удаляя сMet и МКА с введением регенерационного глицинового буфера с рН 1,5 в обе проточные ячейки на полминуты.

5 Первый эксперимент проводили с 11E1 в качестве первого антитела и 224D10 в качестве второго антитела (см. фиг.8). Этот эксперимент показывает, что 11E1 и 224D10 связываются с двумя отдаленными эпитопными областями на поверхности сMet-Fc-молекулы. Второй эксперимент проводили с 224G11 в качестве первого антитела и 224D10 в качестве второго антитела (см. фиг.9). Этот эксперимент показывает, что 10 224G11 и 224D10 также связываются с двумя отдаленными областями. Третий эксперимент проводили с 5D5 в качестве первого антитела и 224D10 в качестве второго антитела (см. фиг.10). Опять же, это эксперимент показывает, что 5D5 и 224D10 связываются с двумя отдаленными областями. В заключение, 224D10 связывается с отдаленной областью на сMet-молекуле сайта связывания 11E1, 224G11 и 5D5. Из-за 15 того, что предварительные данные, полученные из протокола Viacore такого же типа, показали, что 13.3.2 анти-сMet-антитело от Pfizer принадлежит той же группе картирования эпитопов, что и 11E1 (фиг.11), мы можем предположить, что 224D10 и 13.3.2 могут связываться одновременно с одной и той же сMet-молекулой, даже если эта комбинация не проверена. Аналогично для 227H1, который принадлежит к той же 20 группе эпитопов, что и 224G11 (фиг.11), вполне вероятно, что оба антитела 227H1 и 224D10 могут связываться одновременно с сMet. Наконец, 223C4, который принадлежит той же группе картирования эпитопов, что и 5D5 (фиг.11), вероятно, может связываться с сMet одновременно с 224D10.

Пример 4: HGF-конкурентные эксперименты, проводимые в присутствии антитела 25 221C9

Для дальнейшей характеристики диагностических МКА были выполнены HGF-конкурентные анализы. Первая реакционная смесь, содержащая сMet-белок в присутствии или в отсутствие тестируемых МКА, была приготовлена на отдельных насыщенных (0,5% желатина в PBS 1x) планшетах. Выполняли серийные разведения 30 1:2 (начиная с 40 мкг/мл на 12 колонках) мышинных антител (контроли и МКА для исследования). Затем добавляли 0,8 мкг/мл rh сMet-Fc-белка (RD Systems, 358-MT/CF), за исключением отрицательной контрольной линии, которая содержит только разбавитель для ИФА (0,1% желатин, 0,05% Твин-20 в PBS 1x). После гомогенизации конкурентные образцы загружали в HGF-покрытые планшеты в растворе 0,3 мкг/мл 35 rhHGF в PBS (RDSystems, 294-HGN/CF). После инкубации и нескольких промываний связанные сMet-белки обнаруживали с применением козьиного античеловеческого IgG-HRP (Jackson, 109-035-098). После связывания в планшеты добавляли ТМБ-субстрат. Реакцию останавливали путем добавления раствора кислоты H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и полученную оптическую плотность регистрировали при 450 нм, используя инструмент 40 микропланшетный ридер.

Эксперимент проводили с 221C9 в присутствии или в отсутствие рекомбинантного белка сMet-Fc (см. фиг.12). Этот эксперимент показывает, что 221C9 способно конкурировать с сMet в связывании с его иммобилизованным лигандом-рецептором. Тем не менее, в присутствии 20 мкг/мл 221C9 наблюдается лишь частичное связывание 45 сMet.

#### Формула изобретения

1. Антитело или его функциональный фрагмент, способные связываться с сMet,

которое характеризуется тем, что оно выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его функционального фрагмента, состоящего из:

- тяжелой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-H1 с последовательностью SEQ ID №7, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID №2 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID №8; и

- легкой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-L1 с последовательностью SEQ ID №4, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID №5 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID №6; и

б) антитела или его функционального фрагмента, состоящего из:

- тяжелой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-H1 с последовательностью SEQ ID №29, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID №30 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID №31; и

- легкой цепи, включающей следующие три CDR, как они определены в соответствии с IMGT: соответственно CDR-L1 с последовательностью SEQ ID №32, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID №33 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID №34.

2. Антитело или его функциональный фрагмент по п. 1, которое характеризуется тем, что оно выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его функционального фрагмента, содержащего последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №13 и последовательность переменного домена легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №14; и

б) антитела или его функционального фрагмента, содержащего последовательность переменного домена тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №40 и последовательность переменного домена легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID №41.

3. Антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп. 1, 2, которое характеризуется тем, что оно является мышинным антителом.

4. Антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп. 1, 2, которое характеризуется тем, что оно не блокирует связывание лиганда HGF с cMet-белком.

5. Мышиная гибридома, способная секретировать антитело по любому из пп. 1-4, которая выбрана из гибридомы, зарегистрированной в CNCSM, Институт Пастера, Париж, Франция, 12 марта 2008 года под номером I-3949.

6. Выделенная нуклеиновая кислота для экспрессии антитела по любому из пп. 1-4, которая выбрана из следующих нуклеиновых кислот:

а) ДНК или РНК, кодирующей антитело по любому из пп. 1-4;

б) ДНК-последовательность с последовательностью, выбранной из группы последовательностей SEQ ID №№15-26 или 42-52;

в) ДНК-последовательность с последовательностями SEQ ID №№27, 28, 53 или 54;

г) рибонуклеиновых кислот, соответствующих нуклеиновым кислотам, определенным в а), б) или в).

7. Способ обнаружения *in vitro* присутствия и локализации cMet-экспрессирующей опухоли у субъекта, который включает этапы (а) контактирования образца от субъекта с антителом или его функциональным фрагментом по любому из пп. 1-4 и (б) заключения о присутствии и локализации cMet-экспрессирующей опухоли на основе выявления связывания указанного антитела с образцом.

8. Способ определения *in vitro* уровня экспрессии cMet в cMet-экспрессирующей опухоли от субъекта, включающий этапы (а') контактирования образца от субъекта с антителом или его функциональным фрагментом по любому из пп. 1-4 и (б')

количественной оценки уровня связывания антитела с сMet в указанном образце.

9. Способ по п. 8, где уровень экспрессии сMet измеряется путем иммуногистохимии (ИНС).

10. Способ диагностики *in vitro* сMet-экспрессирующей опухоли у субъекта, который включает этапы (i) определения уровня экспрессии сMet по п. 8 и (ii) сравнения уровня экспрессии этапа (i) с референсным уровнем экспрессии сMet в нормальной ткани.

11. Способ определения *in vitro* прогноза развития сMet-экспрессирующей опухоли у субъекта, который включает этапы (i) определения уровня экспрессии сMet по п. 8 и (ii) сравнения уровня экспрессии этапа (i) с референсным уровнем экспрессии сMet в нормальной ткани.

12. Способ определения *in vitro* сMet-статуса опухоли у субъекта, который включает этапы (1) определения уровня экспрессии сMet по п. 8, (2) оценки указанной опухоли по уровню экспрессии сMet и (3) сравнения указанной оценки с оценкой, полученной для контрольного образца, где в случае превышения уровня экспрессии по сравнению с контрольным образцом сMet-статус опухоли представляет собой сMet(+).

13. Способ по п. 12, где указанная оценка включает применение соответствующей шкалы на основе двух параметров, которыми являются интенсивность окрашивания и процент положительных клеток.

14. Способ по п. 13, где указанная соответствующая шкала представляет собой шкалу от 0 до 3<sup>+</sup>, где отсутствие мембранной реактивности опухолевых клеток оценивается как 0, а сильная полная реактивность в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 3<sup>+</sup>.

15. Способ по п. 14, где указанная соответствующая шкала представляет собой шкалу от 0 до 3<sup>+</sup>, где отсутствие мембранной реактивности опухолевых клеток оценивается как 0; слабо заметная мембранная реактивность в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 1<sup>+</sup>; полная мембранная реактивность от слабой до умеренной в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 2<sup>+</sup>; а сильная полная реактивность в более чем 10% опухолевых клеток оценивается как 3<sup>+</sup>.

16. Способ по п. 14 или 15, где опухоль является сMet(+) с оценкой 2<sup>+</sup> или 3<sup>+</sup>.

17. Способ прогнозирования эффективности лечения онкогенного расстройства с помощью анти-сMet-антитела или его фрагмента, где указанный способ включает следующие этапы: (а) определение *in vitro* сMet-статуса опухоли субъекта по п. 16 и (б) если статус сMet(+), заключение о том, что лечение онкогенного расстройства с помощью анти-сMet-антитела или его фрагмента будет эффективным.

18. Набор для прогнозирования эффективности лечения онкогенного расстройства, включающий по меньшей мере анти-сMet-антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп. 1-4 и вкладыш, при этом указанное антитело предпочтительно является меченым.

19. Набор по п. 18, который также содержит реагент, используемый для определения степени связывания указанного анти-сMet антитела и сMet.

20. Набор по п. 18, который также содержит реагент, используемый для количественной оценки степени связывания указанного анти-сMet антитела и сMet.

21. Набор по п. 18 или 19, который также содержит:

i) реагент, пригодный для определения степени связывания указанного антитела против сMet и сMet; и

ii) положительные и отрицательные контрольные образцы, используемые для оценки

уровня экспрессии сMet.

22. Набор по п. 21, который также содержит поликлональное антитело, специфичное для мышинных антител, при этом предпочтительно указанное поликлональное антитело, специфичное к мышинным антителам, является меченым.

5

10

15

20

25

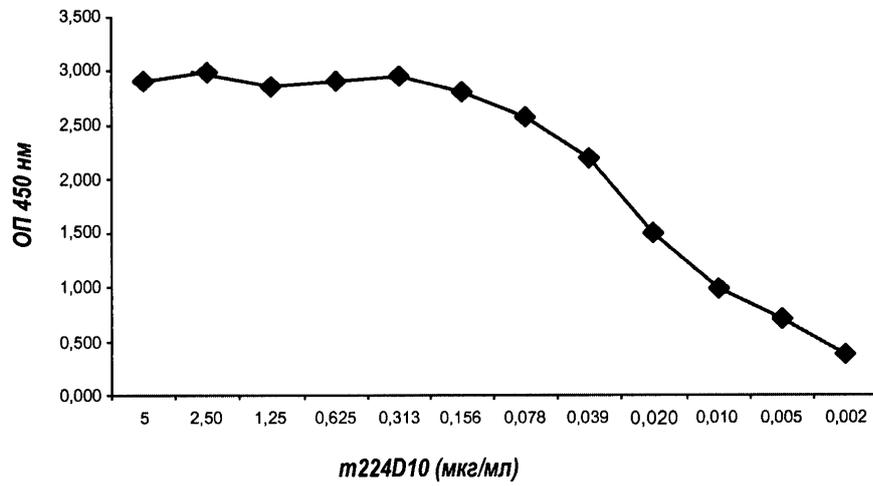
30

35

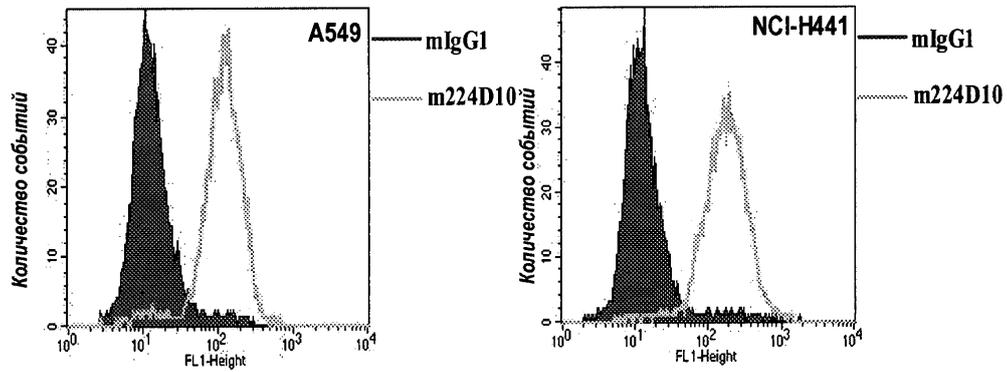
40

45

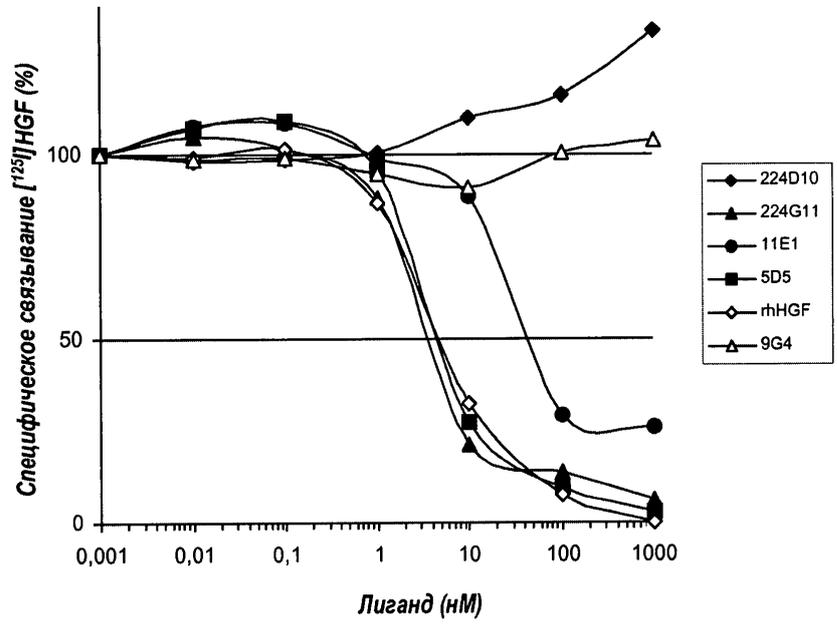
1



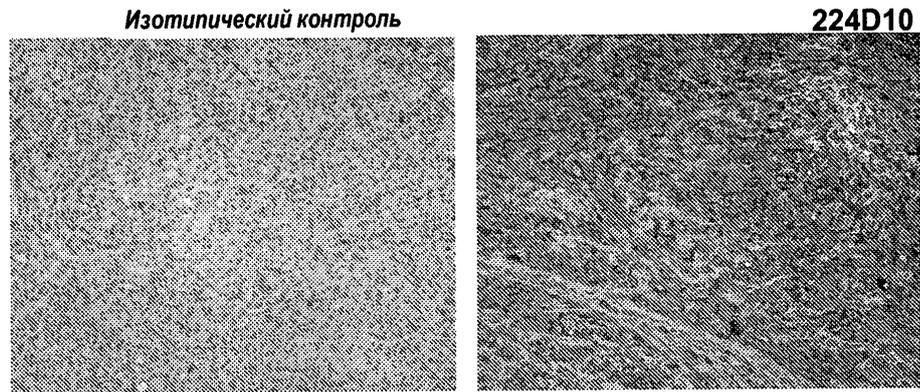
Фиг. 1А



Фиг. 1В

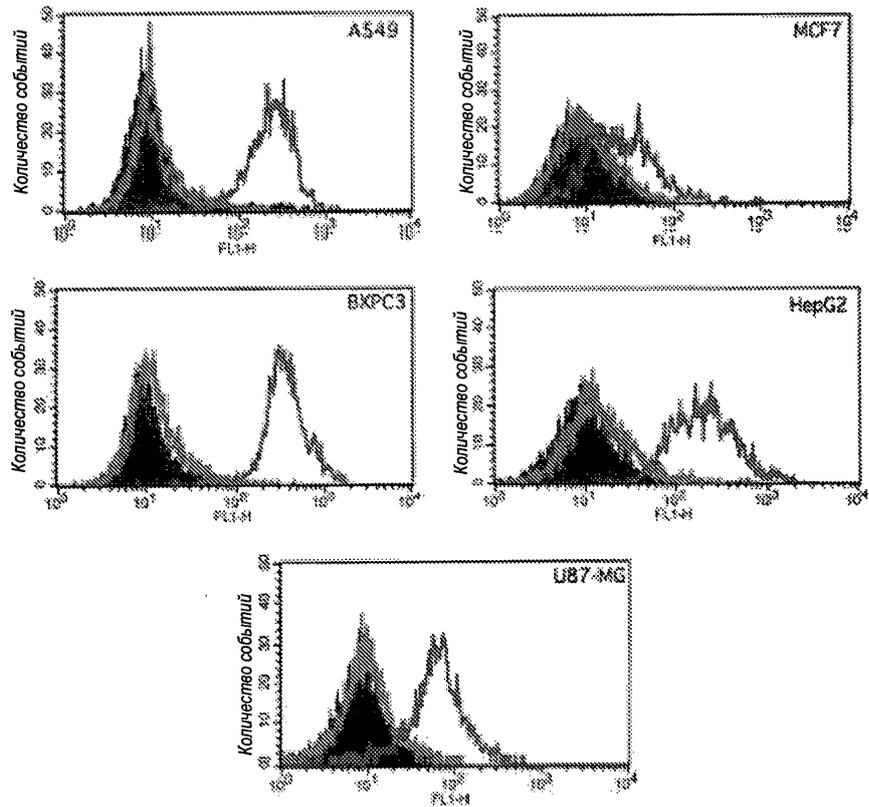


Фиг. 2

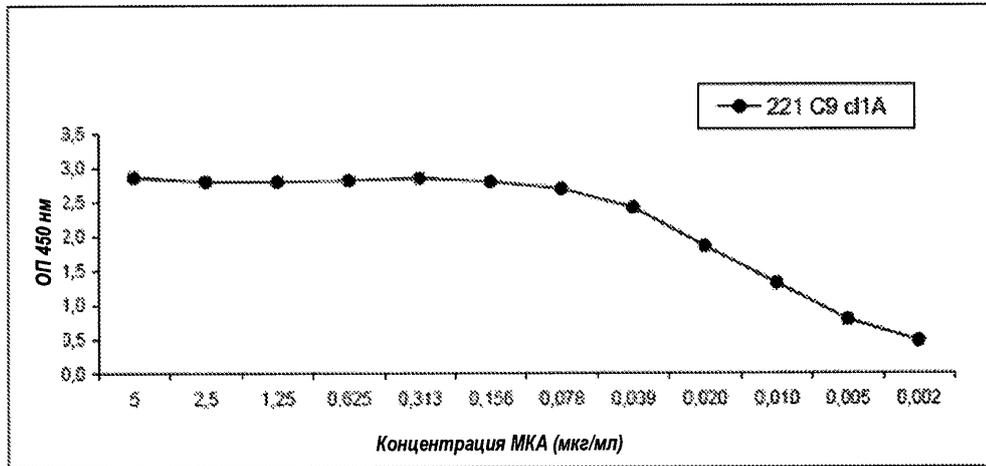


Фиг. 3А

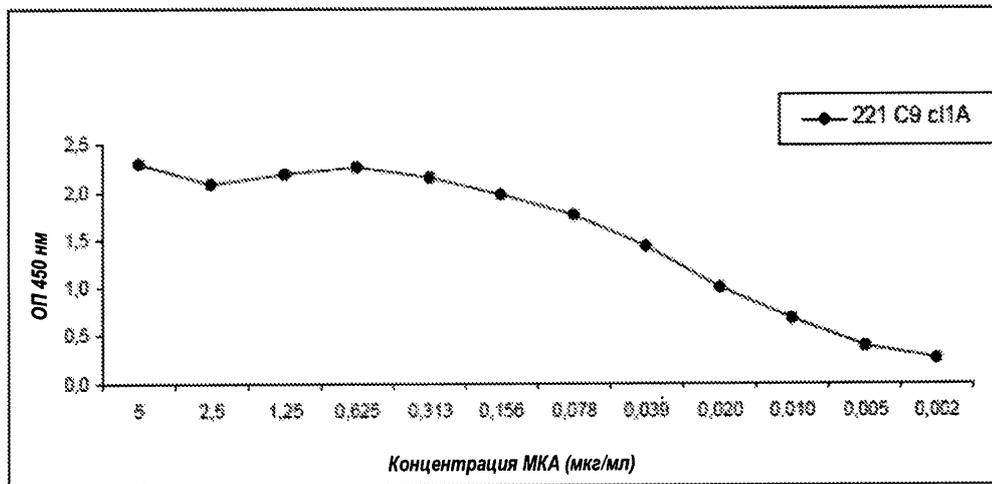
Фиг. 3В



Фиг. 4

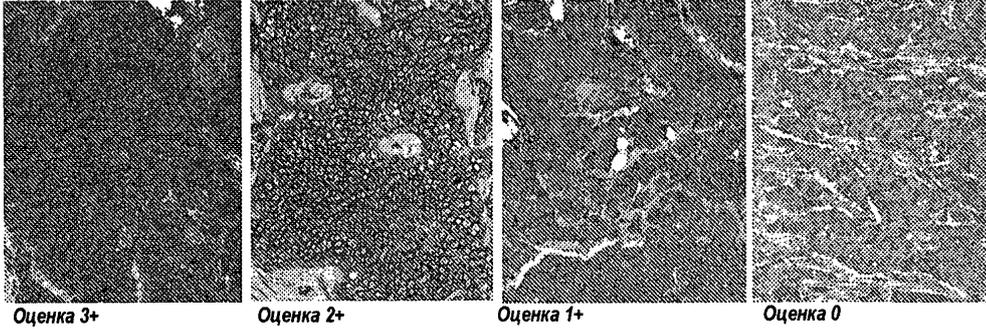


Фиг. 5А

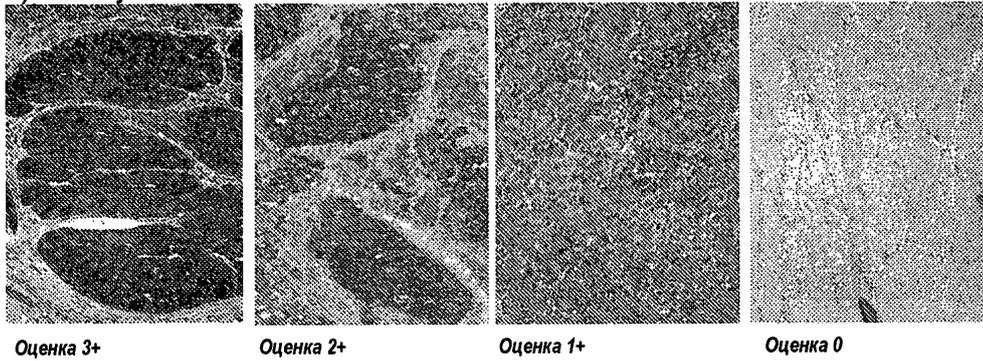


Фиг. 5В

**A) Рак молочной железы**

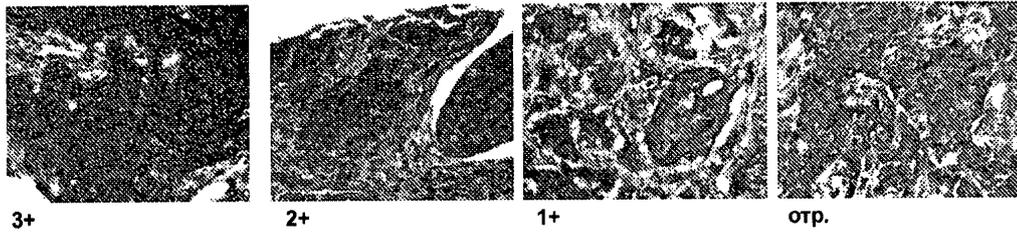


**B) Рак желудка**

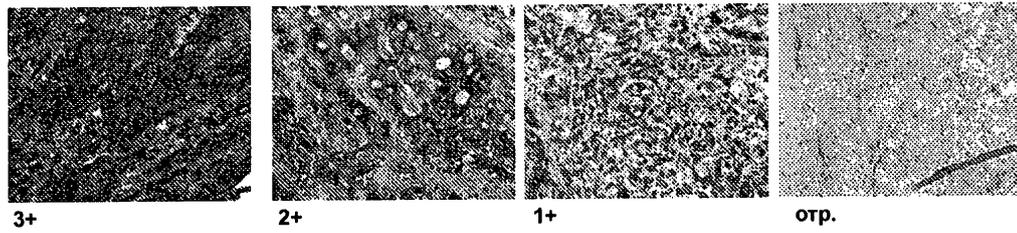


**Фиг. 6**

**A) Рак молочной железы**

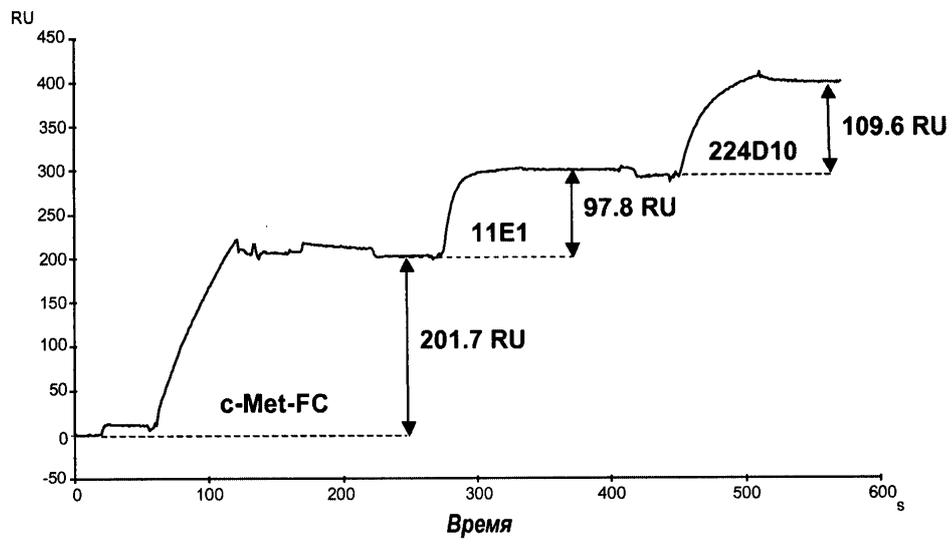


**B) Рак желудка**

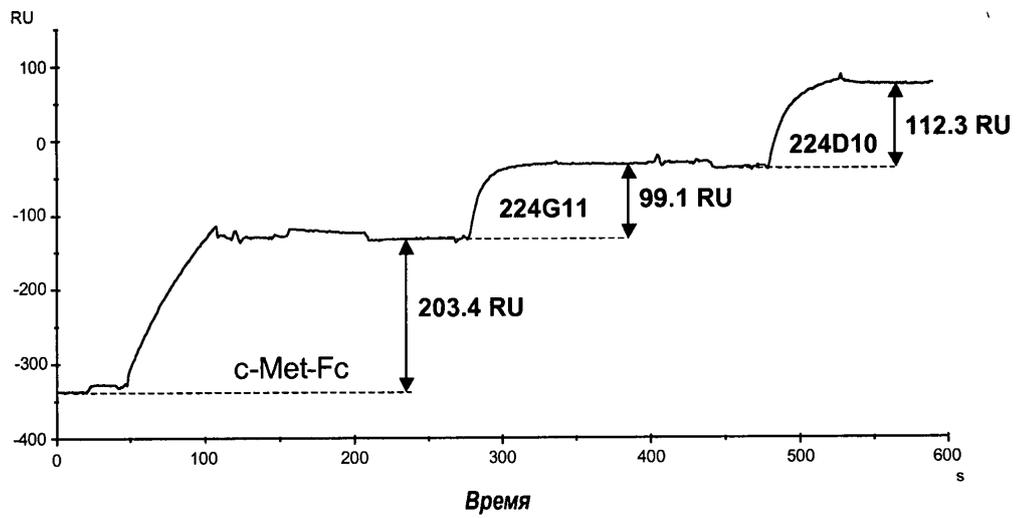


**Фиг. 7**

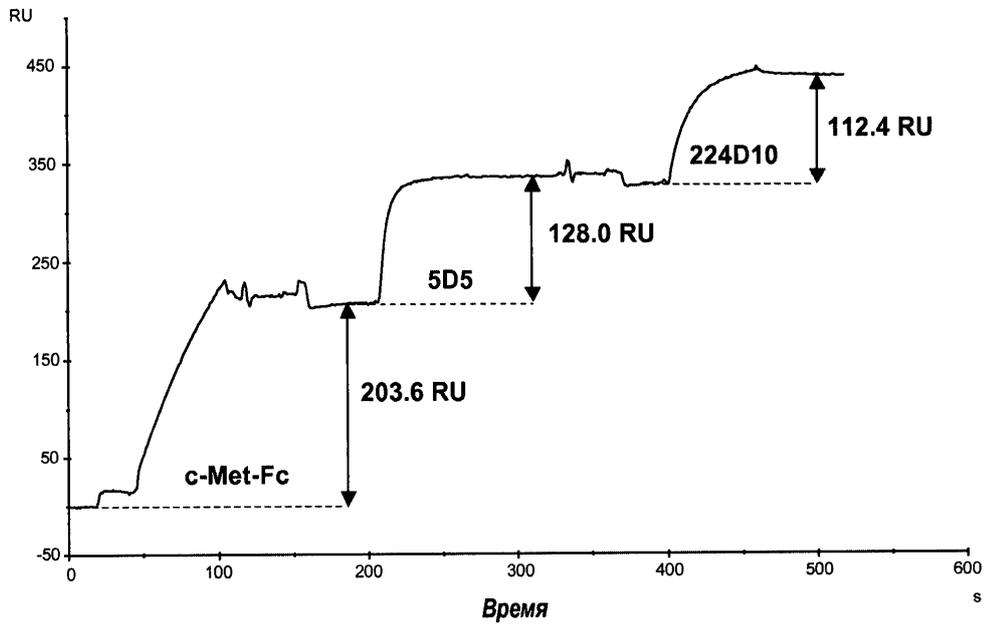
7



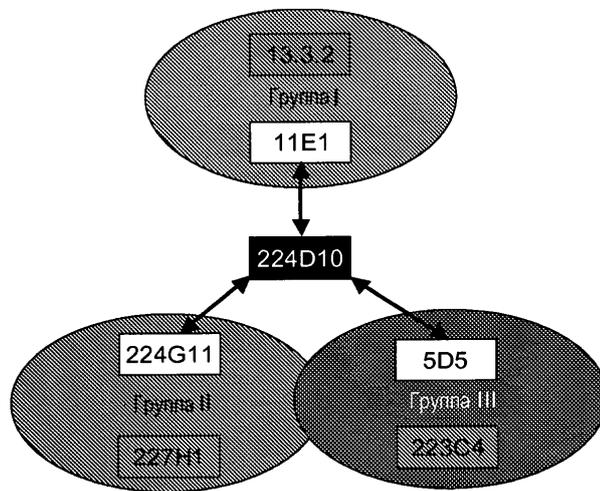
Фиг. 8



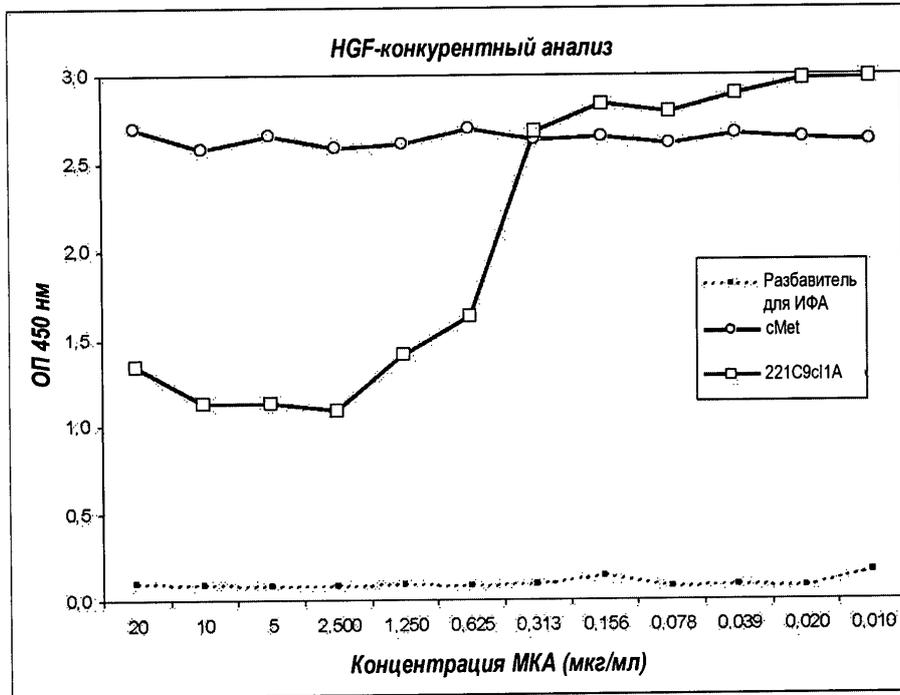
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> ANTI-cMET ANTIBODY AND ITS USE FOR THE DETECTION AND THE DIAGNOSTIC OF CANCER.

<130> D27752

<140> PCT/EP2010/062271  
 <141> 2010/08/23

<150> EP 09305777.6  
 <151> 2009-08-21

<150> US 61/235,864  
 <151> 2009-08-21

<150> US 61/348,005  
 <151> 2010-05-25

<160> 60

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 1

Thr Ser Ala Tyr Phe  
 1 5

<210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 2

Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn  
 1 5

<210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 3

Asp Arg Thr Phe Ala Tyr  
 1 5

<210> 4

2

<211> 6  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 4

Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr  
1 5

<210> 5  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 5

Tyr Ala Ser  
1

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 7

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Phe  
1 5

<210> 8  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 8

Thr Arg Asp Arg Thr Phe Ala Tyr  
1 5

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 9

Thr Ser Ala Tyr Phe Trp Ser  
1 5

<210> 10  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 10

Phe Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr Leu His  
1 5 10

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 12

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 13  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 13

Asp Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
20 25 30

Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
35 40 45

Met Gly Phe Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80

Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Asp Arg Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ala  
115

<210> 14  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 14

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Thr  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg  
100 105

<210> 15  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> mus musculus

<400> 15  
accagtgctt atttc

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 16  
 ataaactacg acggtaccaa t 21

<210> 17  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 17  
 gatcggacct ttgcttat 18

<210> 18  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 18  
 caaagaattt acaactac 18

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 19  
 tatgcttcc 9

<210> 20  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 20  
 caacagagta acagctggcc tctcacg 27

<210> 21  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 21  
 ggctactcca tcaccagtgc ttatttc 27

<210> 22  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 22 acaagagatc ggacctttgc ttat	24
<210> 23 <211> 21 <212> DNA <213> mus musculus	
<400> 23 accagtgcctt atttctggag c	21
<210> 24 <211> 48 <212> DNA <213> mus musculus	
<400> 24 ttcataaact acgacggtac caataactac aacctatctc tcaaaaat	48
<210> 25 <211> 33 <212> DNA <213> mus musculus	
<400> 25 agggccagtc aaagaattta caactaccta cac	33
<210> 26 <211> 21 <212> DNA <213> mus musculus	
<400> 26 tatgcttccc agtccatctc t	21
<210> 27 <211> 345 <212> DNA <213> mus musculus	
<400> 27 gatctacagc ttcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc	60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgcattatt tctggagctg gatccggcag	120
tttccaggaa acaaactgga atggatgggc ttcataaact acgacggtac caataactac	180
aacctatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgata catctaagaa ccagtttttc	240
ctgagggttga attctgtgac tactgacgac acagctacgt attactgtac aagagatcgg	300
acctttgcctt attggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345
<210> 28	

<211> 321  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 28  
 gatattgtgt taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60  
 ctttcctgca gggccagtca aagaatttac aactacctac actggtatca acaaaaatca 120  
 catgagtcctc caagccttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180  
 aggttcagtg gcagtggtc agggacagat ttcattctca ctatcaacag tgtggagact 240  
 gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacagct ggcctctcac gttcgggtgct 300  
 gggaccaagc tggagctgag a 321

<210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 29  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
 1 5

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 30  
 Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr  
 1 5

<210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 31  
 Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 32  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 32  
 Ser Ser Val Ser Tyr  
 1 5

<210> 33  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 33

Asp Thr Ser  
1

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 34

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr  
1 5

<210> 35  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 35

Ser Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 36  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 36

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe Arg  
1 5 10 15

Thr

<210> 37  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 37

Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr  
1 5

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 38

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 39

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 40  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Arg Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 100 105 110

Val Thr Ala Pro Gln  
 115

<210> 41  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 41

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 42  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 42

ggctacacct tcaccagcta ctgg

24

<210> 43  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 43

attaatccta gcaacggtcg tact

24

<210> 44  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 44		
gcaagaaggg ttggttacct catggactac		30
<210> 45		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 45		
tcaagtgtaa gttac		15
<210> 46		
<211> 9		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 46		
gacacatcc		9
<210> 47		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 47		
cagcagtgga atagtaacct acccagc		27
<210> 48		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 48		
agctactgga tgcac		15
<210> 49		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 49		
gagattaatc ctagcaacgg tcgtactcac tacaatgaga agttcaggac c		51
<210> 50		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 50		
agggttggtt acctcatgga ctac		24
<210> 51		
<211> 30		

<212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 51  
 agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac 30  
  
 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 52  
 gacacatcca aactggcttc t 21  
  
 <210> 53  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 53  
 cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60  
 tcttgcaagg ctcttgcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatccta gcaacggtcg tactcactac 180  
 aatgagaagt tcaggaccaa ggccacactg actggtgcca aatcctccat cacagcctac 240  
 atgcaactca gcacctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagggtt 300  
 ggttacctca tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgctcctca g 351  
  
 <210> 54  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 54  
 caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120  
 acctccccca aaagattgat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg aatagtaacc cacccacggt cggtgctggg 300  
 accaagctgg agctgaaa 318  
  
 <210> 55  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>

<223> Sequence from CDR-H1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is S or T

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is I or F

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is A or missing

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is F or W

<400> 55

Gly Tyr Xaa Xaa Thr Ser Xaa Tyr Xaa

1

5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Sequence from CDR-H2

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Y or P

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is D or S

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is N or missing

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is T or R

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(8)  
<223> Xaa is N or T  
  
<400> 56  
  
Ile Asn Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa  
1 5

<210> 57  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> Sequence from CDR-H3

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is T or A

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa is D or R

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa is R or V

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa is T or G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa is F or Y

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa is A or L

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa is M or missing

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa is D or missing

<400> 57

15

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr  
1 5 10

<210> 58  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> Sequence from CDR-L1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is Q or missing

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa is R or S

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa is I or S

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa is Y or V

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa is N or S

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr  
1 5

<210> 59  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> Sequence from CDR-L2

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is Y or D

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is A or T

<400> 59

Xaa Xaa Ser  
 1

<210> 60  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Sequence from CDR-L3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is S or W

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is W or N

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is L or P

<400> 60

Gln Gln Xaa Asn Ser Xaa Pro Xaa Thr  
 1 5