

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033649**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.13

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

(21) Номер заявки
201590694

(22) Дата подачи заявки
2013.11.06

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КОНЬЮГАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ANTI-LY75 АНТИТЕЛО И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ
АГЕНТ**

(31) **1220010.1**

(32) **2012.11.07**

(33) **GB**

(43) **2015.09.30**

(86) **PCT/GB2013/052899**

(87) **WO 2014/072700 2014.05.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОКСФОРД БАЙОТЕРАПЬЮТИКС
ЛТД (GB)**

(72) Изобретатель:
Акройд Джеймс Эдвард (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012122396
WO-A1-2004/035619
US-A1-2005186612
WO-A2-2009061996
WO-A2-2011044452
US-A1-2004258688

T.S. JOHNSON ET AL.: "Inhibition of Melanoma Growth by Targeting of Antigen to Dendritic Cells via an Anti-DEC-205 Single-Chain Fragment Variable Molecule", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 14, no. 24, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 8169-8177, XP055099272, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1474, the whole document

KATRIN BIRKHOLZ ET AL.: "Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, UNITED STATES, vol. 116, no. 13, 30 September 2010 (2010-09-30), pages 2277-2285, XP002665317, ISSN: 1528-0020, DOI: 10.1182/BLOOD-2010-02-268425 [retrieved on 2010-06-21], the whole document

MAHNKE KARSTEN ET AL.: "Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 65, no. 15, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 7007-7012, XP002464332, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0938, the whole document

PREMKUMAR VUMMIDI GIRIDHAR ET AL.: "Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells", CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS; OFFICIAL JOURNAL OF THE METASTASIS RESEARCH SOCIETY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 28, no. 8, 2 September 2011 (2011-09-02), pages 887-897, XP019976075, ISSN: 1573-7276, DOI: 10.1007/S10585-011-9420-X, the whole document

SCHWINGSHACKL P. ET AL.: "Distribution and maturation of skin dendritic cell subsets in two forms of cutaneous T-cell lymphoma: mycosis fungoides and Sézary syndrome", ACTA DERMATO-VENEREOLOGICA, TAYLOR & FRANCIS LTD, UNITED KINGDOM, vol. 92, no. 3, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 269-275, XP008166048, ISSN: 0001-5555, DOI: 10.2340/00015555-1220, the whole document

BADIEE ET AL.: "Enhanced delivery of immunoliposomes to human dendritic cells by targeting the multilectin receptor DEC-205", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 25, 30 May 2007 (2007-05-30), pages 4757-4766, XP022098619, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2007.04.029, the whole document

GUO M. ET AL.: "A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells", HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 61, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 729-738, XP002319045, ISSN: 0198-8859, DOI: 10.1016/S0198-8859(00)00144-0, the whole document

EP-A1-2159291
EP-A1-2067486

(57) Изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, такой как лимфома, миелома, лейкоз, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи и рак кожи, который включает введение моноклонального антитела, которое связывается с LY75, конъюгированного с цитотоксической частью.

033649 B1

033649 B1

Введение

Настоящее изобретение относится к идентификации мембранного белка, ассоциированного со злокачественной опухолью, такой как лимфома, миелома, лейкоз, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи и/или рак кожи, который является пригодным в качестве терапевтической мишени для лечения злокачественных опухолей или в качестве маркера злокачественных опухолей. В частности, белок является биологической мишенью, против которой можно получать аффинные реагенты, включая терапевтические антитела или другие фармацевтические средства. Изобретение также относится к использованию таких аффинных реагентов для лечения и/или диагностики злокачественных опухолей.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Основные трудности при лечении злокачественной опухоли, такой как лимфома, миелома, лейкоз, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи и рак кожи, заключаются в повышении частоты ранней детекции, выявлении новых неинвазивных маркеров, которые можно использовать для наблюдения за прогрессированием заболевания и идентификации рецидива, и выявлении улучшенных и менее токсичных видов терапии, особенно для заболевания на более поздней стадии, при которой 5-летняя выживаемость все еще остается низкой. Существует большая потребность в идентификации мишеней, которые являются более специфическими для злокачественных клеток, например, мишеней, которые экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, таким образом, чтобы можно было воздействовать на них посредством новых перспективных подходов, таких как иммунотерапевтические средства и токсины направленного действия.

Лимфоцитарный антиген 75 действует как эндоцитируемый рецептор для антигенов, непосредственно захватываемых из внеклеточного пространства в специализированный компартмент обработки антигена, и полагают, что он вызывает снижение пролиферации В-лимфоцитов. Например, ранее не было описано присутствие лимфоцитарного антигена 75 на указанных выше злокачественных клетках, что является необходимым для демонстрации его пригодности в качестве мишени клеточной поверхности, например, для видов терапии злокачественной опухоли на основе антител.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к детекции лимфоцитарного антигена 75, далее в настоящем описании обозначаемого как LY75, в мембранных экстрактах тканей при различных заболеваниях, например лимфоме, миеломе, лейкозе, раке щитовидной железы, раке мочевого пузыря, раке молочной железы, раке желудка, раке пищевода, раке головы и шеи и рак кожи, далее в настоящем описании, обозначаемых как "заболевания по изобретению".

Дифференциальная экспрессия LY75 при различных злокачественных опухолях позволяет направленно воздействовать на белок с использованием видов терапии на основе аффинного реагента, например, антитела, для таких злокачественных опухолей. Таким образом, LY75 можно использовать при получении аффинных реагентов, включая антитела, которые специфически связываются с эпитопами на LY75, и можно на него направленно воздействовать посредством таких аффинных реагентов в качестве основы лечения. Аффинные реагенты, включая антитела, которые направленно воздействуют на белок на клеточной поверхности злокачественных клеток, можно применять для лечения злокачественной опухоли посредством различных механизмов, включая (i) лизис посредством комплемент-опосредованной или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), (ii) лизис посредством лекарственных средств или токсина(ов), конъюгированных с такими аффинными реагентами, или (iii) ингибирование физиологической функции такого белка, который может регулировать рост злокачественных клеток, например, через пути передачи сигнала. Важный аспект такого лечения на основе аффинного реагента заключается в том, что нормальный профиль экспрессии белка-мишени в отношении распределения в ткани и уровня экспрессии, является таким, что любое направленное воздействие на белок-мишень антителом в нормальных тканях не приводит к возникновению неблагоприятных побочных эффектов в результате связывания с нормальными тканями.

Изобретение относится к способу лечения или профилактики злокачественной опухоли, где LY75 экспрессируется в указанной злокачественной опухоли, который включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества аффинного реагента, который связывается с LY75.

Злокачественная опухоль предпочтительно представляет собой одно из заболеваний по изобретению.

Аффинные реагенты для применения в изобретении предпочтительно специфически связываются с LY75.

Аффинный реагент может представлять собой антитело, например целое антитело или его функциональный фрагмент, или миметик антитела. Предпочтительные аффинные реагенты включают антитела, например моноклональные антитела.

Аффинный реагент может представлять собой химерное антитело, антитело человека, гуманизованное антитело, одноцепочечное антитело, дефукозилированное антитело или биспецифическое антитело.

Функциональные фрагменты антител включают юнитело, доменное антитело или нанотело.

Миметики антител включают аффитело, DARPIn, антикалин, авимер, версатело или дуокалин.

Аффинные реагенты для применения в изобретении являются конъюгированными с терапевтической частью, такой как цитотоксическая молекула. Аффинный реагент может представлять собой конъюгат антитела и лекарственного средства или иммуноконъюгат.

Аффинный реагент может вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или может вызывать обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC). Аффинный реагент может индуцировать апоптоз злокачественных клеток, уничтожать или приводить к уменьшению числа злокачественных стволовых клеток и/или уничтожать или приводить к уменьшению числа циркулирующих злокачественных клеток. Аффинные реагенты могут модулировать физиологическую функцию LY75, ингибировать связывание лиганда с LY75 и/или ингибировать путь передачи сигнала, опосредованный LY75.

В любом из аспектов изобретения, указанных в настоящем описании, индивидуум может представлять собой человека.

В различных вариантах осуществления изобретения, описываемого в настоящем описании, конкретные типы злокачественной опухоли, которые можно упомянуть, представляют собой одно из заболеваний по изобретению.

В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой лимфому, например, неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, В-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), фолликулярную лимфому, лимфому мантийных клеток, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), Т-клеточную/богатую гистицином В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфоплазмоцитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическая крупноклеточная лимфома и/или ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, предпочтительно неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления изобретения лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак щитовидной железы.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак мочевого пузыря.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак молочной железы, предпочтительно трижды негативный рак молочной железы.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак желудка.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак пищевода.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак головы и шеи.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой рак кожи, например, меланому.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо детектировать, в отношении которой необходимо проводить профилактику или лечение, представляет собой множественную миелому.

Другие аспекты настоящего изобретения указаны ниже в настоящем описании и в формуле изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен анализ проточной цитометрии моноклональных антител против LY75, свидетельствующий о специфическом связывании этих антител с экспрессирующими LY75 клетками.

На фиг. 2a продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками NAMALWA с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2b продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками RAJI с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2c продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками HCC1143 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2d продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками HCC1806 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2e продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками MDA-MB-468 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2f продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками SW780 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2g продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками Kato III с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2h продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками SCC-9 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2i продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками AML-193 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2j продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками THP-1 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2k продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками RPMI 8226 с использованием анализа MabZAP.

На фиг. 2l продемонстрирована интернализация моноклональных антител против LY75 клетками OE-19 с использованием анализа MabZAP.

Подробное описание изобретения

Описанное подробно ниже изобретение включает введение терапевтических композиций индивидууму, например, являющемуся млекопитающим индивидууму, для лечения или профилактики злокачественной опухоли, например, заболевания по изобретению. Изобретение также относится к способам и композициям для клинического скрининга, диагностики и прогнозирования злокачественной опухоли, например заболевания по изобретению, у являющегося млекопитающим индивидуума для идентификации пациентов, которые с большой вероятностью будут реагировать на конкретное терапевтическое лечение, для мониторинга результатов терапии злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, для скрининга лекарственных средств и разработки лекарственных средств.

Изобретение основано на открытии, что белок LY75 экспрессируется в определенных злокачественных опухолях. В частности, подтверждающие данные включены в настоящее описание, которое демонстрирует экспрессию белка LY75 в плазматической мембране при раке мочевого пузыря, раке молочной железы, хроническом лимфоцитарном лейкозе, колоректальном раке, раке пищевода, раке щитовидной железы, раке желудка, раке головы и шеи, раке почки, немелкоклеточном раке легких, раке яичника, раке поджелудочной железы, раке кожи, мелкоклеточном раке легких и лимфоме. Иммуногистохимический анализ также демонстрирует специфическое окрашивание опухолевых клеток при раке поджелудочной железы, яичников, молочной железы, прямой кишки, пищевода, кожи, щитовидной железы и легких, а также при множественной миеломе и лимфомах ходжкинского и неходжкинского типов. Таким образом, антитела, направленные на LY75, могут являться пригодными в качестве терапевтических средств и диагностических средств при таких злокачественных опухолях и других типах злокачественной опухоли, для которых демонстрируют экспрессию LY75.

Как используют в настоящем описании, термин "индивидуум" относится к животному, предпочтительно млекопитающему. Являющийся млекопитающим индивидуум может представлять собой не являющееся человеком млекопитающее, но, как правило, представляет собой человека, такого как взрослый человек.

Индивидуум в основном представляет собой живого индивидуума. Однако, несмотря на то, что использования, способы и композиции по настоящему изобретению являются конкретно пригодными для скрининга, диагностики и прогнозирования у живого индивидуума, их также можно использовать для посмертного диагноза у индивидуума, например, для идентификации членов семьи, подвергающихся риску развития аналогичного заболевания.

Как используют в настоящем описании, термин "пациент" относится к индивидууму, который страдает, или подозревают, что он страдает одним или более заболеваний по изобретению.

Как используют в настоящем описании, термин "белок по изобретению" относится к лимфоцитарному антигену 75 (ID гена: 4065), который обозначают в настоящем описании как LY75. Было выявлено, что этот белок дифференциально экспрессируется в различных злокачественных опухолях, таким образом, представляя собой новую мишень для видов терапии на основе аффинности таких злокачественных опухолей. Последовательность человека белка LY75 приведена в SEQ ID NO: 1. Термин LY75 (в отношении белка) включает белки, аминокислотные последовательности которых состоят из или содержат аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, или их производные или варианты, в частности природные производные человека или их варианты.

Этот белок был идентифицирован в экстрактах мембранных белков образцов тканей злокачественных опухолей от пациентов со злокачественными опухолями способами и инструментальными средствами, описанными в примере 1 (например, посредством жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии экстрактов мембранных белков). Пептидные последовательности сравнивали с базами данных SWISS PROT и TrEMBL (принадлежащих the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) и the European Bioinformatics Institute (EBI), которые доступны на www.expasy.org), и идентифицировали запись O60449, лимфоцитар-

ный антиген 75 LY75. Нуклеотидная последовательность, кодирующая этот белок, найдена под номером доступа NM 002349, как приведено в SEQ ID NO: 2.

Согласно SWISS-PROT лимфоцитарный антиген 75 экспрессируется в селезенке, тимусе, толстой кишке и лимфоцитах периферической крови. Его детектировали в миелоидных линиях клеток и лимфоидных линиях В-клеток. Изоформы OGTA076b и OGTA076c экспрессируются в клетках злокачественной лимфомы Ходжкина, называемых клетками Ходжкина и Рид-Штернберга (HRS). LY75 действует как эндоцитируемый рецептор для прямого захвата антигенов из внеклеточного пространства в специализированный обрабатывающий антиген компартмент. Он вызывает пониженную пролиферацию В-лимфоцитов. Автор изобретения продемонстрировал, что LY75 экспрессируется в обоих типах ходжкинской и неходжкинской лимфомы, подтверждая, что виды терапии на основе аффинности, направленные против LY75, у пациентов, включая пациентов с такими и другими типами злокачественной опухоли, будут оказывать терапевтический эффект.

Иммуногистохимические эксперименты (см. пример 2) продемонстрировал специфическое окрашивание опухолевых клеток при раке поджелудочной железы, яичников, молочной железы, толстой кишки, пищевода, кожи, щитовидной железы и легких (немелкоклеточном), а также множественной миеломе и лимфомах, включая: диффузную В-крупноклеточную лимфому, В-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), фолликулярную лимфому, лимфому мантийных клеток, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), Т-клеточную/обогащенную гистидином В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммуобластную Т-клеточную лимфому. Последние злокачественные опухоли представляют собой предпочтительные заболевания по изобретению.

LY75 является пригодным, как и фрагменты, в частности содержащие эпитоп фрагменты, например, его антигенные или иммуногенные фрагменты и их производные, в частности фрагменты, содержащие внеклеточные домены (например, внеклеточные хвосты или петли) белка. Длина содержащих эпитоп фрагментов, включая антигенные или иммуногенные фрагменты, как правило, составляет 12 аминокислот или более, например 20 аминокислот или более, например 50 или 100 аминокислот или более. Фрагменты могут составлять 95% или более длины полного белка, например 90% или более, например 75 или 50%, или 25%, или 10% или более длины полного белка.

Альтернативно, белок/полипептид, применяемый или указанный в настоящем описании, может быть ограничен такими белками/полипептидами, конкретно перечисленными/описанными в настоящем описании, или вариантом или производным, которое обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотных последовательностей или сходством с ними. Процент идентичности/сходства аминокислотных последовательностей можно определять посредством любого подходящего алгоритма, например, BLAST, CLUSTAL, с использованием подходящих параметров по умолчанию.

Таким образом, термин "LY75" в отношении белка или полипептида относится к белку, аминокислотная последовательность которого состоит из или содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, или ее производному или варианту, который обладает по меньшей мере 90 или 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, и белок которой характеризуется по существу таким же распределением в тканях как LY75.

В отношении нуклеиновой кислоты термин "LY75" относится к нуклеиновой кислоте, нуклеотидная последовательность которой кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, или ее производное или вариант, который обладает по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, и белок которой характеризуется по существу таким же распределением в тканях как белок LY75.

Термин "LY75" в отношении нуклеиновой кислоты также относится к нуклеиновой кислоте, нуклеотидная последовательность которой содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, или ее производное или вариант, который обладает по меньшей мере 90 или 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 и который кодирует белок, который характеризуется по существу таким же распределением в тканях как белок LY75.

Содержащие эпитоп фрагменты LY75, включая антигенные или иммуногенные фрагменты, способен вызывать соответствующий иммунный ответ у пациента. ДНК, кодирующая LY75, также является пригодной, как и ее фрагменты, например, ДНК кодирующая фрагменты LY75, такие как его иммуногенные фрагменты. Фрагменты нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодирующей LY75, могут составлять 95% или более длины полной кодирующей области, например, 90% или более, например 75 или 50%, или 25%, или 10% или более длины полной кодирующей области. Длина фрагментов нуклеиновой кислоты (например, ДНК) может составлять 36 нуклеотидов или более, например, 60 нуклеотидов или более, например, 150 или 300 нуклеотидов или более.

Производные LY75 включают варианты последовательности, в которую была введена одна или более (например, 1-20, таких как 15 аминокислот, или до 20%, таких как 10 или 5%, или 1% от числа

аминокислот в пересчете на общую длину белка) делеций, вставок или замен. Замены, как правило, могут представлять собой консервативные замены. Производные, как правило, обладают по существу такой же биологической функцией как белок, из которого их получают. Производные, как правило, являются сопоставимо антигенными или иммуногенными с белком, из которого их получают. Производные, как правило, обладают лиганд-связывающей активностью или способностью образовывать активный рецепторный комплекс, или предпочтительно и той и другой белка, из которого их получают. Производные и варианты, как правило, характеризуется таким же распределением в ткани, как LY75.

Производные белков также включают химически обработанный белок, такой как карбоксиметилированные, карбоксиамидированные, ацетилированные белки, например, обработанные во время очистки.

В одном из аспектов изобретение относится к LY75 или композиции, содержащей LY75. Белок может находиться в выделенной или очищенной форме. Изобретение дополнительно относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей LY75, и композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую LY75.

Дополнительный аспект относится к композиции, способной вызывать иммунный ответ у индивидуума, где композиция содержит полипептид LY75 и/или один или более его антигенных или иммуногенных фрагментов и один или более подходящих носителей, эксципиентов, разбавителей или адъювантов (подходящие адъюванты описаны ниже).

Композиция, способная вызывать иммунный ответ, может быть предоставлена, например, в виде вакцины, содержащей полипептид LY75 или его производное или вариант, и/или один или более его антигенных или иммуногенных фрагментов, необязательно совместно с одним или более подходящих носителей, эксципиентов, разбавителей или адъювантов.

В другом аспекте изобретение относится к полипептиду LY75 или одному или более его фрагментов или производных, или вариантов для лечения или профилактики, например, одного или более заболеваний по изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к использованию полипептида LY75 или одного или более его фрагментов или производных, или вариантов для лечения или профилактики, например, одного или более заболеваний по изобретению.

Изобретение также относится к использованию полипептида LY75, одного или более его фрагментов или производных, или вариантов в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики, например, одного или более заболеваний по изобретению.

Один из аспектов относится к способу лечения, включающему введение терапевтически эффективного количества полипептида LY75, одного или более его фрагментов или производных, или вариантов, для лечения или профилактики, например, одного или более заболеваний по изобретению.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения или профилактики, например, заболеваний по изобретению у индивидуума, или вакцинации индивидуума, например, против одного или более заболеваний по изобретению, который включает стадию введения индивидууму эффективного количества полипептида LY75 и/или одного или более его антигенных или иммуногенных фрагментов или производных, или вариантов, например, в виде вакцины.

В другом аспекте изобретение относится к способам лечения, например, заболеваний по изобретению, включающим введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, которое модулирует (например, активирует или подавляет) или дополняет экспрессию или биологическую активность (или и то и другое) LY75 у пациентов, страдающих, например, заболеваниями по изобретению, с целью (а) предотвращения начала или развития, например, заболеваний по изобретению; (b) предотвращения прогрессирования, например, заболеваний по изобретению, или (с) улучшения состояния симптомов, например, заболеваний по изобретению.

В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретение относится к лекарственному средству, содержащему отдельно или совместно:

(a) LY75 и

(b) средство против злокачественной опухоли, для одновременного, последовательного или раздельного введения для лечения злокачественной опухоли, предпочтительно для лечения одного из заболеваний по изобретению.

LY75 можно использовать для детекции, прогнозирования, диагностики или мониторинга, например, заболеваний по изобретению, или для разработки лекарственного средства.

По другому аспекту изобретения авторы предоставляют способ детекции, диагностики и/или скрининга или мониторинга прогрессирования, например, заболеваний по изобретению, или мониторинга эффекта, например, лекарственного средства против злокачественной опухоли или терапии, направленной на заболевания по изобретению, у индивидуума, который включает детекцию наличия или уровня LY75 или одного или более его фрагментов, или наличия или уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия или уровня активности LY75, или который включает детекцию изменения их уровня у указанного индивидуума.

По другому аспекту изобретения авторы предоставляют способ детекции, диагностики и/или скрининга, например, заболеваний по изобретению, у индивидуума-кандидата, который включает детекцию

наличия LY75 или одного или более его фрагментов или наличия нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия активности LY75 у указанного индивидуума-кандидата, в котором (а) наличие повышенного уровня LY75 или указанного одного или более его фрагментов или повышенного уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия повышенного уровня активности LY75 у индивидуума-кандидата по сравнению с уровнем у здорового индивидуума или (б) наличие детектируемого уровня LY75 или указанного одного или более его фрагментов или детектируемого уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия детектируемого уровня активности LY75 у индивидуума-кандидата по сравнению с соответствующим недетектируемым уровнем у здорового индивидуума, указывает на наличие, например, заболеваний по изобретению у указанного индивидуума.

По другому аспекту изобретения авторы предоставляют способ мониторинга прогрессирования, например, заболеваний по изобретению у индивидуума, или мониторинга эффекта, например, лекарственного средства против злокачественной опухоли или терапии, направленной на заболевания по изобретению, который включает детекцию наличия LY75 или одного или более его фрагментов или наличия нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия активности у указанного индивидуума-кандидата в первый момент времени и в последний момент времени, наличия повышенного или сниженного уровня LY75 или указанного одного или более его фрагментов или повышенного или сниженного уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия повышенного или сниженного уровня активности LY75 у индивидуума в последний момент времени по сравнению с уровнем у индивидуума в указанный первый момент времени, указывающего на прогрессирование или регрессию, например, заболеваний по изобретению, или указывающего на эффект или отсутствие эффекта, например, лекарственного средства против злокачественной опухоли или терапии, направленной на заболевания по изобретению у указанного индивидуума.

Для LY75 детектируемый уровень, получаемый после анализа образца ткани от индивидуумов, страдающих, например, заболеваниями по изобретению, относительно детектируемого уровня, получаемого после анализа ткани от индивидуумов, не страдающих, например, заболеваниями по изобретению, зависит от конкретного аналитического протокола и способа детекции, который используют. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает, что в каждой лаборатории будут устанавливать эталонный диапазон у индивидуумов, не страдающих, например, заболеваниями по изобретению, в соответствии с аналитическим протоколом и используемым способом детекции, как является общепринятым в области диагностики. Предпочтительно в каждую партию тестируемых образцов, подлежащих анализу, включают по меньшей мере один контрольный положительный образец ткани от индивидуума, который, как известно, страдает, например, заболеваниями по изобретению, или по меньшей мере один контрольный отрицательный образец ткани от индивидуума, который, как известно, не страдает, например, заболеваниями по изобретению (и более предпочтительно положительный и отрицательный контрольные образцы).

В одном из аспектов изобретения используют анализ жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии или другие подходящие способы для анализа заболеваний по изобретению образцах в ткани от индивидуума, предпочтительно живого индивидуума для измерения экспрессии LY75 для скрининга или диагностики, например, заболеваний по изобретению, для определения прогноза заболеваний по изобретению у пациента, для мониторинга эффективности терапии заболеваний по изобретению или для разработки лекарственного средства.

В любом из указанных выше способов уровень, который можно детектировать у индивидуума-кандидата, который страдает злокачественной опухолью, например, заболеваниями по изобретению, является предпочтительно в 2 или более раз больше, чем уровень у здорового индивидуума.

В одном из вариантов осуществления изобретения для детекции LY75 образец ткани от индивидуума (например, индивидуума, предположительно страдающего заболеваниями по изобретению) анализируют посредством жидкостной хроматографией-масс-спектрометрией. Повышенное относительное содержание LY75 в ткани от индивидуума относительно ткани от индивидуума или индивидуумов, не страдающих заболеваниями по изобретению (например, контрольный образец), или у которых ранее определяли эталонный диапазон, указывает на наличие заболеваний по изобретению.

Применительно к фрагментам содержащие эпителиальные фрагменты, иммуногенные фрагменты или антигенные фрагменты LY75: для подходящих применений по отношению к злокачественной опухоли в одном из аспектов изобретения они содержат последовательность, идентифицированную как триптическая последовательность в примере 1.

Как используют в настоящем описании, LY75 "выделяют", когда он содержится в препарате, который по существу не содержит загрязняющих белков, т.е. препарате, в котором менее 10% (например, менее 5%, таких как менее 1%) всех содержащихся белков является загрязняющим белком(ами). Загрязняющий белок представляет собой белок, содержащий аминокислотную последовательность, значимо отличную от последовательности выделяемого LY75, как определяют масс-спектральным анализом. Как используют в настоящем описании, "значимо отличная" последовательность представляет собой последовательность, которая обеспечивает возможность разделения загрязняющего белка от LY75 масс-спектральным анализом, проводимым с соответствии с протоколом, описываемым в настоящем описании.

нии в примере 1.

В способах диагностики и прогнозирования по изобретению LY75 можно анализировать любым способом, известным специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, предпочтительные технологии, описываемые в настоящем описании, киназные анализы, ферментные анализы, анализы связывания и другие функциональные анализы, иммунологические анализы и вестерн-блоттинг.

Альтернативно, LY75 можно детектировать в иммунологическом анализе. В одном из вариантов осуществления иммунологический анализ проводят путем приведения образца от индивидуума, подлежащего тестированию, в контакт с антителом к LY75 (или другим аффинным реагентом) в таких условиях, что может происходить связывание (например, иммуноспецифическое связывание), если содержится LY75, и детекции или измерения количества любого связывания (например, иммуноспецифического связывания) со средством. Связывающиеся с LY75 средства можно получать способами и техниками, указанными в настоящем описании. В конкретном варианте осуществления LY75 анализируют с использованием иммуногистохимии.

LY75 можно детектировать преимущественно детекцией его фрагмента, например, его содержащего эпитоп (например, иммуногенный или антигенный) фрагмента. Длина фрагментов может составлять по меньшей мере 10, более характерно по меньшей мере 20 аминокислот, например по меньшей мере 50 или 100 аминокислот, например по меньшей мере 150 или 200 аминокислот, например по меньшей мере 300 или 500 аминокислот, например по меньшей мере 700 или 900 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления связывание аффинного реагента (например, антитела) в тканевых срезах можно использовать для детекции aberrантной локализации LY75 или aberrантного уровня LY75. В конкретном варианте осуществления антитело (или другой аффинный реагент) к LY75 можно использовать для анализа ткани пациента (например, лимфоидной ткани, ткани щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи) на уровень LY75, где aberrантный уровень LY75 является показателем заболевания по изобретению. Как используют в настоящем описании, "aberrантный уровень" означает уровень, который является увеличенным по сравнению с уровнем у индивидуума, не страдающего заболеваниями по изобретению, или эталонным уровнем.

Можно использовать любой подходящий иммунологический анализ, включая без ограничения системы конкурентного и неконкурентного анализа с использованием техник, таких как вестерн-блоттинг, радиоиммунологические анализы, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммунологические "сэндвич"-анализы, анализы иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, анализы на основе иммунодиффузии, анализы на основе агглютинации, анализы связывания комплемента, радиоиммунные анализы, флуоресцентные иммунологические анализы и иммунологические анализы с белком А. Например, LY75 можно детектировать в жидком образце (например, крови, моче или слюне) посредством двухстадийного сэндвич-анализа. На первой стадии для захвата LY75 используют захватывающий реагент (например, антитело против LY75 или другой аффинный реагент). Захватывающий реагент можно необязательно иммобилизовать на твердой фазе. На второй стадии для детекции захваченного LY75 используют прямо или опосредованно меченый реагент для детекции. В одном из вариантов осуществления реагент для детекции представляет собой лектин. Для этой цели можно использовать любой лектин, который предпочтительно связывается с LY75, а не с другими изоформами, которые содержат такой же коровый белок как LY75, или другими белками, которые содержат такую же антигенную детерминанту, распознаваемую антителом. В предпочтительном варианте осуществления выбираемый лектин связывается с LY75 по меньшей мере с аффинностью в 2 раза большей, более предпочтительно по меньшей мере с аффинностью в 5 раз большей, еще более предпочтительно по меньшей мере с аффинностью в 10 раз большей, чем с указанными другими изоформами, которые содержат такой же коровый белок как LY75, или с указанными другими белками, которые содержат такую же антигенную детерминанту, распознаваемую аффинным реагентом. На основании настоящего описания лектин, который является подходящим для детекции LY75, можно легко идентифицировать способами, хорошо известными в данной области, например, при тестировании одного или более лектинов перечисленных в табл. 1 на страницах 158-159 Sumar et al., *Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms*, In: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, *Lectins and Glycobiology*, at p. 158-174 (полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки). В альтернативном варианте осуществления реагент для детекции представляет собой антитело (или другой аффинный реагент), например, антитело, которое специфически (например, иммуноспецифически) детектирует другие посттрансляционные модификации, такие как антитело, которое иммуноспецифически связывается с фосфорилированными аминокислотами. Примеры таких антител включают антитела, которые связываются с фосфотирозином (BD Transduction Laboratories, каталожные № P11230-050/P11230-150, P11120, P38820, P39020), антитела, которые связываются с фосфосерином (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, каталожный № 61-8100), и антитела, которые связываются с фосфотреонином (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, каталожные № 71-8200, 13-9200).

При желании в анализах гибридизации также можно использовать ген, кодирующий LY75, родственный ген или родственные последовательности нуклеиновой кислоты или подпоследовательности, включая комплементарные последовательности. В качестве зонда для гибридизации можно использовать

нуклеотид, кодирующий LY75, или его подпоследовательности, содержащие по меньшей мере 8 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 12 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 15 нуклеотидов. Анализы гибридизации можно использовать для детекции, прогнозирования, диагностики или мониторинга состояний, нарушений или состояний болезни, связанных с aberrантной экспрессией гена, кодирующего LY75, или для дифференциальной диагностики у индивидуумов с признаками или симптомами позволяющими предполагать, например, заболеваний по изобретению. В частности, такой анализ гибридизации можно проводить способом, включающим приведение образца индивидуума, содержащего нуклеиновую кислоту, в контакт с зондом нуклеиновой кислоты, способным гибридизоваться с ДНК или РНК, кодирующей LY75, в таких условиях, что может проходить такая гибридизация, и детекцию или измерение любого результата гибридизации.

Таким образом, нуклеиновую кислоту, кодирующую LY75, (например, ДНК или более подходящую РНК) можно детектировать, например, с использованием гибридизирующегося средства (в частности олигонуклеотидного зонда), способного гибридизоваться с нуклеиновой кислотой, кодирующей LY75.

Один из таких иллюстративных способов включает: приведение одного или более олигонуклеотидных зондов, содержащих 10 или более последовательных нуклеотидов, комплементарных нуклеотидной последовательности, кодирующей LY75, в контакт с РНК, получаемой из биологического образца от индивидуума, или с кДНК, реплицированной с РНК, где указанное приведение в контакт происходит в условиях, которые обеспечивают гибридизацию зонда с нуклеотидной последовательностью, если она содержится; детекцию гибридизации при ее наличии между зондом и нуклеотидной последовательностью и сравнение гибридизации при ее наличии, детектируемой на стадии (b), с гибридизацией, детектируемой в контрольном образце, или с ранее определяемым эталонным диапазоном.

Изобретение также относится к диагностическим наборам, содержащим антитело против LY75 (или другой аффинный реагент). Кроме того, такой набор может необязательно содержать одно или более средств из указанных ниже:

(1) инструкций по использованию аффинного реагента против LY75 для диагностики, прогнозирования, терапевтического мониторинга или любой комбинации из этих применений;

(2) меченого партнера по связыванию с аффинным реагентом;

(3) твердой фазы (такой как индикаторная полоска), на которой иммобилизован аффинный реагент против LY75, и

(4) этикетки или вкладки, на которой указано одобрение контролирующих органов для использования в диагностике, прогнозировании или терапии или любом их сочетании. В случае, когда меченый партнер по связыванию с аффинным реагентом не предоставлен, сам аффинный реагент против LY75 может являться меченым детектируемым маркером, например, хемилюминесцентной, ферментативной, флуоресцентной или радиоактивной молекулой.

Изобретение также относится к набору, содержащему зонд на основе нуклеиновой кислоты, способный гибридизоваться с нуклеиновой кислотой, соответственно с РНК, кодирующей LY75. В конкретном варианте осуществления набор содержит один или более контейнеров, пару праймеров (например, каждый размером в диапазоне 6-30 нуклеотидов, более предпочтительно 10-30 нуклеотидов и еще более предпочтительно 10-20 нуклеотидов), которые в подходящих условиях реакции могут инициировать амплификацию, по меньшей мере, участка нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, таким образом, как посредством полимеразной цепной реакции (см., например, Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), лигазной цепной реакции (см. EP 320308) с использованием Qb-репликазы, циклической реакции с зондом или других известных в данной области способов.

Набор необязательно может дополнительно содержать predetermined количество LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, например, для применения в качестве стандарта или контроля.

Как используют в настоящем описании, термин "образец" включает жидкость организма (например, кровь, мочу или слюну) и биопсии ткани, получаемые у индивидуума, подвергающегося риску наличия одного или более заболеваний по изобретению, (например, биопсию, такую как биопсия лимфоидной ткани, щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи) или их гомогенат.

Например, используемый биологический образец может происходить из любого источника, такого как образец сыворотки или образец ткани, например, лимфоидной, щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи. Например, в случае поиска доказательств метастатических заболеваний по изобретению можно проводить поиск основных очагов метастазирования заболеваний по изобретению, например, лимфоузлы, селезенка, печень, желудок, кости, головной мозг, легкие, семенники и кожа в случае лимфомы; легкие и кости в случае рака щитовидной железы; кости, легкие, кожа и печень в случае рака мочевого пузыря; кости, печень и легкие в случае рака молочной железы; печень, легкие и кости в случае рака пищевода; печень, легкие головной мозг, кости, почки и поджелудочная железа в случае рака желудка; легкие, кости, печень и кожа в случае рака головы и шеи или легких, головной мозг и кости в случае рака кожи.

Альтернативно наличие LY75 или одного или более его фрагментов, или наличие нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия активности можно детектировать анализом *in situ*.

В определенных вариантах осуществления способы диагностики, описываемые в настоящем описании, можно, по меньшей мере, частично или полностью проводить *in vitro* или *ex vivo*.

Соответственно наличие LY75 или одного или более его фрагментов, или наличие нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличие активности детектируют количественно.

Например, количественная детекция может включать приведение биологического образца в контакт с аффинным реагентом, который является специфическим к LY75, где указанный аффинный реагент необязательно конъюгирован с детектируемой меткой, и детекцию происходит ли связывание между аффинным реагентом и по меньшей мере одной молекулой в образце, где указанную детекцию проводят прямо или опосредованно.

Альтернативно, наличие LY75 или одного или более его фрагментов, или наличие нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличие активности можно детектировать количественно средствами, предусматривающими использование способа визуализации.

В другом варианте осуществления способ по изобретению включает использование иммуногистохимии, например, для тканевых срезов лимфоидной ткани, щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи, для определения наличия LY75 или одного или более его фрагментов, или наличия нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, или наличия активности, и таким образом, для локализации, например, клеток, связанных с заболеваниями по изобретению.

В одном из вариантов осуществления детектируют наличие LY75 или один или более его содержащих эпитоп фрагментов, например, с использованием аффинного реагента, способного специфически связываться с LY75 или одним или более его фрагментов, такого как антитело.

В другом варианте осуществления детектируют активность LY75.

Использование в клинических исследованиях.

Способы диагностики и композиции по настоящему изобретению могут способствовать мониторингу клинического исследования, например, для оценки лекарственных средств для терапии заболеваний по изобретению. В одном из вариантов осуществления кандидатные молекулы тестируют на их способность восстанавливать уровни LY75 у индивидуума, страдающего, например, заболеваниями по изобретению, до уровней, обнаруживаемых у индивидуумов, не страдающих заболеваниями по изобретению, или получавшего лечение индивидуума, сохранять уровни LY75 при значениях при отсутствии лимфомы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака пищевода, рака головы и шеи и рака кожи или около них.

В другом варианте осуществления способы и композиции по настоящему изобретению используют для скрининга кандидатов для клинического исследования для идентификации индивидуумов, страдающих, например, заболеваниями по изобретению; затем таких индивидуумов можно исключать из исследования или можно помещать в отдельную когорту для лечения или анализа.

Получение белка по изобретению и соответствующей нуклеиновой кислоты.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения или профилактики, например, заболеваний по изобретению, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в таком лечении или профилактике, терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75 или один или более его фрагментов или производных, например, в форме вакцины.

Другой аспект относится к способу лечения или профилактики, например, заболеваний по изобретению, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в таком лечении или профилактике, терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, которая ингибирует функцию или экспрессию LY75.

Способы (и/или другие аспекты ДНК, описываемые в настоящем описании) по изобретению, например, могут включать такие, где нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую нуклеиновую кислоту или рибозим LY75.

Таким образом, изобретение относится к использованию нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75 или один или более его фрагментов или производных, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики, например, заболеваний по изобретению.

Также предусмотрено использование нуклеиновой кислоты, которая ингибирует функцию или экспрессию LY75, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики, например, одного или более заболеваний по изобретению.

Применяемую в настоящем изобретении ДНК можно получать выделением в виде фрагмента кДНК из библиотек кДНК с использованием в качестве исходных веществ коммерческих иРНК и определением и идентификацией их нуклеотидных последовательностей. Другими словами, в частности, из библиотек кДНК в случайном порядке выделяют клоны, которые получают в соответствии со способом Ohara et al. (DNA Research, Vol. 4, 53-59 (1997)). Затем посредством гибридизации удаляют дублированные клоны (которые неоднократно встречаются), а затем проводят транскрипцию и трансляцию *in vitro*. Определяют нуклеотидные последовательности обоих концов клонов, для которых подтверждают продукты 50 кДа или более.

Кроме того, в базах данных известных генов проводят поиск гомологии с использованием, получаемых таким образом концевых нуклеотидных последовательностей в качестве запросов.

В дополнение к указанному выше способу 5'- и 3'-концевые последовательности кДНК являются родственными геномной последовательности человека. Затем подтверждают неизвестный длинноцепочечный ген в области между последовательностями и анализируют кДНК по всей длине. Таким образом, можно систематически клонировать неизвестный ген, который невозможно получать общепринятым способом клонирования, который рассчитан на известные гены.

Кроме того, все области гена человека, содержащего ДНК по настоящему изобретению также можно получать с использованием способа ПЦР, такого как RACE, при этом уделяя достаточно внимания предотвращению возникновения искусственных ошибок в коротких фрагментах или получаемых последовательностях. Как описано выше, можно получать клоны, содержащие ДНК по настоящему изобретению.

В других способах клонирования ДНК по настоящему изобретению получают синтетический ДНК-праймер, содержащий соответствующую нуклеотидную последовательность участка полипептида по настоящему изобретению с последующей амплификацией способом ПЦР с использованием подходящей библиотеки. Альтернативно, отбор можно проводить путем гибридизации ДНК по настоящему изобретению с ДНК, которую вводили в соответствующий вектор и метили фрагментом ДНК или синтетической ДНК, кодирующей такую же или все области полипептида по настоящему изобретению. Гибридизацию можно проводить, например, способом, описанным в *Current Protocols in Molecular Biology* (под редакцией Frederick M. Ausubel et al., 1987). ДНК по настоящему изобретению может представлять собой любую ДНК при условии, что они содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, как описано выше. Такая ДНК может представлять собой кДНК, идентифицированную и выделяемую из библиотек кДНК или т.п., которые получают из лимфоидной ткани, ткани щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи. Такая ДНК также может представлять собой синтетическую ДНК или т.п. Векторы для применения при конструкции библиотеки могут представлять собой любой из бактериофагов, плазмид, космид, фагмид или т.п. Кроме того, с использованием фракции тотальной РНК или фракции иРНК, получаемой из указанных выше клеток и/или тканей, можно проводить амплификацию прямой полимеразной цепной реакцией в сочетании с обратной транскрипцией (далее в настоящем описании сокращенно обозначаемой как "способ RT-ПЦР").

ДНК, кодирующую указанный выше полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по существу является идентичной аминокислотной последовательности LY75, или ДНК, кодирующую указанный выше полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, получаемой из аминокислотной последовательности LY75 в результате делеции, замены или добавления одной или более аминокислот, содержащих участок аминокислотной последовательности, можно легко получать соответствующей комбинацией, например, способом сайт-специфического мутагенеза, способом гомологичной рекомбинации генов, способом удлинения праймера и способом ПЦР, известными специалистам в данной области. Кроме того, в настоящее время возможным способом получения того, что полипептид обладает по существу эквивалентной биологической активностью, является замена гомологичных аминокислот (например, полярных и неполярных аминокислот, гидрофобных и гидрофильных аминокислот, положительно заряженных и отрицательно заряженных аминокислот и ароматических аминокислот) среди аминокислот, составляющих полипептид. Кроме того, для сохранения по существу эквивалентной биологической активности аминокислоты в функциональных доменах, содержащихся в полипептиде по настоящему изобретению, предпочтительно являются консервативными.

Кроме того, примеры ДНК по настоящему изобретению включают ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность LY75, и ДНК, гибридизующуюся в жестких условиях с ДНК и кодирующую полипептид (белок) с биологической активностью (функцией), эквивалентной функции полипептида, состоящего из аминокислотной последовательности LY75. При таких условиях, пример такой ДНК, способной гибридизоваться с ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность LY75, представляет собой ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая обладает степенью общей средней гомологии с нуклеотидной последовательностью ДНК, такой как приблизительно 80% или более, предпочтительно приблизительно 90% или более и более предпочтительно приблизительно 95% или более. Гибридизацию можно проводить известным в данной области способом, таким как способ, описанный в *Current Protocols in Molecular Biology* (под редакцией Frederick M. Ausubel et al., 1987), или соответствующим ему способом. В настоящем описании "жесткие условия" представляют собой, например, условия приблизительно "1×SSC, 0,1% SDS и 37°C, более жесткие условия приблизительно "0,5×SSC, 0,1% SDS и 42°C, или еще более жесткие условия приблизительно "0,2×SSC, 0,1% SDS и 65°C. При использовании более жестких условий гибридизации можно ожидать выделения ДНК с высокой степенью гомологии с последовательностью. Указанные выше комбинации условий SSC, SDS и температуры приведены только в иллюстративных целях. Для определения условий жесткости гибридизации специалисты в данной области могут получать жесткость, аналогичную указанной, с использованием подходящей комбинации указанных выше факторов или других факторов (например, концентрации зонда, длины зонда и времени реакции гибридизации).

Клонированную ДНК по настоящему изобретению можно использовать непосредственно или при желании использовать после расщепления рестрикционным ферментом или добавления линкера в зависимости от целей. ДНК может содержать АТГ в качестве кодона инициации трансляции на стороне 5'-конца и содержать ТАА, ТГА или TAG в качестве кодона терминации трансляции на стороне 3'-конца. Эти кодоны инициации трансляции и терминации трансляции также можно добавлять с использованием соответствующего синтетического ДНК-адаптера.

В способе/применениях по изобретению LY75, например, можно предоставлять в выделенном виде, такой как в случае, когда полипептид LY75 очищали, по меньшей мере, до определенной степени. Полипептид LY75 можно предоставлять по существу в очищенном виде, другими словами, в достаточной степени не содержащей другие белки. Полипептид LY75 также можно получать рекомбинантными способами, синтетически получать или получать путем комбинации этих способов. LY75 можно легко получать любым способом, известным специалистам в данной области, который включает получение экспрессирующего вектора, содержащего соответствующую ДНК по настоящему изобретению или ген, содержащий ДНК по настоящему изобретению, культивирование трансформанта, трансформированного с использованием экспрессирующего вектора, получение и накопление соответствующего полипептида по настоящему изобретению или рекомбинантного белка, содержащего полипептид, а затем сбор продукта.

Рекомбинантный полипептид LY75 можно получать хорошо известными в данной области способами из генетически сконструированных клеток-хозяев, содержащих экспрессирующие системы. Таким образом, настоящее изобретение также относится к экспрессирующим системам, которые содержат полипептид LY75 или нуклеиновую кислоту, к клеткам-хозяевам, которые генетически конструируют с такими экспрессирующими системами, и к получению полипептида LY75 рекомбинантными способами. Для получения рекомбинантного полипептида LY75 клетки-хозяева можно генетически конструировать, чтобы встраивать экспрессирующие системы или их участки для нуклеиновых кислот. Такое встраивание можно проводить хорошо известными в данной области способами, такими как, трансфекция с использованием фосфата кальция, опосредованная DEAD-декстраном трансфекция, трансфекция, микроинъекция, опосредованная катионными липидами трансфекция, электропорация, трансдукция, введение при соскабливании, баллистическая интродукция или инфекция (см., например, Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986 и Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

В качестве клеток-хозяев используют, например, бактерии рода *Escherichia*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces*, бактерии рода *Bacillus*, дрожжи, клетки *Aspergillus*, клетки насекомых, насекомых и клетки животных. Конкретные примеры бактерий рода *Escherichia*, которые используют в настоящем описании, включают *Escherichia coli* K12 и DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 60, 160 (1968)), JM103 (*Nucleic Acids Research*, Vol. 9, 309 (1981)), JA221 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 120, 517 (1978)) и HB101 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 41, 459 (1969)). В качестве бактерий рода *Bacillus* используют, например, *Bacillus subtilis* M114 (*Gene*, Vol. 24, 255 (1983)) и 207-21 (*Journal of Biochemistry*, Vol. 95, 87 (1984)). В качестве дрожжей используют, например, *Saccaromyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D и 20B-12, *Schizosaccaromyces pombe* NCYC1913 и NCYC2036 и *Pichia pastoris*. В качестве клеток насекомых используют, например, клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9. В качестве клеток животных используют, например, клетки обезьяны COS-7 и Vero, клетки китайского хомяка CHO (далее в настоящем описании сокращенно обозначаемые как клетки CHO), дефектные по гену *dhfr* клетки CHO, L-клетки мыши, клетки AtT-20 мыши, миеломные клетки мыши, клетки GH3 крысы, клетки FL человека, COS, HeLa, C127, 3T3, HEK 293, ВНК и меланомные клетки Bowes.

Для получения рекомбинантных полипептидов также можно использовать бесклеточные системы трансляции (например, лизат ретикулоцитов кролика, лизат зародышей пшеницы, наборы для транскрипции и трансляции SP6/T7 *in vitro* T&T и RTS 100 E. Coli NY от Roche Diagnostics Ltd., Lewes, UK и систему сопряженной транскрипции/трансляции TNT Quick от Promega UK, Southampton, UK).

Экспрессирующий вектор можно получать известным в данной области способом. Например, вектор можно получать (1) вырезанием фрагмента ДНК, содержащего ДНК по настоящему изобретению, или гена, содержащего ДНК по настоящему изобретению, и (2) лигированием фрагмента ДНК ниже промотора в подходящий экспрессирующий вектор. Можно использовать широкий спектр экспрессирующих систем, таких как и без ограничения, системы хромосомные, эписомальные и получаемые из вируса системы, например, плазмиды, получаемые из *Escherichia coli* (например, pBR322, pBR325, pUC18 и pUC118), плазмиды, получаемые из *Bacillus subtilis* (например, pUB110, pTP5 и pC194), из бактериофага, из транспозонов, из эписом дрожжей (например, pSH19 и pSH15), из перемещающихся встроенных элементов, из хромосомных элементов дрожжей, из вирусов, таких как бакуловирусы, паповавирусы, таких как SV40, вирусов оспавакцины, аденовирусов, вирусов оспы птиц, вирусов псевдобешества и ретровирусов, и векторов, получаемых из их сочетаний, таких как сочетания, получаемые из генетических элементов плазмиды и бактериофага (такого как фаг [лямбда]), такие как космиды и фагмиды. Экспрессирующие системы могут содержать контролирующие области, которые регулируют, а также индуцируют экспрессию. Промоторы, которые следует использовать в настоящем изобретении, могут представлять собой любые промоторы при условии, что они являются подходящими для хозяев, используемых для

экспрессии гена. Например, когда хозяин представляет собой *Escherichia coli*, предпочтительными являются промотор *trp*, промотор *lac*, промотор *gcsA*, промотор *pL*, промотор *lpp* и т.п. Когда хозяин представляет собой *Bacillus subtilis*, предпочтительными являются промотор *SPO1*, промотор *SPO2*, промотор *repP* и т.п. Когда хозяин представляет собой дрожжи, предпочтительными являются промотор *PHO5*, промотор *PGK*, промотор *GAP*, промотор *ADH* и т.п. Когда в качестве хозяина используют животную клетку, примеры промоторов для применения в этом случае включают промотор *SRa*, промотор *SV40*, промотор *LTR*, промотор *CMV* и промотор *HSV-ТК*. Как правило, можно использовать любую систему или вектор, которая способна поддерживать, обеспечивать размножение или экспрессию нуклеиновой кислоты для продукции полипептида в хозяине.

Подходящую последовательность нуклеиновой кислоты можно вводить в экспрессирующую систему любым видом из хорошо известных и общепринятых способов, таких как способы, указанные у Sambrook et al., выше. В полипептид LY75 можно вводить подходящие сигналы секреции для обеспечения секреции транслируемого белка в просвет эндоплазматического ретикулума, периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Эти сигналы могут являться эндогенными по отношению к полипептиду LY75, или они могут представлять собой гетерологичные сигналы.

Трансформацию клеток-хозяев можно проводить известными в данной области способами. Например, следующие документы можно отнести к Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 69, 2110 (1972); Gene, Vol. 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111 (1979); Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, 1929 (1978); Cell Technology, separate volume 8, New Cell Technology, Experimental Protocol. 263-267 (1995) (издаваемый Shujunsha) и Virology, Vol. 52, 456 (1973). Таким образом, получаемый трансформант, трансформированный экспрессирующим вектором, содержащим ДНК по настоящему изобретению, или ген, содержащий ДНК по настоящему изобретению, можно культивировать известным в данной области способом. Например, когда хозяева представляют собой бактерии рода *Escherichia*, бактерии, как правило, культивируют при приблизительно от 15 до 43°C в течение приблизительно от 3 до 24 ч. При необходимости также можно проводить аэрацию или перемешивание. Когда хозяева представляют собой бактерии рода *Bacillus*, бактерии, как правило, культивируют при приблизительно от 30 до 40°C в течение приблизительно от 6 до 24 ч. При необходимости также можно проводить аэрацию или перемешивание. Когда культивируют трансформанты, хозяевами которых являются дрожжи, культивирование, как правило, проводят при приблизительно от 20 до 35°C в течение приблизительно от 24 до 72 ч с использованием среды с рН, доводимым до приблизительно от 5 до 8. При необходимости также можно проводить аэрацию или перемешивание. Когда культивируют трансформанты, хозяевами которых являются животные клетки, клетки, как правило, культивируют при приблизительно от 30 до 40°C в течение приблизительно от 15 до 60 ч с использованием среды с рН, доводимым до приблизительно от 6 до 8. При необходимости также можно проводить аэрацию или перемешивание.

Если полипептид LY75 необходимо экспрессировать для применения в анализах скрининга на основе клеток, предпочтительно чтобы полипептид продуцировался на клеточной поверхности. В этом случае клетки можно собирать перед использованием в анализах скрининга. Если полипептид LY75 секретируется в среду, для выделения указанного полипептида можно собирать среду. В случае внутриклеточной продукции, перед тем, как выделять LY75, клетки необходимо сначала лизировать.

Полипептид LY75 можно выделять и очищать из культур рекомбинантных клеток или из других биологических источников хорошо известными способами, включая, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, аффинную хроматографию, хроматографию на основе гидрофобных взаимодействий, хроматографию на гидроксипатите, гель-хроматографию, способы центрифугирования, способы электрофореза и хроматографию на лектине. В одном из вариантов осуществления используют комбинацию этих способов. В другом варианте осуществления используют высокоэффективную жидкостную хроматографию. В дополнительном варианте осуществления можно использовать антитело, которое специфически связывается с полипептидом LY75, для элиминации указанного полипептида из раствора, содержащего полипептид LY75, или для очистки указанного полипептида.

Для разделения и очистки полипептида или белка по настоящему изобретению от продуктов культивирования, например, после культивирования, известным способом собирают тела или клетки микроорганизмов, их суспендируют в подходящем буфере, разрушают тела или клетки микроорганизмов, например, ультразвуковыми волнами, лизоцимами и/или замораживанием-оттаиванием, затем получаемый продукт подвергают центрифугированию или фильтрации, а затем можно получать неочищенный экстракт белка. Буфер также может содержать денатурирующее белок средство, такое как мочевины или гидрохлорид гуанидина, или поверхностно-активное вещество, такое как Triton X-100(ТМ). Когда белок секретируется в культуральный раствор, после завершения культивирования тела или клетки микроорганизмов и супернатант разделяют известным способом, а затем собирают супернатант. Белок, содержащийся в таком образце получаемом культуральном супернатанте или экстракте, можно очищать подходящей комбинацией известных способов разделения и очистки. Получаемый таким образом полипептид (белок) по настоящему изобретению можно преобразовывать в соль известным способом или соответст-

вующим ему способом. Наоборот, когда полипептид (белок) по настоящему изобретению получают в форме соли, его можно преобразовывать в свободный белок или пептид или другую соль известным способом или соответствующим ему способом. Кроме того, к белку, продуцируемому рекомбинантом, применяют соответствующий модифицирующий белок фермент, такой как трипсин или химотрипсин, до очистки или после нее, таким образом, чтобы можно было произвольно добавлять модификацию или можно было частично удалять полипептид. Наличие полипептида (белка) по настоящему изобретению или его соли можно измерять различными анализами связывания, иммуноферментными анализами с использованием специфических антител и т.п.

Для рефолдинга с преобразованием нативных или активных конформаций полипептида LY75 можно использовать хорошо известные в данной области способы, когда полипептид подвергался денатурации во время выделения и/или очистки. В контексте настоящего изобретения полипептид LY75 можно получать из биологического образца из любого источника, такого как и без ограничения образца крови или образца ткани, например, образца лимфоидной ткани, ткани щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи.

Полипептид LY75 может находиться в форме "зрелого белка" или может представлять собой часть более крупного белка, такого как слитый белок. Как правило, предпочтительно вводить дополнительную аминокислотную последовательность, которая содержит секреторные или лидерные последовательности, пре-, про- или препоследовательности белка, или последовательность, которая облегчает очистку, такая как аффинная метка, например, но без ограничения, множественные гистидиновые остатки, метка FLAG, метка HA или метка мус. LY75 можно, например, подвергать слиянию с гетерологичным партнером по слиянию, таким как белок поверхности, известный как белок D из гемофильной инфекции гриппа B, неструктурного белка из вируса гриппа, такого как NS1, антиген S из гепатита B или белок, известный как LYTA, такой как его C-конец.

Также можно использовать дополнительную последовательность, которая может обеспечивать стабильность во время рекомбинантной продукции. Такие последовательности можно необязательно удалять по мере необходимости введением расщепляемой последовательности в качестве дополнительной последовательности или ее части. Таким образом, полипептид LY75 можно подвергать слиянию с другими молекулами, включая другие полипептиды или белки (например, глутатион-S-трансферазу и белок A). Такой слитый белок можно расщеплять с использованием подходящей протеазы, а затем разделять на каждый белок. Такие дополнительные последовательности и аффинные метки хорошо известны в данной области. В дополнение к указанным выше к экспрессирующему вектору при желании можно добавлять известные в данной области элементы, такие как энхансер, сигнал сплайсинга, сигнал добавления полиА, селективный маркер и точку начала репликации SV40.

В одном из аспектов изобретение относится к средству, способному специфически связываться с LY75 или его фрагментом или к гибридизирующемуся средству, способному гибридизироваться с нуклеиновой кислотой, кодирующей LY75, или к средству, способному детектировать активность LY75, для применения в лечении, скрининге, детекции и/или диагностике заболеваний, таких как злокачественная опухоль, и особенно заболеваний по изобретению.

Получение аффинных реагентов к LY75.

В одном из аспектов изобретение относится к аффинному или иммуноаффинному реагенту, который способен специфически связываться с LY75 или его фрагментом, например, аффинному реагенту, который содержит или конъюгирован с детектируемой меткой, или содержит или конъюгирован с терапевтической частью, такой как цитотоксическая молекула. Аффинный реагент может представлять собой, например, антитело.

В одном из вариантов осуществления аффинный реагент для применения в изобретении может связываться с эпитопом на LY75, например, одной или более частей SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления аффинный реагент для применения в изобретении может связываться с эпитопом на внеклеточном домене LY75, например, одной или более частей SEQ ID NO: 53.

Согласно специалистам в данной области существует три основных типа иммуноаффинного реагента - моноклональные антитела, фаговый дисплей антител и небольшие получаемые из антител молекулы, такие как аффитела, доменные антитела (dAb), нанотела, юнитела, DARPin, антикалин, дуокалин, авимер или версатела. В основном при применениях по настоящему изобретению, где указано применение антител, можно применять другие аффинные реагенты (например, аффитела, доменные антитела, нанотела, юнитела, DARPin, антикалины, дуокалины, авимеры или версатела). Можно сказать, что такие вещества способны иммуноспецифически связываться с LY75. При необходимости термин "аффинный реагент" следует толковать как включающий иммуноаффинные реагенты и другие вещества, способные специфически связываться с LY75, включая, но не ограничиваясь ими, лиганды, лектины, стрептавидины, миметики антител и синтетические связывающие средства.

Получение антитела к LY75.

По изобретению LY75, аналог LY75, родственный LY75 белок или фрагмент, или производное любого из указанных выше можно использовать в качестве иммуногена для получения антител, которые иммуноспецифически связываются с таким иммуногеном. Такие иммуногены можно выделять любыми

подходящими средствами, включая описанные выше способы. Как используют в настоящем описании термин "антитело" относится к пептиду или полипептиду, получаемому из, моделируемому или по существу кодируемому геном иммуноглобулина или генами иммуноглобулинов, или его фрагментам, способным специфически связываться с антигеном или эпитопом. См., например, *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994), *J. Immunol. Methods*, 175:267-273; Yarmush (1992), *J. Biochem. Biophys. Methods*, 25:85-97. Термин антитело включает антигенсвязывающие части, т.е. "антигенсвязывающие участки" (например, фрагменты, подпоследовательности, определяющие комплементарность области (CDR)), которые сохраняют способность связываться с антигеном, включая (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989), *Nature*, 341:544-546), который состоит из домена VH, и (vi) выделенной определяющей комплементарности области (CDR). Одноцепочечные антитела также являются включенными посредством ссылки на термин "антитело". Антитела по изобретению включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, биспецифические, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab и фрагменты F(ab')₂, фрагменты, получаемые посредством экспрессионной библиотеки Fab, антиидиотипические (anti-Id же) антитела и связывающиеся с эпитопом фрагменты любого из указанных выше. Молекулы иммуноглобулина по изобретению могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA, такому как IgG) или подклассам молекулы иммуноглобулина.

Термин "специфически связывается" или "связывается специфически" (или "иммуноспецифически связывается") не предназначен для указания на то, что антитело связывается только со своей предполагаемой мишенью. Наоборот, антитело "специфически связывается", если его аффинность для его предполагаемой мишени, как правило, является приблизительно в 5 раз больше по сравнению с его аффинностью к молекуле-немишени. Соответственно, существует незначительная перекрестная реакция или перекрестное связывание с нежелательными веществами, в частности природными белками или тканями здорового индивидуума или животного. Предпочтительно аффинность антитела является по меньшей мере приблизительно в 5 раз, предпочтительно в 10 раз, более предпочтительно в 25 раз, даже более предпочтительно в 50 раз и наиболее предпочтительно в 100 раз или более выше для молекулы-мишени по сравнению с его аффинностью для молекулы-не мишени. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание между антителом или другим связывающим средством и антигеном означает аффинность связывания по меньшей мере 10^6 M^{-1} . Антитела могут связываться, например, с аффинностями по меньшей мере приблизительно 10^7 M^{-1} и предпочтительно приблизительно от 10^8 M^{-1} приблизительно до 10^9 M^{-1} , приблизительно от 10^9 M^{-1} приблизительно до 10^{10} M^{-1} или приблизительно от 10^{10} M^{-1} приблизительно до 10^{11} M^{-1} .

Аффинность вычисляют как $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} представляет собой константу скорости диссоциации, k_{on} представляет собой константу скорости ассоциации и K_d представляет собой константу равновесия). Аффинность можно определять при равновесном состоянии путем измерения связанной фракции (r) меченого лиганда при различных концентрациях (c). Данные представляют графически с использованием уравнения Скэтчарда:

$$r/c = K(n-r),$$

где r = моль связавшегося лиганда/моль рецептора в состоянии равновесия;

c = концентрация свободного лиганда в состоянии равновесия;

K = равновесная константа ассоциации и

n = число участков связывания лиганда на молекулу рецептора.

Графическим анализом r/c наносят на график по оси y в зависимости от r по оси x , таким образом, получая график Скэтчарда. Аффинность представляет собой отрицательный наклон кривой. k_{off} можно определять по конкуренции связанного меченого лиганда с немеченым избыточным лигандом (см., например, патент США № 6316409). Аффинность средства с направленным воздействием к своей молекуле-мишени составляет, например, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} моль/л, такой как по меньшей мере приблизительно 1×10^{-7} моль/л, такой как по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} моль/л, в частности по меньшей мере приблизительно 1×10^{-9} моль/л и конкретно по меньшей мере приблизительно 1×10^{-10} моль/л. Измерение аффинности антитела анализом Скэтчарда, хорошо известными в данной области, см., например, van Erp et al., *J. Immunoassay*, 12: 425-43, 1991; Nelson and Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.*, 27:65-8, 1988.

В одном из вариантов осуществления можно использовать любые общедоступные антитела, которые распознают продукты генов, кодирующих LY75. В другом варианте осуществления известные специалистам в данной области способы используют для получения антител, которые распознают LY75, аналог LY75, родственный LY75 полипептид или фрагмент, или производное любого из указанных выше. Специалисту в данной области будет понятно, что многие способы являются доступными для получения антител, например, как описано в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Специалисту в данной области также будет по-

нятно, что связывающиеся фрагменты или фрагменты Fab, которые имитируют антитела, также можно получать на основании генетической информации различными способами (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)).

В одном из вариантов осуществления изобретения получают антитела к конкретному домену LY75. В конкретном варианте осуществления гидрофильные фрагменты LY75 используют в качестве иммуногенов для получения антител.

При получении антител скрининг на желаемое антитело можно проводить известными в данной области способами, например, ELISA (твердофазным иммуноферментным анализом). Например, для отбора антител, которые распознают конкретный домен LY75, можно анализировать получаемые гибридомы на продукт, который связывается с фрагментом LY75, содержащим такой домен. Для отбора антитела, которое специфически связывается с первым гомологом LY75, но которое не связывается специфически (или связывается с меньшей авидностью) со вторым гомологом LY75, можно проводить отбор на основе положительного связывания с первым гомологом LY75 и отсутствия связывания (или сниженного связывания) со вторым гомологом LY75. Аналогично, для отбора антитела, которое специфически связывается с LY75, но которое не связывается специфически (или связывается с меньшей авидностью) с другой изоформой одного и того же белка (такой как другая гликоформа, содержащая такой же коровый пептид как LY75), можно проводить отбор на основании положительного связывания с LY75 и отсутствия связывания (или сниженного связывания) с другой изоформой (например, другой гликоформой). Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу (такому как моноклональное антитело), которое связывается с большей аффинностью (например, по меньшей мере в 2 раза, такой как по меньшей мере в 5 раз, в частности по меньшей мере в 10 раз большей аффинностью) с LY75 по сравнению с другой изоформой или изоформами (например, гликоформами) LY75.

Поликлональные антитела, которые можно использовать в способах по изобретению, представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, получаемых из сыворотки иммунизированных животных. Также можно использовать нефракционированную иммунную сыворотку. Различные известные в данной области способы можно использовать для получения поликлональных антител к LY75, фрагменту LY75, родственному LY75 полипептиду или фрагменту родственного LY75 полипептида. Например, один из путей заключается в очистке представляющих интерес полипептидов или в синтезе представляющих интерес полипептидов с использованием, например, хорошо известных в данной области способов твердофазного пептидного синтеза. См., например, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol., Vol 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull., (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull., (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Затем выбранные полипептиды можно использовать для иммунизации посредством инъекции различным животным-хозяевам, включая, но не ограничиваясь ими, кроликов, мышей, крыс и т.д., для получения поликлональных или моноклональных антител. Если LY75 очищают электрофорезом в геле, LY75 можно использовать для иммунизации с предварительной экстракцией из полиакриламидного геля или без нее. Для усиления иммунного ответа можно использовать различные адъюванты (т.е. иммуностимуляторы), в зависимости от вида хозяина, включая, но не ограничиваясь ими, полный или неполный адъювант Фрейнда, минеральный гель, такой как гидроксид алюминия, поверхностно-активное вещество, такое как лизолецитин, полиол-плюроник, полианион, пептид, масляную эмульсию, гемоцианин морского блюдца, динитрофенол и адъювант, такой как BCG (бацилла Кальмета-Герена) или *Corynebacterium parvum*. Дополнительные адъюванты также хорошо известны в данной области.

Для получения моноклональных антител (mAb), направленных на LY75, фрагмент LY75, родственного LY75 полипептид, или фрагмент родственного LY75 полипептида, можно использовать любой способ, который обеспечивает получение молекул антител посредством стабильных линий клеток при культивировании. Например, гибридомный способ первоначально разработали Kohler and Milstein (1975, Nature, 256:495-497), а также триомный способ, способ с В-клеточной гибридомой человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) и способ с EBV-гибридомой для получения моноклональных антител человека (Cole et al., 1985, в Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., p. 77-96). Такие антитела могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и любой их подкласс. Гибридоме, продуцирующую mAb по изобретению, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. В дополнительном варианте осуществления изобретения моноклональные антитела можно получать в стерильных животных с использованием известной технологии (PCT/US90/02545, включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Моноклональные антитела включают, но не ограничиваются ими, моноклональные антитела человека и химерные моноклональные антитела (например, химеры человека-мыши). Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные участки получают от различных видов животных, такую как молекулы, содержащие константную область иммуноглобулина человека и переменную область, получаемую из mAb мыши, (см., например, Cabilly et al., патент США № 4816567 и Boss et al., патент США № 4816397, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). Гума-

низированные антитела представляют собой молекулы антител от не являющихся человеком видов, содержащие одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) от не являющихся человеком видов и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека, (см., например, Queen, патент США № 5585089, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Химерные и гуманизированные моноклональные антитела можно получать известными в данной области технологиями рекомбинантной ДНК, например, способами, описанными в публикации PCT № WO 87/02671; европейской патентной заявке 184187; европейской патентной заявке 171496; европейской патентной заявке 173494; публикации PCT № WO 86/01533; патенте США № 4816567; европейской патентной заявке 125023; у Better et al., 1988, *Science*, 240:1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.*, 139:3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.*, 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature*, 314:446-449 и Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science*, 229:1202-1207; Oi et al., 1986, *Bio-Techniques*, 4:214; патент США 5225539; Jones et al., 1986, *Nature*, 321:552-525; Verhoevan et al. (1988) *Science*, 239:1534 и Beidler et al., 1988, *J. Immunol.*, 141:4053-4060.

Полностью антитела человека являются особенно желательными для терапевтического лечения являющихся человеком индивидуумов. Такие антитела можно получать с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать эндогенные гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, но которые могут экспрессировать гены тяжелых и легких цепей человека.

Трансгенных мышей иммунизируют обычным способом выбранным антигеном, например, полным или частью LY75. Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получать с использованием общепринятой гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулина человека, которые несут трансгенные мыши, подвергаются реаранжировке во время В-клеточной дифференцировки, а затем подвергаются переключению класса и соматической мутации. Таким образом, таким способом можно получать терапевтически пригодные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Для обзора этой технологии получения антител человека см. Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93). Для дальнейшего обсуждения этой технологии получения антител человека и моноклональных антител человека и протоколов получения таких антител, см., например, патент США 5625126, патент США 5633425, патент США 5569825, патент США 5661016 и патент США 5545806. Кроме того, можно заказывать получение антител человека, направленных против выбранного антигена, у компаний, таких как Abgenix, Inc. (Freemont, CA) и Genpharm (San Jose, CA), с использованием технологии, аналогичной описанной выше технологии.

Полностью принадлежащие человеку антитела, которые распознают выбранный эпитоп можно получать способом, обозначаемый как "направленным отбором". В этом подходе выбранное немоноклональное антитело человека, например, антитело мыши, используют для направления отбора антитела, полностью принадлежащего человеку, распознающему такой же эпитоп (Jespers et al. (1994), *BioTechnology*, 12:899-903).

Антитела по настоящему изобретению также можно получать с использованием технологии фагового дисплея для получения и скрининга библиотек полипептидов для связывания с выбранной мишенью. См., например, Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 USA, 6378-82, 1990; Devlin et al., *Science*, 249, 404-6, 1990, Scott and Smith, *Science*, 249, 386-88, 1990 и Ladner et al., патент США № 5571698. Основной принцип способов фагового дисплея заключается в установлении физической связи между ДНК, кодирующей полипептид, подлежащий скринингу, и полипептидом.

Такая физическая связь обеспечивается фаговой частицей, которая представляет полипептид в виде части капсида, окружающего фаговый геном, который кодирует полипептид. Установление физической связи между полипептидами и их генетическим материалом обеспечивает одновременный масс-скрининг очень большого числа фагов, несущих различные полипептиды. Фаг, представляющий полипептид с аффинностью к мишени, связывается с мишенью, и такие фаги обогащают путем скрининга аффинности к мишени. Идентичность полипептидов, представляемых такими фагами, можно определять на основании их соответствующих геномов. Этими способами полипептид, идентифицированный как обладающий аффинностью связывания с желаемой мишенью, можно затем синтезировать большими партиями общепринятыми способами. См., например, патент США № 6057098, который, таким образом, полностью включен, в том числе все таблицы, фигуры и пункты формулы изобретения. В частности, такой фаг можно использовать для представления антигенсвязывающих доменов, экспрессируемых из библиотеки репертуара антител или комбинаторной библиотеки антител (например, человека или мыши). Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющим интерес антигеном, можно отбирать или идентифицировать антигеном, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Фаги, используемые в этих способах, как правило, представляют собой нитевидные фаги, содержащие связывающие домены fd и M13, экспрессируемые из фага с доменами Fab, Fv или стабилизированным дисульфидом Fv антитела, рекомбинантно слитым с белком гена III или гена VIII фага. Способы фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител по настоящему изобретению, включают способы, описанные у Brinkman et al., *J. Immunol. Methods*, 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene*, 1879-18 (1997); Burton et

al., *Advances in Immunology*, 57:191-280 (1994); в заявке PCT № PCT/GB91/01134; публикациях PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, каждый из которых включен полностью в настоящее описание посредством ссылки.

Как описано в указанных выше ссылках, после фагового отбора, кодирующие области антитела из фага можно выделять и использовать для получения полных антител, в том числе антитела человека, или любого другого желаемого антигенсвязывающего фрагмента и экспрессировать в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки, дрожжи и бактерии, например, как описано подробно описано ниже. Например, техники рекомбинантного получения фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂ также можно применять с использованием известных в данной области способов, таких как способы, описанные в публикации PCT WO 92/22324, Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6):864-869 (1992) и Sawai et al., *AJRI*, 34:26-34 (1995), и Better et al., *Science*, 240:1041-1043 (1988) (указанные ссылки полностью включены посредством ссылки).

Примеры способов, которые можно использовать для получения одноцепочечных Fv и антитела включают способы, описанные в патентах США 4946778 и 5258498, у Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS*, 90:7995-7999 (1993) и Skerra et al., *Science*, 240:1038-1040 (1988).

Изобретение дополнительно относится к использованию биспецифических антител, которые можно получать известными в данной области способами. Общепринятое получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелой цепи - легкой цепи иммуноглобулина, где две цепи обладают различной специфичностью (Milstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539). Вследствие случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, эти гибридомы (квардромы) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую, как правило, проводят посредством стадий аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, а выходы продуктов являются низкими. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829, опубликованном 13 мая 1993 года, и у Trauneker et al., 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659.

В соответствии с другим и более предпочтительным подходом вариабельные домены антитела с желаемой специфичностью связывания (антитело-антигенсвязывающие участки) сливают с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Предпочтительно слияние проводят с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, области СН2 и СН3. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере в одном из слияний присутствовала первая константная область (СН1) тяжелой цепи, содержащая участок, необходимый для связывания легкой цепи. ДНК, кодирующие слияния тяжелых цепей иммуноглобулина и при желании легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы, и совместно трансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость при регуляции взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в вариантах осуществления, когда неэквивалентные отношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Однако возможно вводить кодирующие последовательности двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в эквивалентных отношениях приводит к высоким выходам, или когда отношения не имеют особого значения.

В предпочтительном варианте осуществления этого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания на одном плече и гибридной пары тяжелой-легкой цепи иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) на другом плече. Выявлено, что такая асимметричная структура облегчает разделение желаемого биспецифического соединения и нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, так как наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Такой подход описан в WO 94/04690, опублик. 3 марта 1994 г. Более подробно касательно получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинный реагент (например, антитело или его антигенсвязывающая часть, или миметик антитела) не является биспецифическим. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения аффинный реагент (например, антитело или его антигенсвязывающая часть, или миметик антитела) не является биспецифическим антителом для лечения одного или более злокачественных опухолей, выбранных из группы, состоящей из лимфомы, рака мочевого пузыря/карциномы, рака молочной железы, рака желудка/толстого кишечника, рака пищевода и рака кожи/меланомы.

Изобретение относится к функционально активным фрагментам, антигенсвязывающим частям, производным или аналогам молекул иммуноглобулина против LY75. Функционально активный означает, что фрагмент, производное или аналог способен индуцировать анти-антиидиотипические антитела (например, третичные антитела), которые распознают тот же антиген, который распознает антитело, из которого получают фрагмент, производное или аналог. В частности, в предпочтительном варианте осуще-

ствления антигенность идиотипа молекулы иммуноглобулина можно увеличивать посредством делеции каркасных последовательностей и последовательностей CDR, которые являются С-концевыми по отношению к последовательности CDR, которая специфически распознает антиген. Для определения, какие последовательности CDR связываются с антигеном, в анализах связывания с антигеном можно использовать синтетические пептиды, содержащие последовательности CDR, любым известным в данной области способом анализа связывания.

Настоящее изобретение относится к фрагментам антител, таким как, но не ограничиваясь ими, фрагменты $F(ab')_2$ и фрагменты Fab. Фрагменты антител, которые распознают конкретные эпитопы, можно получать известными способами. Фрагменты $F(ab')_2$ состоят из варибельной области, константной области легкой цепи и домена CH1 тяжелой цепи, и их получают посредством расщепления пепсином молекулы антитела. Фрагменты Fab получают восстановлением дисульфидных мостиков фрагментов $F(ab')_2$. Изобретение также относится к димерам тяжелой цепи и легкой цепи антител по изобретению или к любому его минимальному фрагменту, такому как Fv или одноцепочечные антитела (SCA) (например, как описано в патент США 4946778; Bird, 1988, Science, 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 и Ward et al., 1989, Nature, 334:544-54), или к любой другой молекуле с такой же специфичностью как у антитела по изобретению. Одноцепочечные антитела получают связыванием фрагментов тяжелой и легкой цепей области Fv через аминокислотный мостик, получая в результате одноцепочечный полипептид. Способы можно использовать сборки функциональных фрагментов Fv в *E. coli* (Skerra et al., 1988, Science, 242:1038-1041).

В других вариантах осуществления изобретение относится к слитым белкам иммуноглобулинов по изобретению (или их функционально активным фрагментам или их антигенсвязывающим частям), например, в которых иммуноглобулин подвергают слиянию посредством ковалентной связи (например, пептидной связи) на N-конце или С-конце с аминокислотной последовательностью другого белка (или его частью, предпочтительно по меньшей мере частью белка длиной 10, 20 или 50 аминокислот), который не является иммуноглобулином. Предпочтительно иммуноглобулин или его фрагмент ковалентно связывают с другим белком на N-конце константного домена. Как указано выше, такие слитые белки могут облегчать очистку, повышать время полужизни *in vivo* и увеличивать доставку антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему.

Иммуноглобулины по изобретению включают аналоги и производные, которые модифицируют, т.е. ковалентным присоединением любого типа молекулы при условии, что такое ковалентное присоединение не ухудшает иммуносpezifическое связывание. Например, но не в качестве ограничения, производные и аналоги иммуноглобулинов включают производные и аналоги, которые дополнительно модифицировали, например, гликозилированием, ацетилированием, пегилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любую из многих химических модификаций можно проводить известными способами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование и т.д. Кроме того, аналог или производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

Указанные выше антитела можно использовать в известных в данной области способах, относящихся к локализации и активности LY75, например, визуализации такого белка, измерения его уровней в соответствующих физиологических образцах, в способах диагностики и т.д.

Получение аффител к LY75.

Молекулы аффител являются новым классом аффинных белков на основе домена белка длиной 58 аминокислотных остатков, получаемых из одного из связывающих IgG доменов стафилококкового белка А. Этот домен в виде трехспирального пучка использовали в качестве каркаса для конструкции комбинаторных фагмидных библиотек, из которых можно выбирать варианты аффител, которые направлены на желаемые молекулы, с использованием технологии фагового дисплея (Nord K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Stahl S., Uhlen M., Nygren P.A., Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat. Biotechnol., 1997; 15:772-7. Ronmark J., Gronlund H., Uhlen M., Nygren P.A., Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur. J. Biochem., 2002; 269:2647-55). Простая устойчивая структура молекул аффител в сочетании с их небольшой молекулярной массой (6 кДа) делает их подходящими для широкого спектра применений, например, в качестве реагентов для детекции (Ronmark J., Hansson M., Nguyen T. et al, Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, J. Immunol. Methods, 2002; 261:199-211) и для ингибирования взаимодействий рецептора (Sandstorm K., Xu Z., Forsberg G., Nygren P.A., Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng., 2003; 16:691-7). Более подробное описание аффител и их способов получения можно получить по ссылке на патент США № 5831012, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Меченые аффитела также могут являться пригодными для применений в визуализации для определения относительного содержания изоформ.

Получение доменных антител к LY75.

Ссылки на антитела в настоящем описании включают ссылки на доменные антитела. Доменные антитела (dAb) представляют собой наименьшие функциональные связывающие единицы антител, соответствующие вариабельным областям тяжелых (VH) или легких (VL) цепей антител человека. Молекулярная масса доменных антител составляет приблизительно 13 кДа. Domantis разработали серию больших и высокофункциональных библиотек полностью принадлежащих человеку dAb VH и VL (более чем десять миллиардов различных последовательностей в каждой библиотеке) и используют эти библиотеки для отбора dAb, которые являются специфическими к терапевтическим мишеням. В отличие от многих общепринятых антител доменные антитела хорошо экспрессируются в системах на основе бактериальных, дрожжевых клетках и клетках млекопитающего. Более подробное описание доменных антител и способов их получения можно получить по ссылке на патент США 6291158, 6582915, 6593081, 6172197, 6696245, США с серийным № 2004/0110941, европейскую патентную заявку № 1433846 и европейские патенты 0368684 и 0616640, WO 05/035572, WO 04/101790, WO 04/081026, WO 04/058821, WO 04/003019 и WO 03/002609, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Получение нанотел к LY75.

Нанотела представляют собой получаемые из антител терапевтические белки, которые обладают уникальными структурными и функциональными свойствами природных антител, состоящих только из тяжелых цепей. Такие состоящие только из тяжелых цепей антитела содержат один вариабельный домен (VHH) и два константных домена (C_H2 и C_H3). Следует отметить, что клонированный и выделенный домен VHH представляет собой полностью стабильный полипептид, обладающий полной антигенсвязывающей способностью исходного антитела, состоящего только из тяжелых цепей. Нанотела обладают большой гомологией с доменами V_H антител человека, и их можно дополнительно гуманизировать без какой-либо потери активности. Следует отметить, что нанотела имеют низкий иммуногенный потенциал, который подтверждали в исследованиях на приматах с соединениями-прототипами нанотела.

Нанотела сочетают преимущества общепринятых антител с важными свойствами низкомолекулярных лекарственных средств. Также как и общепринятые антитела, нанотела обладают высокой специфичностью к мишени, высокой аффинностью к своей мишени и низкой естественной токсичностью. Однако также как и низкомолекулярные лекарственные средства они могут ингибировать ферменты и легко достигают углублений рецептора. Кроме того, нанотела являются крайне стабильными, их можно вводить способами, отличными от инъекции (см., например, WO 04/041867, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки) и легко получать. Другие преимущества нанотел включают распознавание редких или скрытых эпитопов вследствие их небольшого размера, связывания в углублениях или активных центрах белков-мишеней с высокой аффинностью и избирательностью вследствие их уникальной 3-мерной, гибкости формата лекарственного средства, подбора времени полужизни и простоты и скорости открытия лекарственного средства.

Нанотела кодируются отдельными генами и эффективно продуцируются практически у всех прокариотических и эукариотических хозяев, например, *E. coli* (см., например, US 6765087, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), слизевика (например, *Aspergillus* или *Trichoderma*) и дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Kluuyveromyces*, *Hansenula* или *Pichia*) (см., например, US 6838254, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Способ получения является масштабируемым, и модно получать многокилограммовые количества нанотел. Вследствие того, что нанотела обладают превосходной стабильностью по сравнению с общепринятыми антителами, их можно формулировать в виде готового к применению раствора с длительным сроком хранения.

Способ Nanoclone (см., например, WO 06/079372, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки) представляет собой патентованный способ получения нанотела против желаемой мишени, основанный на атематическом высокопроизводительном отборе В-клеток.

Получение юнител к LY75.

Юнитела представляют собой другую технологию фрагментов антител; однако данная технология основана на удалении шарнирной области антител IgG4. Делеция шарнирной области приводит к получению молекулы, которая по существу вдвое меньше общепринятых антител IgG4 и содержит одновалентную связывающую область, а не двухвалентную связывающую область антител IgG4. Также хорошо известно, что антитела IgG4 являются инертными и, таким образом, не взаимодействуют с иммунной системой, что может являться предпочтительным для лечения заболеваний, где иммунный ответ является нежелательным, и это преимущество распространяется на юнитела. Например, юнитела могут функционировать таким образом, чтобы ингибировать или подавлять, но не уничтожать клетки, с которыми они связываются. Кроме того, юнитело, связывающееся со злокачественными клетками, не стимулирует их пролиферацию. Кроме того, вследствие того, что юнитела являются приблизительно в два раза меньше общепринятых антител IgG4, они могут обладать лучшим распределением в больших солидных опухолях с потенциально лучшей эффективностью. Юнитела выводятся из организма с аналогичной скоростью, как полные антитела IgG4 и способны связываться с аналогичной аффинностью со своими антигенами, как полные антитела. Более подробное описание юнител можно получить по ссылке на патент WO 2007/059782, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Получение DARPin к LY75.

DARPin (Designed Анкирин Repeat Proteins) представляют собой один из примеров технологии миметиков антитела DRP (Designed Repeat Proteins), которая была разработана для использования способностей связывания не являющихся антителами полипептидов. Повторяющиеся белки, такие как анкирин или богатые лейцином повторяющиеся белки, представляют собой широко распространенные связывающие молекулы, которые в отличие от антител встречаются внутри клетки и вне клетки. Особенностью их уникальной модульной архитектуры является повторение структурных единиц (повторы), которые совместно укладываются с образованием удлиненных повторяющихся доменов, предоставляя переменные и модульные поверхности связывания с мишенью. На основании такой модульной структуры можно получать комбинаторные библиотеки полипептидов с крайне разнообразной специфичностью связывания. Эта стратегия включает консенсусное конструирование самосовместимых повторов, предоставляющих переменные остатки на поверхности, и их сборку в случайном порядке в повторяющиеся домены.

DARPin можно получать в бактериальных экспрессирующих системах с очень высокими выходами, и они принадлежат к наиболее устойчивым из известных белков. Были отобраны DARPin с высокой специфичностью, высокой аффинностью к широкому диапазону белков-мишеней, включая рецепторы человека, цитокины, киназы, протеазы человека, вирусы и мембранные белки. Можно получать DARPin с аффинностями порядка однозначного числа в диапазоне от наномоль до пикомоль.

DARPin использовали в широком диапазоне применений, включая ELISA, сэндвич-ELISA, проточный цитометрический анализ (FACS), иммуногистохимию (ИНС), применения с микрочипами, аффинная очистка или вестерн-блоттинг. Также оказалось, что DARPin являются высоко активными во внутриклеточном компартменте, например, в качестве внутриклеточных маркерных белков, слитых с зеленым флуоресцентным белком (GFP). DARPin дополнительно использовали для ингибирования проникновения вируса с IC_{50} в диапазоне пМ. DARPin являются идеальными не только для блокирования взаимодействий белок-белок, а также для ингибирования ферментов. Протеазы, киназы и транспортеры успешно ингибировались, наиболее часто по типу аллостерического ингибирования. Очень быстрое и специфическое обогащение на опухоли и очень подходящие отношения содержания в опухоли к содержанию в крови делают DARPin хорошо подходящими для диагностик или терапевтических подходов *in vivo*.

Дополнительную информацию, касающуюся DARPin и других технологий DRP, можно найти в публикации патентной заявки США № 2004/0132028 и публикации международной патентной заявки WO 02/20565, которые, таким образом, полностью включены посредством ссылки.

Получение антикалинов к LY75.

Антикалины представляют собой дополнительную технологию миметиков антител, однако, в этом случае специфичность связывания получают от липокалинов, семейства низкомолекулярных белков, которые естественным образом и в большом количестве экспрессируются в тканях человека и жидкостях организма. Липокаины участвуют в выполнении ряда функций *in vivo*, связанных с физиологическим транспортом и хранением химически чувствительных или нерастворимых соединений. Липокаины обладают прочной внутренней структурой, содержащей высококонсервативный β -бочонок, который поддерживает четыре петли на одном конце белка. Эти петли образуют вход для связывающего кармана, и конформационные различия в этой части молекулы приводят к различию в специфичности связывания между отдельными липокалинами.

Несмотря на то что общая структура гипервариабельных петель, поддерживаемых консервативным β -листовым каркасом, напоминает структуру иммуноглобулинов, липокаины значительно отличаются от антител размером, так как состоят из одной полипептидной цепи 160-180 аминокислот, которая является ненамного больше, чем один домен иммуноглобулина.

Липокаины клонируют и их петли подвергают конструированию для получения антикалинов. Получали библиотеки структурно различных антикалинов, и дисплей антикалинов позволяет проводить отбор и скрининг функций связывания с последующей экспрессией и получением растворимого белка для дальнейшего анализа в прокариотических или эукариотических системах. Исследования успешно продемонстрировали, что можно разрабатывать антикалины, которые являются специфическими фактически для любого белка-мишени человека; их можно выделять и можно получать аффинности связывания в наномолярном диапазоне или выше.

Антикалины также можно формулировать в виде белков с двойными мишенями, так называемых дуокалинов. Дуокалин связывается с двумя различными терапевтическими мишенями в один легко получаемый мономерный белок стандартными способами получения при сохранении целевой специфичности и аффинности, независимо от структурной ориентации его двух связывающих доменов.

Модуляция многих мишеней через одну молекулу является особенно эффективной при заболеваниях, с доказанным участием более одного этиологического фактора. Кроме того, двух- или поливалентные форматы связывания, такие как дуокалины, обладают значительным потенциалом в отношении направленного воздействия на молекулы клеточной поверхности при заболевании, опосредованным агонистическими эффектами по пути передачи сигнала, или индукции повышенных эффектов интернализации через связывание и образование кластеров рецепторов клеточной поверхности. Кроме того, высокая ес-

тественная стабильность дуокалинов по сравнению с мономерными антикалинами обеспечивает заменяемый состав и возможность доставки дуокалинов.

Дополнительную информацию, касающуюся антикалинов, можно найти в патенте США № 7250297 и публикация международной патентной заявки № WO 99/16873, которые, таким образом, полностью включены посредством ссылки.

Получение авимеров к LY75.

Авимеры выделяют из большого семейства внеклеточных доменов рецепторов человека посредством перестановки экзонов *in vitro* и фагового дисплея, получая мультидоменные белки со связывающими и ингибирующими свойствами. Было показано, что связывание многих независимых связывающих доменов создает avidность и приводит к улучшенной аффинности и специфичности по сравнению с общепринятыми белками, связывающимися с одним эпитопом. Другие возможные преимущества включают простоту и эффективное получение молекул, специфических в отношении многих мишеней, в *Escherichia coli*, улучшенную термостабильность и устойчивость к протеазам. Были получены авимеры с субнаномольными аффинностями против различных мишеней.

Дополнительную информацию, касающуюся авимеров, можно найти в публикации патентной заявки США № 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, которые, таким образом, полностью включены посредством ссылки.

Получение версатела к LY75.

Версатела представляют собой небольшие белки 3-5 кДа, содержащие >15% остатков цистеинов, которые образуют дисульфидный каркас высокой плотности, заменяющий гидрофобное ядро, которое содержат характерные белки. Замена большого количества гидрофобных аминокислот, содержащих гидрофобное ядро, на меньшее количество дисульфидов приводит к получению белка меньшего размера, с большими гидрофильными свойствами (меньшая степень агрегации и неспецифического связывания), более устойчивого к протеазам и теплу, и который характеризуется меньшей плотностью эпитопов Т-клеток, вследствие того, что остатки, которые в большей степени способствуют представлению МНС, являются гидрофобными. Хорошо известно, что все четыре этих свойства влияют на иммуногенность, и ожидают, что совместно они приведут к значительному снижению иммуногенности.

Идея версател возникла из природных инъеклируемых биофармацевтических средств, вырабатываемых пиявками, змеями, пауками, скорпионами, улитками и анемонами, которые, как известно, обладают неожиданно низкой иммуногенностью. Начиная с выбранных семейств природных белков, конструированием и скринингом сводили к минимуму размер, гидрофобность, протеолитическое процессирование антитела, и плотность эпитопа сводили к минимуму до уровней намного ниже среднего значения для природных инъеклируемых белков.

С учетом структуры версател, эти миметики антител обеспечивают разнообразный формат, который включает поливалентность, полиспецифичность, разнообразие механизмов регуляции времени полужизни, обеспечивающие направленную доставку в ткани модули и отсутствие Fc-области антитела. Кроме того, версатела продуцируются в *E. coli* в высоких уровнях, и вследствие их гидрофильности и небольшого размера, версатела являются хорошо растворимыми, их можно формулировать в высоких концентрациях. Версатела являются исключительно устойчивыми (их можно подвергать кипячению) и обладают продленным сроком хранения.

Дополнительную информацию, касающуюся версател, можно найти в публикации патентной заявки США № 2007/0191272, таким образом, полностью включенной посредством ссылки.

Экспрессия аффинных реагентов.

Экспрессия антител.

Антитела по изобретению можно получать любым известным в данной области способом синтеза антител, в частности химическим синтезом или рекомбинантной экспрессией, и предпочтительно получают способами рекомбинантной экспрессии.

Для рекомбинантной экспрессии антител или их фрагментов, производных или аналогов, необходимой является конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Если известна нуклеотидная последовательность антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело можно собирать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано у Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques*, 17:242), что в кратком изложении включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих участки последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов ПЦР.

Альтернативно, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно получать клонированием антитела. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, является недоступным, но последовательность молекулы антитела является известной, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно получать из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител, или библиотеки кДНК, получаемой из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело) ПЦР амплификацией с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами последовательности, или клонированием с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для кон-

кретной последовательности гена.

Если молекула антитела, которая специфически распознает конкретный антиген, является недоступной (или источник для библиотеки кДНК для клонирования нуклеиновой кислоты, кодирующей такое антитело), антитела, специфические для конкретного антигена, можно получать любым известным в данной области способом, например, иммунизацией животного, такого как кролик, для получения поликлональных антител или, например, получением моноклональных антител. Альтернативно, клон, кодирующий, по меньшей мере, участок Fab антитела можно получать скринингом экспрессионных библиотек Fab (например, как описано у Huse et al., 1989, *Science*, 246:1275-1281) на клоны фрагментов Fab, которые связываются с конкретным антигеном, или скринингом библиотек антител (см., например, Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624; Hane et al., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937).

После получения нуклеиновой кислоты, кодирующей, по меньшей мере, варибельный домен молекулы антитела, ее можно вводить в вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, публикацию PCT WO 86/05807, публикацию PCT WO 89/01036 и патент США № 5122464). Также доступными являются векторы, содержащие полную легкую или тяжелую цепь для коэкспрессии с нуклеиновой кислотой для обеспечения экспрессии полной молекулы антитела. Затем, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно использовать для введения нуклеотидной замены(н) или делеции(й), необходимой для замены (или удаления) одного или более остатков цистеина варибельной области, участвующих в о внутривещечных дисульфидных связях, аминокислотным остатком, который не содержит сульфгидрильную группу. Такие модификации можно проводить любым известным в данной области способом введения конкретных мутаций или делеций в нуклеотидную последовательность, например, но без ограничения, химическим мутагенезом, сайт-направленным мутагенезом *in vitro* (Hutchinson et al., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253:6551), способы на основе PCT и т.д.

Кроме того, можно использовать способы, разработанные для получения "химерных антител" (Morgison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature*, 314:452-454) путем сплайсинга генов из молекулы антитела мыши подходящей антигенной специфичности совместно с генами из молекулы антитела человека подходящей биологической активности. Как описано выше, химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные участки получают от различных видов животных, такое как химерные антитела, содержащие варибельную область, получаемую из mAb мыши, и константную область антитела человека, например, гуманизированные антитела.

После получения нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела по изобретению, можно получить вектор для продуцирования молекулы антитела технологией рекомбинантных ДНК хорошо известными в данной области способами. Таким образом, в настоящем описании описаны способы получения LY75 экспрессией нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности молекулы антител. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области, можно использовать для конструкции экспрессирующих векторов, содержащих кодирующие последовательности молекулы антитела и соответствующие регуляторные сигналы транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические способы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. См., например, способы, описанные у Sambrook et al. (1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) и Ausubel et al. (eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

Экспрессирующий вектор переносят в клетку-хозяина общепринятыми способами, а затем культивируют трансфицированные клетки общепринятыми способами с получением антитела по изобретению.

Клетки-хозяева, используемые для экспрессии рекомбинантного антитела по изобретению, могут представлять собой бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или предпочтительно эукариотические клетки, в частности для экспрессии полной молекулы рекомбинантного антитела. В частности, эффективной экспрессирующей системой для антител являются клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (СНО), в сочетании с вектором, таким как основной промоторный элемент промежуточных ранних генов из цитомегаловируса человека (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *BioTechnology*, 8:2).

Для экспрессии молекулы антител по изобретению можно использовать ряд систем хозяин-экспрессирующий вектор. Такие хозяин-экспрессирующие системы представляют собой носителей, посредством которых можно получать представляющие интерес кодирующие последовательности, а затем очищать, а также представляют собой клетки, которые в случае трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать молекулу антитела по изобретению *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, экспрессирующие векторы на основе плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащие последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces, Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе клетки насекомого, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими

щими векторами (например, бакуловируса),

содержащие последовательности, кодирующие антитело; системы на основе растительной клетки, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, Ti-плазмидой), содержащие последовательности, кодирующие антитело, или системы на основе клеток млекопитающего (например, клеток COS, CHO, ВНК, 293, 3Т3), несущие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса оспавакцины 7,5К).

В бактериальных системах ряд экспрессирующих векторов можно преимущественно отбирать в зависимости от предполагаемого использования молекулы антител, подлежащей экспрессии. Например, когда необходимо получать большое количество такого белка для получения фармацевтических композиций, содержащих молекулу антитела, желательными могут являться векторы, которые направляют экспрессию на высоких уровнях продуктов слитого белка, которые легко поддаются очистке. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, экспрессирующий вектор pUR278 *E. coli* (Ruther et al., 1983, EMBO J., 2:1791), в котором кодирующую антитело последовательность можно лигировать отдельно в вектор в рамке считывания с кодирующей областью *lac Z*, таким образом, что получают слитый белок; векторы pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24:5503-5509) и т.п. Для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой также можно использовать векторы (GST)pGEX. В целом, такие слитые белки являются растворимыми, и их можно легко выделять из лизированных клеток посредством адсорбции и связывания с гранулами матрицы глутатион-агарозы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX конструируют так, чтобы они содержали тромбин или участки протеазного расщепления фактора Ха, таким образом, чтобы клонируемый целевой продукт гена мог выделяться из молекулы GST.

В системе на основе клеток насекомых для экспрессии чужеродных генов в качестве вектора используют вирус ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcNPV). Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующую антитело, можно индивидуально клонировать в несмысловые области (например, ген полиэдрина) вируса и помещать под контролем промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина). В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд экспрессирующих систем на основе вирусов (например, экспрессирующую систему на основе аденовируса).

Как указано выше, можно выбирать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вводимых последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена конкретным желаемым способом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, расщепление) продуктов белков могут быть важными для функции белка.

Для длительной продукции с высоким выходом рекомбинантных антител предпочтительной является стабильная экспрессия. Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют представляющее интерес антитело, можно получать трансфекцией клеток экспрессирующим вектором, содержащим нуклеотидную последовательность антитела и нуклеотидную последовательность селективируемого маркера (например, неомицина или гигромицина), и отбором на экспрессию селективируемого маркера. Такие конструируемые линии клеток могут являться особенно пригодными для скрининга и оценки соединений, которые взаимодействуют непосредственно или опосредованно с молекулой антитела.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно повышать амплификацией вектора (для обзора см. Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987). Когда амплифицируют маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, повышение уровня ингибитора, содержащегося в культивируемых клетках-хозяине увеличивает число копий маркерного гена. Вследствие того, что амплифицированная область является связанной с геном антитела, также увеличивается продукция антитела (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol., 3:257).

Клетку-хозяина можно трансфицировать совместно с двумя экспрессирующими векторами по изобретению, первый вектор кодирует тяжелую цепь, получаемую из полипептида, и второй вектор кодирует легкую цепь, получаемую из полипептида. Два вектора могут содержать одинаковые селективируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию тяжелых и легких цепей полипептидов. Альтернативно, можно использовать один вектор, который кодирует тяжелую и легкую цепи полипептидов. В такой ситуации, легкую цепь следует помещать перед тяжелой цепью, чтобы устранять избыток токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, 1986, Nature, 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2197). Кодирующие последовательности для тяжелых и легких цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

После того как молекулу антитела по изобретению рекомбинантно экспрессировали, ее можно очищать любым известным в данной области способом очистки молекулы антитела, например, хроматографией (например, ионообменной хроматографией, аффинной хроматографией, такой как с белком А

или с конкретным антигеном, и хроматографией на колонке с молекулярным ситом), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или любым другим стандартным способом очистки белков.

Альтернативно, любой слитый белок можно легко очищать с использованием антитела, специфического для экспрессируемого слитого белка. Например, система, описанная Janknecht et al., обеспечивает быструю очистку неденатурированных слитых белков, экспрессируемых в линиях клеток человека (Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8972-897). В этой системе представляющий интерес ген субклонирован в рекомбинантную плазмиду на основе вируса оспавакцины, таким образом, что открытая рамка считывания гена является трансляционно слитой с меткой концевой аминокислоты, состоящей из шести гистидиновых остатков. Метка служит в качестве связывающего домена матрицы для слитого белка. Экстракты из клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом оспавакцины, нагружают в колонку с Ni^{2+} нитрилоуксусной кислотой-агарозой и избирательно элюируют меченные гистидином белки содержащими имидазол буферами.

Антитела, которые получают этими способами, затем можно отбирать первым скринингом на аффинность и специфичность с представляющим интерес очищенным полипептидом и при необходимости сравнивать результаты с аффинностью и специфичностью антител с полипептидами, которые желательны исключить из связывания. Способ скрининга может включать иммобилизацию очищенных полипептидов в отдельных лунках планшетов для микротитрования. Затем раствор, содержащий потенциальное антитело или группу антител помещают в соответствующие лунки планшета для микротитрования и инкубируют в течение приблизительно от 30 мин до 2 ч. Затем лунки планшета для микротитрования отмывают и добавляют в лунки меченое вторичное антитело (например, конъюгированное с щелочной фосфатазой антитело против антитела мыши если индуцированные антитела представляют собой антитела мыши), и инкубируют в течение приблизительно 30 мин, а затем промывают. В лунки добавляют субстрат, и будет происходить окрашивание, если содержится антитело к иммобилизованному полипептиду(ам).

Идентифицированные таким образом антитела затем можно дополнительно анализировать на аффинность и специфичность в выбранном формате анализа. При разработке иммунологических анализов для белка-мишени, очищенный белок-мишень действует как стандарт, с которым оценивают чувствительность и специфичность иммунологического анализа, в котором используют антитела, которые отбирали. Вследствие того, что аффинность связывания различных антител может отличаться; определенные пары антител (например, в сэндвич-анализах) могут пространственно препятствовать друг другу и т.д., эффективность анализа антитела может являться более важной величиной, чем абсолютная аффинность и специфичность антитела.

Специалистам в данной области понятно, что для получения антител можно использовать многие подходы или связывающие фрагменты и скрининг и отбор на аффинность и специфичность к различным полипептидам, но эти подходы не изменяют объем изобретения.

Для терапевтических применений антитела (в частности моноклональные антитела) могут подходить образом представлять собой антитела человека или гуманизированные антитела животных (например, мыши). Антитела животных можно индуцировать у животных с использованием белка человека (например, LY75) в качестве иммуногена. Гуманизация, как правило, включает пересадку идентифицированных таким образом CDR в каркасные области человека. Как правило, необходимым является несколько последовательных обратных мутаций для оптимизации конформации цепей. Такие способы известны специалистам в данной области.

Экспрессия аффител.

Конструкция аффител описана в других документах (Ronnmark J., Gronlund H., Uhlen M., Nygren P.A., Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem., 269, 2647-2655), включая конструкцию библиотеки фагового дисплея аффител (Nord K., Nilsson J., Nilsson B., Uhlen M. & Nygren P.A, A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, 1995, Protein Eng., 8, 601-608. Nord K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Stahl S., Uhlen M. & Nygren P.A, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, 1997, Nat. Biotechnol., 15, 772-777).

Также в других документах были описаны биосенсорные анализы для исследования оптимальных вариантов аффител с использованием исследований связывания биосенсора (Ronnmark J., Gronlund H., Uhlen M., Nygren P.A., Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem., 269, 2647-2655).

Модификации аффинных реагентов.

В предпочтительном варианте осуществления аффинные реагенты к LY75, такие как антитела или их фрагменты, конъюгируют с диагностической молекулой (такой как детектируемая метка) или терапевтическая молекула. Антитела можно использовать для диагностики или для определения эффективности проводимой схемы лечения. Детекцию можно облегчать связыванием антитела с детектируемым веществом (метка). Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества, радиоактивные нуклиды, позитронно-активные металлы (для применения в позитронно-эмиссионной томогра-

фии) и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. См. в основном патент США № 4741900 для ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств по настоящему изобретению. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные вещества включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансил-хлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные вещества включают люминол; подходящие биолюминесцентные вещества включают люциферазу, люциферин и экворин, и подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc . Также можно применять ^{68}Ga .

Как указано выше, аффинные реагенты, такие как антитела для применения в изобретении, можно конъюгировать с терапевтической частью, такой как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. В настоящем описании такие конъюгаты обозначают как "иммуноконъюгаты". Иммуноконъюгаты, которые содержат один или более цитотоксинов обозначают как "иммунотоксины". Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое является вредным (например, уночтожает) для клеток. Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромин и их аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, диброманнит, стрептозотин, митомин С и цисдихлордиаминплатину (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее называвшийся дауномицином) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее называвшийся актиномицином), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимицотические средства (например, винкристин и винбластин).

Другие предпочтительные примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителом по изобретению, включают дуокармицины, калихимицины, майтансины и ауристатины, и их производные. Пример конъюгата калихимицина и антитела является коммерчески доступным (Mylotarg®; American Home Products).

Цитотоксины можно конъюгировать с антителами по изобретению с использованием доступной в данной области технологии линкера. Примеры типов линкеров, которые использовали для конъюгации цитотоксина с антителом, включают, но не ограничиваются ими, гидразоны, тиозиферы, сложные эфиры, дисульфиды и содержащие пептид линкеры. Можно вбирать линкер, который, например, является чувствительным к расщеплению при низком pH в лизосомальных компартментах или чувствительным к расщеплению протеазами, такими как протеазы, предпочтительно экспрессируемые в ткани опухоли, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D).

Примеры цитотоксинов, описаны, например, в патентах США № 6989452, 7087600 и 7129261 и в заявках РСТ № РСТ/US2002/17210, РСТ/US2005/017804, РСТ/US2006/37793, РСТ/US2006/060050, РСТ/US2006/060711, WO 2006/110476, и в патентной заявке США № 60/891028, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Для дополнительного обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгации терапевтических средств с антителами также см. Saito G. et al. (2003), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55:199-215; Trail P.A. et al. (2003), *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne G. (2003), *Cancer Cell*, 3:207-212; Allen T.M. (2002), *Nat. Rev. Cancer*, 2:750-763; Pastan I. and Kreitman R.J. (2002), *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3:1089-1091; Senter P.D. and Springer C.J. (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53:247-264.

Аффинные реагенты также можно конъюгировать с радиоактивным изотопом с получением цитотоксических радиофармацевтических средств, также обозначаемых как радиоиммуноконъюгаты. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для использования диагностически или терапевтически включают, но не ограничиваются ими, йод 131, индий 111, иттрий 90 и лютеций 177. В данной области установлены способы получения радиоиммуноконъюгатов. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, включая Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) и Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные способы можно использовать для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител по изобретению.

Аффинные реагенты также можно конъюгировать с фталоцианиновым красителем, обозначаемом далее в настоящем описании как конъюгаты фталоцианина. Примеры фталоцианиновых красителей, которые можно конъюгировать антителами для использования диагностически или терапевтически, включают, но не ограничиваются ими, IR700. Способы получения конъюгатов фталоцианина описаны, например, у Mitsunaga M., Ogawa M., Kosaka N., Rosenblum L.T., Choyke P.L. and Kobayashi H. (2011), *Nat Med.*, 2011 Nov 6. doi: 10.1038/nm.2554.

Конъюгаты можно использовать для модификации данного биологического ответа, и подразумевают, что молекула лекарственного средства не является ограниченной классическими химическими тера-

пептическими средствами. Например, молекула лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон- γ ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин 1 ("IL-1"), интерлейкин 2 ("IL-2"), интерлейкин 6 ("IL-6"), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF"), или другие факторы роста. Senter P.D. (2009), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13(3):235-244; Kovtun et al. (2010), *Cancer Res.*, 70(6):2528-2537.

Способы конъюгации таких терапевтических частей с антителами хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" в *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibody In Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Альтернативно, антитело можно конъюгировать со вторым антителом с получением гетероконъюгата антитела, как описано Segal в патенте США № 4676980.

Антитело с конъюгированной с терапевтической частью или без нее можно использовать в качестве терапевтического средства, которое вводят отдельно или в комбинации с цитотоксическим фактором(ами) и/или цитокином(ами).

В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинный реагент (например, антитело или его антигенсвязывающая часть, или миметик антитела) не состоит или не содержит, или не конъюгирован с опухолевым антигеном, аллергеном, аутоантигеном или вирусным антигеном. В некоторых конкретных вариантах осуществления аффинный реагент (например, антитело, или его антигенсвязывающая часть или миметик антитела) не состоит или не содержит, или не конъюгирован с опухолевым антигеном.

Изобретение также относится к полностью принадлежащим человеку антителам или гуманизированным антителам, которые индуцируют направленную антителом клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Полностью принадлежащее человеку антитело представляет собой антитело, в котором последовательности белка кодируются природными последовательностями иммуноглобулина человека из выделенных продуцирующих антитело В-лимфоцитов человека или из трансгенных В-лимфоцитов мыши мышей, у которых кодирующие иммуноглобулин мыши хромосомные участки заменили ортологическими последовательностями человека. Трансгенные антитела последнего типа включают, но не ограничены ими, HuMab (Medarex, Inc, CA) и XenoMouse (Abgenix Inc., CA). Гуманизированное антитело представляет собой антитело, в котором константная область не принадлежащей человеку молекулы антител соответствует антигенной специфичности заменяют константной областью антитела человека, предпочтительно подтипа IgG, с соответствующими эффекторными функциями (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature*, 314:452-454). Соответствующие эффекторные функции включают ADCC, которая представляет собой естественный процесс, посредством которого полностью принадлежащие человеку антитела или гуманизированные антитела при связывании с мишенями на поверхности злокачественных клеток запускают клетку цитотоксические свойства лимфоцитов, которые составляют часть нормальной иммунной системы. Такие активные лимфоциты, называемые естественными киллерными (NK) клетками, используют цитотоксический процесс для разрушения живых клеток, с которыми антитела связываются. Активность ADCC можно детектировать и количественно оценивать путем измерения европия (Eu^{3+}) в меченых Eu^{3+} живых клетках в присутствии специфического к антигену антитела и мононуклеарных клеток периферической крови, получаемых от иммунокомпетентного, живого индивидуума, являющегося человеком. Процесс ADCC подробно описан у Janeway Jr. C.A. et al., *Immunobiology*, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., *Immunology, Infection, and Immunity*, 2004, p246-5; Albanell J. et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2003, 532:p2153-68 и Weng W.-K. et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 21:p3940-3947. Подходящие способы детекции и количественного определения ADCC можно найти у Blomberg et al., *Journal of Immunological Methods*, 1986, 86:p225-9; Blomberg et al., *Journal of Immunological Methods*, 1986, 21, 92:p117-23 и Patel & Boyd, *Journal of Immunological Methods*, 1995, 184:p29-38.

Как правило, ADCC включает активацию NK-клеток и зависит от распознавания покрытых антителами клеток Fc-рецепторами на поверхности NK-клетки. Fc-рецепторы распознают Fc-(кристаллический) участок антитела, такой как IgG, специфически связанный с поверхностью клеткой-мишенью. Fc-рецептор, который инициирует активацию NK-клетки, называется CD16 или Fc γ RIIIa. После того, как рецептор Fc γ RIIIa связывается с Fc IgG, NK-клетка выделяет цитокины, такие как IFN- γ , и цитотоксические гранулы, содержащие перфорин и гранзимы, которые проникают в клетку-мишень и способствуют

гибели клеток в результате инициации апоптоза.

Индукцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) антителом можно усиливать модификациями, которые изменяют взаимодействия между константной областью (Fc) антитела и различными рецепторами, которые располагаются на поверхности клеток иммунной системы. Такие модификации включают пониженное содержание или отсутствие альфа-6-связанной группы фукозы в сложных олигосахаридных цепях, которые обычно добавляются к антителу Fc в ходе природного или рекомбинантного синтеза в клетках млекопитающих. В предпочтительном варианте осуществления нефукозилированные аффинные реагенты к LY75, такие как антитела или их фрагменты, получают с целью повышения их способности индуцировать ответ ADCC.

Способы снижения содержания или абляции альфа-1,6-связанных групп фукозы в олигосахаридных цепях Fc хорошо установлены. В одном из примеров рекомбинантное антитело синтезируют в линии клеток, у которой нарушена способность добавлять фукозу по альфа-1,6 связи к внутреннему N-ацетилглюкозамину Fc-олигосахаридов типа N-связанного биантенарного комплекса. Такие линии клеток включают, но не ограничиваются ими, гибридому крысы YB2/0, которая экспрессирует пониженные уровни гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8. Предпочтительно антитело синтезируют в линии клеток, которые не способны добавлять альфа-1,6-связанные фукозильные группы к сложным олигосахаридным цепям вследствие делеции обеих копий гена FUT8. Такие линии клеток включают, но не ограничиваются ими, линии клеток FUT8-/-CHO/DG44. Способы синтеза частично фукозилированных или нефукозилированных антител и аффинных реагентов описаны у Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.*, 278:3466-34735 (2003); Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 87: 614-22 (2004) и в WO 00/61739 A1, WO 02/31140 A1 и WO 03/085107 A1. Во втором примере снижают или устраняют фукозилирование рекомбинантного антитела путем синтеза в линиях клеток, которые генетически конструировали, чтобы они сверхэкспрессировали модифицирующую гликопротеин гликозилтрансферазу на уровне, который повышает до максимума продукцию сложных N-связанных олигосахаридов, несущих N-ацетилглюкозамин в точках ветвления. Например, антитело синтезируют в линии клеток китайского хомяка, экспрессирующих фермент N-ацетилглюкозаминтрансфераза III (GnT III). Линии клеток, стабильно трансфицированные подходящими модифицирующими гликопротеин гликозилтрансферазами, и способы синтеза антител с использованием этих клеток описаны в WO 99/54342.

Нефукозилированное антитело или аффинный реагент можно использовать в качестве терапевтического средства, которое вводят отдельно или в комбинации с цитотоксическим фактором(ами) и/или цитокином(ами).

При дальнейшей модификации изменяют аминокислотные последовательности антитела Fc таким образом, чтобы увеличивать активацию ADCC, не оказывая влияния на аффинности лиганда. Примеры таких модификаций описаны у Lazar et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103:p4005-4010; в WO 03/074679 и WO 2007/039818. В этих примерах замены аминокислот в Fc антитела, такие как аспаргат на серин в положении 239 и изолейцина на глутаминат в положении 332, изменяли аффинность связывания антитела с Fc-рецепторами, что приводило к повышению активации ADCC.

Реагент на основе антитела, который усиливает активацию ADCC вследствие замены аминокислот, можно использовать в качестве терапевтического средства, которое вводят отдельно или в комбинации с цитотоксическим фактором(ами) и/или цитокином(ами).

В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинный реагент (например, антитело или его антигенсвязывающая часть, или миметик антитела) не является scFV. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения аффинный реагент (например, антитело или его антигенсвязывающая часть, или миметик антитела) не является scFV для лечения рака кожи или меланомы.

Диагностика злокачественной опухоли, включая заболевания по изобретению.

По другому аспекту изобретение относится к способам детекции, диагностики и/или скрининга или мониторинга прогрессирования злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, или мониторинга эффекта, например, лекарственного средства против злокачественной опухоли или терапии, направленной на заболевания по изобретению, у индивидуума, который включает детекцию наличия или уровня антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, или который включает детекцию изменения его уровня у указанного индивидуума.

По другому аспекту изобретение относится к способу детекции, диагностики и/или скрининга злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, у индивидуума, который включает детекцию наличия антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, у указанного индивидуума, в котором (а) наличие повышенного уровня антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или указанными одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, у указанного индивидуума по сравнению с уровнем у здорового индивидуума или (б) наличие детектируемого уровня антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или указанными одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, у указанного индивидуума по сравнению с соответствующим недетектируемым уровнем у здорового индивидуума указывает на наличие указанной злокачественной опухоли у указанного индивидуума.

Один конкретный способ детекции, диагностики и/или скрининга злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, включает

приведение в контакт с подлежащим тестированию биологическим образцом LY75 или одного или более его содержащих эпитоп фрагментов и

детекцию наличия у индивидуума антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или одним или более его содержащих эпитоп фрагментов.

По другому аспекту изобретение относится к способу мониторинга прогрессирования злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, или мониторинга эффектов, например, лекарственного средства против злокачественной опухоли или терапии, направленной на заболевания по изобретению, у индивидуума, который включает детекцию наличия антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, у указанного индивидуума в первый момент времени и в последний момент времени, наличия повышенного или пониженного уровня антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, у указанного индивидуума в последний момент времени по сравнению с уровнем у указанного индивидуума в указанный первый момент времени, свидетельствующего о прогрессировании или регрессии указанной злокачественной опухоли, или эффекта или отсутствия эффекта указанного лекарственного средства против злокачественной опухоли или терапии у указанного индивидуума.

Наличие антител, способных иммуноспецифически связываться с LY75 или одним или более его содержащих эпитоп фрагментов, как правило, детектируют путем анализа биологического образца, получаемого от указанного индивидуума (иллюстративные биологические образцы указаны выше, например, образец представляет собой образец лимфоидной ткани, ткани щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи или образец крови или слюны). Как правило, способ включает стадию получения указанного биологического образца для анализа от указанного индивидуума. Антитела, которые можно детектировать, включают антитела IgA, IgM и IgG.

В соответствии с настоящим изобретением тестируемые образцы, например, лимфоидной ткани, ткани щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи и кожи, сыворотки, плазмы или мочи, получаемые от индивидуума, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает заболеваниями по изобретению, можно использовать для диагностики и мониторинга. В одном из вариантов осуществления изменение относительного содержания LY75 в тестируемом образце относительно контрольного образца (от индивидуума или индивидуумов, не страдающих заболеваниями по изобретению) или ранее установленного эталонного диапазона указывает на наличие заболеваний по изобретению. В другом варианте осуществления относительное содержание LY75 в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом или ранее установленным эталонным диапазоном указывает на подтип заболеваний по изобретению (например, диффузную В-крупноклеточную лимфому, В-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), фолликулярную лимфому, лимфому мантийных клеток, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), Т-клеточная/обогащенную гистидином В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфомаплазмодитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммуобластную Т-клеточную лимфому; анапластическую карциному щитовидной железы; переходноклеточную карциному; воспалительный рак молочной железы; плоскоклеточная пищевод карцинома; аденокарциному желудка; плоскоклеточную карциному головы и шеи или плоскоклеточную карциному кожи, меланому). В еще одном варианте осуществления относительное содержание LY75 в тестируемом образце относительно контрольного образца или ранее установленного эталонного диапазона указывает на степень или тяжесть заболеваний по изобретению (например, вероятность метастазов). Любой из указанных выше способов детекции LY75 можно необязательно комбинировать с детекцией одного или более дополнительных биомаркеров заболеваний по изобретению. Любой подходящий способ в данной области можно применять для измерения уровня LY75, включая, но не ограничиваясь ими, предпочтительные способы, описываемые в настоящем описании, киназные анализы, иммунологические анализы для детекции и/или визуализации LY75 (например, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, иммуноцитохимию и т.д.). В дополнительном варианте осуществления изменение относительного содержания иРНК, кодирующей LY75, в тестируемом образце относительно контрольного образца или ранее установленного эталонного диапазона указывает на наличие заболеваний по изобретению. Можно использовать любой подходящий анализ гибридизации для детекции экспрессии LY75 путем детекции и/или визуализации иРНК, кодирующей LY75 (например, нозерн-анализы, дот-блоты, гибридизацию *in situ* и т.д.).

В другом варианте осуществления изобретения можно использовать меченые антитела (или другие аффинные реагенты), их производные и аналоги, которые специфически связываются с LY75, в диагностических целях для детекции, диагностики или мониторинга заболеваний по изобретению. Предпочтительно заболевания по изобретению детектируют у животного, более предпочтительно у млекопитающе-

го и наиболее предпочтительно у человека.

Анализы скрининга.

Изобретение относится к способам идентификации средств (например, соединений-кандидатов или тестируемых соединений), которые связываются с LY75 или обладают стимулирующим или ингибирующим действием на экспрессию или активность LY75. Изобретение также относится к способам идентификации средств, соединений-кандидатов или тестируемых соединений, которые связываются с родственным LY75 полипептидом или слитым белком LY75 или обладают стимулирующим или ингибирующим действием на экспрессию или активность родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75. Примеры средств, с соединений-кандидатов или тестируемых соединений включают, но не ограничиваются ими, нуклеиновые кислоты (например, ДНК и РНК), углеводы, липиды, белки, пептиды, пептидомиметики, низкомолекулярные соединения и другие лекарственные средства. Средства можно получать с использованием одного из многих подходов в способах комбинаторных библиотек, известных в данной области, включая: биологические библиотеки; пространственно адресуемые параллельные библиотеки с твердой фазой или жидкой фазой; способы синтетических библиотек, для которых необходима деконволюция; способ библиотеки "одна гранула - одно соединение" и способы синтетических библиотек с использованием отбора аффинной хроматографией. Подход биологических библиотек ограничен библиотеками пептидов, в то время как другие четыре подхода можно применять к пептиду, непептидному олигомеру или библиотекам низкомолекулярных соединений (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.*, 12:145; патент США № 5738996 и патент США № 5807683, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки).

Примеры способов синтеза молекулярных библиотек можно найти в данной области, например, у DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.*, 37:2678; Cho et al., 1993, *Science*, 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:2059; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:2061 и Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.*, 37:1233, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Библиотеки соединений могут содержаться, например, в растворе (например, Houghten, 1992, *Bio-Techniques*, 13:412-421), или на гранулах (Lam, 1991, *Nature*, 354:82-84), чипах (Fodor, 1993, *Nature*, 364:555-556), бактериях (патент США № 5223409), спорах (патенты № 5571698, 5403484 и 5223409), плазмидах (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1865-1869) или фагах (Scott and Smith, 1990, *Science*, 249:386-390; Devlin, 1990, *Science*, 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382, и Felici, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:301-310), каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления в системах анализа на основе клеток идентифицируют средства, которые взаимодействуют (т.е. связываются) с LY75, фрагментом LY75 (например, функционально активным фрагментом или антигенсвязывающей частью), родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75. По этому варианту осуществления клетки, экспрессирующие LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75, приводят в контакт с соединением-кандидатом или контрольным соединением и определяют способность соединения-кандидата взаимодействовать с LY75. При желании этот анализ можно использовать для скрининга совокупности (например, библиотеки) соединений-кандидатов. Клетка, например, может быть прокариотического происхождения (например, *E. coli*) или эукариотического происхождения (например, дрожжей или млекопитающих). Кроме того, клетки могут эндогенно экспрессировать LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75, или их подвергают генетической инженерии для экспрессии LY75, фрагмента LY75, родственного LY75 полипептида, фрагмента родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75. В некоторых случаях LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75, или соединение-кандидат метят, например, радиоактивной меткой (такой как ³²P, ³⁵S и ¹²⁵I) или флуоресцентной меткой (такой как флуоресцеинизотиоцианат, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, ортофталевый альдегид или флуорескамин) для обеспечения детекции взаимодействия между LY75 и соединением-кандидатом. Способность соединения-кандидата прямо или опосредованно взаимодействовать с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75 можно определять известными специалистам в данной области способами. Например, взаимодействие между соединением-кандидатом и LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75 можно определять проточной цитометрией, сцинтилляционным анализом, иммунопреципитацией или анализом вестерн-блоттинга.

В другом варианте осуществления в бесклеточной системе анализа идентифицируют средства, которые взаимодействуют (т.е. связываются) с LY75, фрагментом LY75 (например, функционально активный фрагмент или антигенсвязывающая часть), родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75. По этому варианту осуществления нативный или

рекомбинантный LY75 или его фрагмент, или нативный или рекомбинантный родственный LY75 полипептид или его фрагмент, или слитый белок LY75 или его фрагмент, приводят в контакт с соединением-кандидатом или контрольным соединением и определяют способность соединения-кандидата взаимодействовать с LY75 или родственным LY75 полипептидом, или слитым белком LY75. При желании этот анализ можно использовать для скрининга совокупности (например, библиотеки) соединений-кандидатов. Предпочтительно LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75 сначала иммобилизуют, например, приведением LY75, фрагмента LY75, родственного LY75 полипептида, фрагмента родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75 в контакт с иммобилизованным антителом (или другим аффинным реагентом), которое специфически распознает и связывается с ним, или приведением очищенного препарата LY75, фрагмента LY75, родственного LY75 полипептида, фрагмента родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75 в контакт с поверхностью, сконструированной чтобы связывать белки. LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75 может быть частично или полностью очищенным (например, частично или полностью не содержащий другие полипептиды) или являться частью клеточного лизата. Кроме того, LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид или фрагмент родственного LY75 полипептида может представлять собой слитый белок, содержащий LY75 или его биологически активную часть, или родственный LY75 полипептид и домен, такой как глутатионин-S-трансфераза. Альтернативно, LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75 можно подвергать биотинилированию с использованием техник, хорошо известных специалистам в данной области (например, набор для биотинилирования, Pierce Chemicals; Rockford, IL). The способность соединения-кандидата взаимодействовать с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75 можно определять известными специалистам в данной области способами.

В другом варианте осуществления систему анализов на основе клетки используют идентификации средств, которые связываются или модулируют активность белка, такого как фермент, или его биологически активная часть, который обеспечивает продукцию или разрушение LY75 или обеспечивает посттрансляционную модификацию LY75. При первичном скрининге совокупности (например, библиотеку) соединений приводят в контакт клетками, которые естественным образом или рекомбинантно экспрессируют: (i) LY75, изоформу LY75, гомолог LY75, родственный LY75 полипептид, слитый белок LY75 или биологически активный фрагмент любого из указанных выше соединений; и (ii) белок, который обеспечивает процессинг LY75, изоформы LY75, гомолога LY75, родственного полипептида LY75, слитого белка LY75 или фрагмента LY75 для идентификации соединений, которые модулируют продукцию, разрушение или посттрансляционную модификацию LY75, изоформы LY75, гомолога LY75, родственного полипептида LY75, слитого белка LY75 или фрагмента LY75. При желании, соединения, идентифицированные при первичном скрининге затем можно анализировать при вторичном скрининге против клеток, естественным образом или рекомбинантно экспрессирующих LY75. Способность соединения-кандидата модулировать продукцию, разрушение или посттрансляционную модификацию LY75, изоформы, гомолога, родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75 можно определять известными специалистам в данной области способами, включая, но не ограничиваясь ими, проточную цитометрию, сцинтилляционный анализ, иммунопреципитацию и анализ вестерн-блоттинга.

В другом варианте осуществления средство, которое конкурентно взаимодействует (т.е. связывается) с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75, идентифицируют в анализе конкурентного связывания. По этому варианту осуществления клетки, экспрессирующие LY75, фрагмент LY75, родственный LY75 полипептид, фрагмент родственного LY75 полипептида или слитый белок LY75, приводят в контакт с соединением-кандидатом и соединением, для которого известно, что оно взаимодействует с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75; затем определяют способность соединения-кандидата предпочтительно взаимодействовать с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75. Альтернативно, средства, которые предпочтительно взаимодействуют (т.е. связываются) с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом или фрагментом родственного LY75 полипептида, идентифицируют в бесклеточной системе анализа путем приведения LY75, фрагмента LY75, родственного LY75 полипептида, фрагмента родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75 с соединением-кандидатом и соединением, для которого известно, что оно взаимодействует с LY75, родственным LY75 полипептидом или слитым белком LY75. Как указано выше, способность соединения-кандидата взаимодействовать с LY75, фрагментом LY75, родственным LY75 полипептидом, фрагментом родственного LY75 полипептида или слитым белком LY75 можно определять известными специалистам в данной области способами. Эти анализы, независимо от того на основе клеток или бесклеточные, можно использовать для скрининга совокупности (например, библиотеки) соединений-кандидатов.

В другом варианте осуществления идентифицируют средства, которые модулируют (т.е. активиру-

ют или подавляют) экспрессию или активность LY75 или родственного LY75 полипептида, путем приведения клеток (например, клеток прокариотического происхождения или эукариотического происхождения), экспрессирующих LY75 или родственный LY75 полипептид, в контакт с соединением-кандидатом или контрольным соединением (например, фосфатно-солевым буфером (PBS)) и определения экспрессии LY75, родственного LY75 полипептида или слитого белка LY75, иРНК, кодирующей LY75, или иРНК, кодирующей родственный LY75 полипептид. Уровень экспрессии LY75, родственного LY75 полипептида, иРНК, кодирующей LY75, или иРНК, кодирующей родственный LY75 полипептид, в присутствии соединения-кандидата сравнивают с уровнем экспрессии LY75, родственного LY75 полипептида, иРНК, кодирующей LY75, или иРНК, кодирующей родственный LY75 полипептид, в отсутствие соединения-кандидата (например, в присутствии контрольного соединения). Затем на основании этого сравнения можно идентифицировать соединение-кандидат как модулятор экспрессии LY75 или родственного LY75 полипептида. Например, когда экспрессия LY75 или иРНК является значительно выше в присутствии соединения-кандидата, чем при его отсутствии, соединение-кандидат идентифицируют как стимулятор экспрессии LY75 или иРНК. Альтернативно, когда экспрессия LY75 или иРНК является значительно ниже в присутствии соединения-кандидата, чем при его отсутствии, соединение-кандидат идентифицируют как ингибитор экспрессии LY75 или иРНК. Уровень экспрессии LY75 или иРНК, кодирующей его, можно определять известными специалистам в данной области способами. Например, экспрессию иРНК можно оценивать анализом "нозерн"-блот или RT-ПЦР и уровни белка можно оценивать анализом вестерн-блоттинга.

В другом варианте осуществления средства, которые модулируют активность LY75 или родственного LY75 полипептида, идентифицируют путем приведения препарата, содержащего LY75 или родственный LY75 полипептид, или клетки (например, прокариотические или эукариотические клетки), экспрессирующие LY75 или родственный LY75 полипептид, в контакт с тестируемым соединением или контрольным соединением и определения способности тестируемого соединения модулировать (например, стимулировать или ингибировать) активность LY75 или родственного LY75 полипептида. Активность LY75 или родственного LY75 полипептида можно оценивать детекцией индукции клеточного пути передачи сигнала LY75 или родственного LY75 полипептида (например, внутриклеточного Ca^{2+} , диацилглицерина, IP3 и т.д.), детекцией каталитической или ферментативной активности мишени на подходящем субстрате, детекцией индукции репортерного гена (например, регуляторного элемента, который реагирует на LY75 или родственный LY75 полипептид и является функционально связанным с нуклеиновой кислотой, кодирующей детектируемый маркер, например, люциферазу) или детекцией клеточного ответа, например, клеточной дифференцировки или клеточной пролиферации. На основании настоящего описания для изменения таких видов активности можно использовать способы, известные специалистам в данной области (см., например, патент США № 5401639, включенный в настоящее описание посредством ссылки). Затем можно идентифицировать соединение-кандидат как модулятор активности LY75 или родственного LY75 полипептида путем сравнения эффектов соединения-кандидата с контрольным соединением. Подходящие контрольные соединения включают фосфатно-солевой буфер (PBS) и нормальный физиологический раствор (NS).

В другом варианте осуществления средства, которые модулируют (т.е. активируют или подавляют) экспрессию, активность или экспрессию и активность LY75 или родственного LY75 полипептида, идентифицируют на модели на животных. Примеры подходящих животных включают, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, кроликов, обезьян, морских свинок, собак и кошек. Предпочтительно используемое животное представляет собой модель заболеваний по изобретению (например, ксенотрансплантаты линий клеток лимфомы DoHH2 или WSU-FSCCL у мышей SCID, Smith M.R., Joshi I., Jin F., Obasaju C., BMC Cancer, 2005 Aug 18; 5:103; ксенотрансплантаты линий клеток рака щитовидной железы, таких как ARO, Viaggi et al., Thyroid, 2003 Jun; 13(6):529-36; ксенотрансплантаты линий клеток рака мочевого пузыря, таких как UCRU-BL-12, UCRU-BL-13 и UCRU-BL-14, Russell et al., Cancer Res., 1986 Apr; 46(4 Pt 2):2035-40; ксенотрансплантаты линий клеток рака молочной железы, таких как MCF-7 (Ozzello L., Sordat M., Eur. J. Cancer, 1980; 16:553-559) и MCF10AT (Miller et al., J. Natl. Cancer Inst., 1993; 85:1725-1732), у бестимусных мышей или мышей SCID; ксенотрансплантаты линий клеток рака пищевода, таких как OE19, Kelly et al., Br. J. Cancer, 2010 Jul 13; 103 (2):232-8; ксенотрансплантаты линий клеток рака желудка, таких как NCI-N87, у бестимусных мышей; ксенотрансплантаты линий клеток рака головы и шеи, таких как FaDu и HNX-OE, или ксенотрансплантаты линий клеток рака кожи, таких как MV3, у бестимусных мышей, van Muijen et al., Int. J. Cancer, 1991 Apr 22; 48(1):85-91). Эти линии клеток можно использовать для тестирования соединений, которые модулируют уровни LY75, поскольку патологии, проявляющиеся на этих моделях, являются сходными, например, с заболеваниями по изобретению. По этому варианту осуществления тестируемое соединение или контрольное соединение вводят (например, перорально, ректально или парентерально, таким образом как интраперитонеально или внутривенно) подходящему животному и определяют эффект в отношении экспрессии, активности или экспрессии и активности LY75 или родственного полипептида LY75. Изменения экспрессии LY75 или родственного полипептида LY75 можно оценивать указанными выше способами.

В еще одном варианте осуществления LY75 или родственный LY75 полипептид используют в каче-

стве "белка-приманки" в двухгибридном анализе или трехгибридном анализе для идентификации других белков, которые связываются или взаимодействуют с LY75 или родственным полипептидом LY75 (см., например, патент США № 5283317; Zervos et al. (1993), *Cell*, 72:223-232; Madura et al. (1993), *J. Biol. Chem.*, 268:12046-12054; Bartel et al. (1993), *BioTechniques*, 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993), *Oncogene*, 8:1693-1696; и публикацию РСТ № WO 94/10300). Как будет понятно специалистам в данной области, такие связывающие белки также могут участвовать в распространении сигналов посредством LY75 как, например, выше или ниже элементов пути передачи сигнала, включая LY75.

Это изобретение дополнительно относится к новым средствам, идентифицируемым описанными выше анализами скрининга, и к видам их использования для видов лечения, как описано в настоящем описании. Кроме того, изобретение также относится к использованию средства, которое взаимодействует или модулирует активность LY75, в производстве лекарственного средства для лечения заболеваний по изобретению.

Терапевтическое использование LY75.

Изобретение относится к лечению или профилактике различных заболеваний и нарушений введением терапевтического соединения. Такие соединения включают, но не ограничиваются ими: LY75, аналоги LY75, родственные LY75 полипептиды и их производные и варианты (включая фрагменты); антитела (или другие аффинные реагенты) к указанным выше соединениям; нуклеиновые кислоты, кодирующие LY75, аналоги LY75, родственные LY75 полипептиды и их фрагменты; антисмысловые нуклеиновые кислоты к гену, кодирующему LY75 или родственный LY75 полипептид, и модулятор (например, агонисты и антагонисты) гена, кодирующего LY75 или родственный LY75 полипептид. Важным признаком настоящего изобретения является идентификация генов, кодирующих LY75, вовлеченный в злокачественные опухоли, такие как заболевания по изобретению. Заболевания по изобретению, например, можно лечить (например, для улучшения состояния симптомов или для замедления начала или прогрессирования) или проводить профилактику введением терапевтического соединения, которое снижает функцию или экспрессию LY75 в сыворотке или ткани индивидуумов, страдающих заболеваниями по изобретению.

В одном из вариантов осуществления одно или более антител (или других аффинных реагентов), где каждый специфически связывается с LY75, вводят отдельно или в комбинации с одним или более дополнительных терапевтических соединений или видов лечения.

Биологический продукт, такой как антитело (или другой аффинный реагент) является аллогенным для индивидуума, которому его вводят. В одном из вариантов осуществления являющемуся человеком индивидууму вводят LY75 человека или родственный LY75 полипептид человека, нуклеотидную последовательность, кодирующую LY75 человека или родственного LY75 полипептида человека, или антитело (или другой аффинный реагент) к LY75 человека или родственному LY75 полипептиду человека для терапии (например, для улучшения состояния симптомов или для замедления начала или прогрессирования) или для профилактики.

Без ограничения теории предполагают, что терапевтическая активность антител (или других аффинных реагентов), которые специфически связываются с LY75, можно получать посредством явления антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см., например, Janeway Jr. C.A. et al., *Immunobiology*, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., *Immunology, Infection, and Immunity*, 2004, p246-5; Albanell J. et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2003, 532:p2153-68 и Weng W-K. et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 21:p3940-3947).

Лечение и профилактика заболеваний по изобретению.

В отношении заболеваний по изобретению, например, проводят лечение или профилактику введением индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает одним или более заболеваний по изобретению или подвергается риску развития одного или более заболеваний по изобретению, соединения, которое модулирует (т.е. повышает или понижает) уровень или активность (т.е. функцию) LY75, который дифференциально содержится в сыворотке или ткани индивидуумов, страдающих одним или более заболеваний по изобретению по сравнению с сывороткой или тканью индивидуумов, не страдающих заболеваниями по изобретению. В одном из вариантов осуществления в отношении заболеваний по изобретению проводят течение или профилактику введением индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает одним или более заболеваний по изобретению или подвергается риску развития одного или более заболеваний по изобретению, соединения, которое регулирует (т.е. снижает) уровень или активность (т.е. функцию) LY75, которая повышается в сыворотке или ткани индивидуумов, страдающих одним или более заболеваний по изобретению. Примеры такого соединения включают, но не ограничиваются ими, антисмысловые олигонуклеотиды LY75, рибозимы, антитела (или другие аффинные реагенты), направленные против LY75, и соединения, которые ингибируют ферментативную активность LY75. Другие пригодные соединения, например, антагонисты LY75 и низкомолекулярные антагонисты LY75, можно идентифицировать анализами *in vitro*.

Злокачественную опухоль, например, заболевания по изобретению, также можно лечить или проводить их профилактику введением индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает такой злокачественной опухолью или подвергается риску развития такой злокачественной

опухоли, соединения, которое понижает уровень или активность (т.е. функцию) LY75, которые повышаются в сыворотке или ткани индивидуумов, страдающих такой злокачественной опухолью. Примеры такого соединения включают, но не ограничиваются ими: LY75, фрагменты LY75 и родственные LY75 полипептиды; нуклеиновые кислоты, кодирующие LY75, фрагмент LY75 и родственный LY75 полипептид (например, для применения в генотерапии), и для таких LY75 или родственных LY75 полипептидов с ферментативной активностью соединения или молекулы, которые, как известно, модулируют такую ферментативную активность. Другие соединения, которые можно использовать, например, агонисты LY75, можно идентифицировать анализами *in vitro*.

В другом варианте осуществления терапию или профилактику адаптируют для нужд отдельного индивидуума. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления соединения, которые поддерживают уровень или функцию LY75, терапевтически или профилактически вводят индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает злокачественной опухолью, например, заболеваниями по изобретению, у которого уровни или функции LY75 отсутствуют или понижаются относительно контрольного или нормального эталонного диапазона. В дополнительных вариантах осуществления соединения, которые поддерживают уровень или функцию LY75, терапевтически или профилактически вводят индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает злокачественной опухолью, например, заболеваниями по изобретению, у которого уровни или функции LY75 повышаются относительно контрольного или эталонного диапазона. В дополнительных вариантах осуществления соединения, которые понижают уровень или функцию LY75 терапевтически или профилактически вводят индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает злокачественной опухолью, например, заболеваниями по изобретению, у которого уровни или функции LY75 повышаются относительно контрольного или эталонного диапазона. В дополнительных вариантах осуществления соединения, которые понижают уровень или функцию LY75 терапевтически или профилактически вводят индивидууму, у которого подозревают или для которого известно, что он страдает злокачественной опухолью, например, заболеваниями по изобретению, у которого уровни или функции LY75 понижаются относительно контрольного или эталонного диапазона. Изменение функции или уровня LY75 вследствие введения таких соединений можно легко детектировать, например, путем получения образца (например, крови или мочи) и анализа *in vitro* уровней или активности LY75 или уровней иРНК, кодирующей LY75, или любого сочетания указанных выше. Такие анализы можно проводить до и после введения соединений, как описано в настоящем описании.

Соединения по изобретению включают, но не ограничиваются ими, любое соединение, например, малые органические молекула, белок, пептид, антитело (или другой аффинный реагент), нуклеиновую кислоту и т.д., которые восстанавливают профиль LY75 до нормального. Соединения по изобретению можно вводить в комбинации с любыми другими химиотерапевтическими лекарственными средствами.

Вакциноterapia.

Другой аспект изобретения представляет собой иммуногенную композицию, соответственно вакцинную композицию, содержащую LY75 или его содержащий эпитоп фрагмент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую LY75 или его фрагмент, необязательно совместно с иммуностимулятором.

Также предоставлены способ индукции иммунного ответа, который включает введение индивидууму таких композиций, и способ лечения или профилактики злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, который включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества таких композиций, и такие композиции для применения при лечении или профилактики заболеваний по изобретению.

Таким образом, LY75 может являться пригодным в качестве антигенного вещества, и его можно использовать для получения вакцин для лечения или профилактики злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению. Такое вещество может быть "антигенным" и/или "иммуногенным". Как правило, "антигенный" означает, что белок можно использовать для индукции антител (или других аффинных реагентов), или фактически он способен индуцировать образование антител у индивидуума или экспериментального животного. "Имуногенный" означает, что белок способен вызывать иммунный ответ, такой как защитный иммунный ответ, у индивидуума или экспериментального животного. Таким образом, в последнем случае белок может оказаться способным не только вызывать образование антител, а также иммунные ответы не связанные с антителами. "Имуногенный" также включает, может ли белок вызывать подобный иммунному ответ в условиях *in vitro*, например, в анализе Т-клеточной пролиферации. Для образования соответствующего иммунного ответа необходимым может являться присутствие одного или более адьювантов и/или соответствующая презентация антигена.

Специалисту понятно, что гомологи или производные LY75 также найдут применение в качестве антигенного/иммуногенного вещества. Таким образом, например, белки, которые содержат одно или более добавлений, делеций, замен или т.п., находятся в объеме настоящего изобретения. Кроме того, возможной может являться замена одной аминокислоты другой аналогичного "типа", например, замена один гидрофобной аминокислоты другой. Для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать программу, такую как программа CLUSTAL. Эта программа сравнивает аминокислотные последовательности и находит оптимальное выравнивание путем введения пропусков в последователь-

ность при необходимости. Для оптимального выравнивания можно рассчитывать идентичность или сходство аминокислот (идентичность плюс сохранение типа аминокислоты). Программа, такая как BLASTx, выравнивает наиболее длинные фрагменты сходных последовательностей и присваивает значение соответствия. Таким образом, возможным является проведение сравнения, при котором находят несколько областей сходства, где каждая имеет различный балл. В настоящем изобретении предусматривают оба типа анализа.

В случае гомологов и производных степень идентичности с белком, как описано в настоящем описании, является менее важной, чем то, что гомолог или производное должны сохранять его антигенность и/или иммуногенность. Тем не менее, предоставлены соответственно гомологи или производные, обладающие по меньшей мере 60% сходством (как указано выше) с белками или полипептидами, описываемыми в настоящем описании, например, предоставлены гомологи или производные, обладающие по меньшей мере 70% сходством, таким как по меньшей мере 80% сходством. В частности, предоставлены гомологи или производные, обладающие по меньшей мере 90 или даже 95% сходством. Соответственно гомологи или производные обладают по меньшей мере 60% идентичностью последовательности с белками или полипептидами, описываемыми в настоящем описании.

Предпочтительно гомологи или производные обладают по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере 80% идентичностью. Наиболее предпочтительно гомологи или производные обладают по меньшей мере 90 или даже 95% идентичностью.

В альтернативном подходе гомологи или производные могут представлять собой слитые белки, содержащие группы, которые облегчают очистку, например, посредством эффективного мечения желаемого белка или полипептида. Необходимым может являться удаление "метка", или возможно, что сам слитый белок сохраняет достаточную антигенность, чтобы являться пригодным.

Хорошо известно, что возможным является скрининг антигенного белка или полипептида для идентификации эпитопных областей, т.е. таких областей, которые обеспечивают антигенность или иммуногенность белка или полипептида. Для тестирования фрагментов и/или гомологов и/или производных на антигенность можно использовать способы, хорошо известные специалистам. Таким образом, фрагменты по настоящему изобретению должны содержать одну или более таких эпитопных областей или являться достаточно сходными с такими областями, чтобы сохранять их антигенные/иммуногенные свойства. Таким образом, для фрагментов по настоящему изобретению степень идентичности, вероятно, не имеет значения, так как они могут являться на 100% идентичными конкретной части белка или полипептида, гомолога или производного, как описано в настоящем описании. Важным вопросом вновь заключается в том, что фрагмент сохраняет антигенные/иммуногенные свойства белка, из которого его получают.

Важным для гомологов, производных и фрагментов является то, что они обладают, по меньшей мере, степенью антигенности/иммуногенности белка или полипептида, из которого их получают. Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к антигенным/или иммуногенным фрагментам LY75 или его гомологов или производных.

LY75 или его антигенные фрагменты можно предоставлять отдельно в виде очищенного или выделенного препарата. Их можно предоставлять в виде части смеси с одним или более другими белками по изобретению или их антигенными фрагментами. Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к антигенной композиции, содержащей LY75 и/или один или более его антигенных фрагментов. Такую композицию можно использовать для детекции и/или диагностики злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению.

Вакцинные композиции по изобретению могут представлять собой профилактическую или терапевтическую вакцинную композицию.

Вакцинные композиции по изобретению могут содержать один или более адъювантов (иммуностимуляторов). Хорошо известные в данной области примеры включают неорганические гели, такие как гидроксид алюминия, и эмульсии вода-в-масле, такие как неполный адъювант Фрейнда. Другие пригодные адъюванты хорошо известны специалистам.

Подходящие адъюванты для применения в вакцинных композициях для лечения злокачественной опухоли включают: 3-де-О-ацилированный монофосфорил липид А (известный как 3D-MPL или просто MPL см. WO 92/116556), сапонин, например, QS21 или QS7, и агонисты TLR4, такие как содержащая CpG молекула, например, как описано в WO 95/26204. Применяемые адъюванты могут представлять собой комбинацию компонентов, например, MPL и QS21 или MPL, QS21 и содержащей CpG молекулы. Адъюванты можно формулировать в виде эмульсий "масло-в-воде" или липосомальных составов. Такие препараты могут содержать другие носители.

В другом варианте осуществления препарат олигонуклеотидов, содержащий 10 или более последовательных нуклеотидов, комплементарных нуклеотидной последовательности, кодирующей LY75 или пептидные фрагменты LY75, используют в качестве вакцин для лечения злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению. Такие препараты могут содержать адъюванты или другие носители.

Ингибирование LY75 для лечения заболеваний по изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения в отношении злокачественной опухоли, напри-

мер, заболеваний по изобретению, проводят лечение или профилактику путем введения соединения, которое антагонизирует (ингибирует) уровень и/или функцию LY75, которая является повышенной в сыворотке или ткани индивидуумов, страдающих такой злокачественной опухолью, по сравнению с сывороткой или тканью индивидуумов, не страдающих такой злокачественной опухолью.

Пригодные для этой цели соединения включают, но не ограничиваются ими, антитела против LY75 (или другие аффинные реагенты и фрагменты и производные, содержащие его связывающую область), антисмысловые или рибозимные нуклеиновые кислоты LY75, и нуклеиновые кислоты, кодирующие дисфункциональный LY75, которые можно использовать для "нокаута" функции эндогенного LY75 путем гомологичной рекомбинации (см., например, Caraccioli, 1989, Science, 244:1288-1292). Другие соединения, которые ингибируют функцию LY75 можно идентифицировать с использованием известных анализов *in vitro*, например, анализов на способность тестируемого соединения ингибировать связывание LY75 с другим белком или партнером по связыванию, или ингибировать известную функцию LY75.

Такое ингибирование можно, например, оценивать *in vitro* или в культуре клеток, а также можно применять генетические анализы. Предпочтительные способы также можно использовать для детекции уровней LY75 до введения соединения и после него. Подходящие анализы *in vitro* или *in vivo* используют для определения эффекта конкретного соединения, и показано ли введение для лечения пораженной ткани, как более подробно описано ниже.

В конкретном варианте осуществления соединение, которое ингибирует функцию LY75 (активность), вводят терапевтически или профилактически индивидууму, у которого детектируют повышенные уровни в сыворотке или ткани или функциональную активность LY75 (например, выше нормального уровня или желаемого уровня) по сравнению с сывороткой или тканью индивидуумов, например, с заболеваниями по изобретению, которые не получают лечение по изобретению, или приводит уровень или активность к уровню или активности, выявляемым у индивидуумов, не страдающих такой злокачественной опухолью, или predetermined эталонному диапазону. Для измерения повышения уровня или функции LY75 можно применять стандартные в данной области способы, как указано выше. Подходящие ингибирующие LY75 композиции могут, например, содержать низкомолекулярные соединения, т.е. молекулы 1000 Да или менее. Такие низкомолекулярные соединения можно идентифицировать способами скрининга, описываемыми в настоящем описании.

Анализы терапевтических или профилактических соединений.

Настоящее изобретение также относится к анализам для применения в поиске лекарственных средств с целью идентификации или подтверждения эффективности соединений для лечения или профилактики злокачественных опухолей, экспрессирующих LY75, например, заболеваний по изобретению.

Таким образом, предоставлен способ скрининга на соединения, которые модулируют активность LY75, где способ включает: (а) приведение LY75 или его биологически активной части в контакт с соединением-кандидатом и (b) определение, модулируется ли таким образом активность LY75. Такой способ может включать (а) приведение LY75 или его биологически активной части в контакт с соединением-кандидатом в образце и (b) сравнение активности LY75 или его биологически активной части в указанном образце после приведения в контакт с указанным соединением-кандидатом с активностью LY75 или его биологически активной части в указанном образце до приведения в контакт с указанным соединением-кандидатом или с эталонным уровнем активности.

Способ скрининга может представлять собой способ скрининга на соединения, которые ингибируют активность LY75.

LY75 или его биологически активная часть может, например, экспрессироваться на клетке или клеткой. LY75 или его биологически активную часть можно, например, выделять из клеток, которые его экспрессируют. LY75 или его биологически активную часть можно, например, иммобилизовать на твердой фазе.

Также предоставлен способ скрининга на соединения, которые модулируют экспрессию LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, где способ включает: (а) приведение клеток, экспрессирующих LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, в контакт с соединением-кандидатом и (b) определение, модулируют ли таким образом экспрессию LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75. Такой способ может включать (а) приведение клеток, экспрессирующих LY75 или нуклеиновую кислоту, кодирующую LY75, в контакт с соединением-кандидатом в образце и (b) сравнение экспрессии LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, клетками в указанном образце после приведения в контакт с указанным соединением-кандидатом с экспрессией LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, клеток в указанном образце перед приведением в контакт с указанным соединением-кандидатом или с эталонным уровнем экспрессии.

Способ может представлять собой способ скрининга на соединения, которые ингибируют экспрессию LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75.

Другие аспекты изобретения включают: соединение, получаемое указанным выше способом скрининга, соединение, которое модулирует активность или экспрессию LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75, например, соединение, которое ингибирует активность или экспрессию LY75 или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75.

Такое соединение предоставляют для применения в лечении или профилактики злокачественной опухоли, например заболеваний по изобретению. Также предоставлен способ лечения или профилактики злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, который включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества такого соединения.

Тестируемые соединения можно оценивать на их способность восстанавливать уровни LY75 у индивидуума, страдающего, например, заболеваниями по изобретению, до уровней, выявляемых у индивидуумов, не страдающих такими злокачественными опухолями, или вызывать аналогичные изменения на экспериментальных моделях таких злокачественных опухолей на животных. Соединения, способные восстанавливать уровни LY75 у индивидуума, страдающего например, заболеваниями по изобретению, до уровней, выявляемых у индивидуумов, не страдающих такими злокачественными опухолями, или вызывать аналогичные изменения на экспериментальных моделях таких злокачественных опухолей на животных, можно использовать в качестве лидерных соединений для дальнейшего поиска лекарственных средств или использовать терапевтически. Экспрессию LY75 можно оценивать предпочтительными способами, иммунологическими анализами, электрофорезом в геле с последующей визуализацией, детекцией активности LY75 или любым другим способом, указанным в настоящем описании или известным специалистам в данной области. Такие анализы можно использовать для скрининга лекарственных средств-кандидатов в клиническом мониторинге или в разработке лекарственных средств, где относительное содержание LY75 может служить в качестве суррогатного маркера клинического заболевания.

В различных конкретных вариантах осуществления анализы *in vitro* можно проводить с клетками, характерными для типов клеток, вовлеченных в нарушение у индивидуума, для определения, обладает ли соединение желаемым действием на такие типы клеток.

Соединения для применения в терапии можно тестировать в подходящих модельных системах на животных перед тестированием на людях, включая, но не ограничиваясь ими, крыс, мышей, курицу, коров, обезьян, кроликов и т.д. Для тестирования *in vivo* перед введением людям можно использовать любую известную в данной области модельную систему на животных. Примеры моделей на животных заболеваний по изобретению включают, но не ограничиваются ими, ксенотрансплантаты линий клеток лимфомы DoHH2 или WSU-FSCCL у мышей SCID, Smith M.R., Joshi I., Jin F., Obasaju C., BMC Cancer, 2005 Aug 18; 5:103; ксенотрансплантаты линий клеток рака щитовидной железы, таких как ARO, Viaggi et al., Thyroid, 2003 Jun; 13(6):529-36; ксенотрансплантаты линий клеток рака мочевого пузыря, таких как UCRU-BL-12, UCRU-BL-13 и UCRU-BL-14, Russell et al. Cancer Res., 1986 Apr; 46(4 Pt 2):2035-40; ксенотрансплантаты линий клеток рака молочной железы, таких как MCF-7 (Ozzello L., Sordat M., Eur. J. Cancer, 1980; 16:553-559) и MCF10AT (Miller et al., J. Natl Cancer Inst., 1993; 85:1725-1732,) у бестимусных мышей или мышей SCID; ксенотрансплантаты линий клеток рака пищевода, таких как OE19, Kelly et al., Br. J. Cancer, 2010 Jul 13; 103(2):232-8; ксенотрансплантаты линий клеток рака желудка, таких как NCI-N87, у бестимусных мышей; ксенотрансплантаты линий клеток рака головы и шеи, таких как FaDu и HNX-OE, или ксенотрансплантаты линий клеток рака кожи, таких как MV3, у бестимусных мышей, van Muijlen et al., Int. J. Cancer, 1991 Apr 22; 48(1):85-91. Эти линии клеток можно использовать для тестирования соединений, которые модулируют уровни LY75, поскольку патологии, проявляющиеся на этих моделях, являются сходными, например, с заболеваниями по изобретению. Специалисту в данной области также понятно, что на основании настоящего описания трансгенных животных можно получать с "нокаутными" мутациями гена или генов, кодирующих LY75. "Нокаутная" мутация гена представляет собой мутацию, которая приводит к тому, что мутантный ген не экспрессируется или экспрессируется в аберрантной форме, или при таком низком уровне, что активность, связанная с продуктом гена практически или полностью отсутствует. Предпочтительно трансгенное животное представляет собой млекопитающее, более предпочтительно, трансгенное животное представляет собой мышь.

В одном из вариантов осуществления тестируемые соединения, которые модулируют экспрессию LY75, идентифицируют на не являющихся человеком животных (например, мышах, крысах, обезьянах, кроликах и морских свинках), предпочтительно на моделях на не являющихся человеком животных заболеваний по изобретению, при которых экспрессируется LY75. По этому варианту осуществления животным вводят тестируемое соединение или контрольное соединение и определяют эффект тестируемого соединения на экспрессию LY75. Тестируемое соединение, которое изменяет экспрессию LY75, можно идентифицировать сравнением уровня LY75 (или иРНК, кодирующей его) у животного или в группе животных, обрабатываемых тестируемым соединением, с уровнем LY75 или иРНК у животного или в группе животных, обрабатываемых контрольным соединением. Для определения уровней иРНК и белка можно использовать известные специалистам в данной области способы, например, гибридизацию *in situ*. Животных могут умерщвлять или могут не умерщвлять для анализа эффектов тестируемого соединения.

В другом варианте осуществления тестируемые соединения, которые модулируют активность LY75 или его биологически активной части, идентифицируют на не являющихся человеком животных (например, мышах, крысах, обезьянах, кроликах и морских свинках), предпочтительно на моделях на не являющихся человеком животных заболеваний по изобретению, при которых экспрессируется LY75. По этому варианту осуществления животным вводят тестируемое соединение или контрольное соединение и определяют эффект тестируемого соединения на активность LY75. Тестируемое соединение, которое

изменяет активность LY75 можно идентифицировать путем анализа животных, обрабатываемых контрольным соединением, и животных, обрабатываемых тестируемым соединением. Активность LY75 можно оценивать детекцией индукции клеточного вторичного мессенджера LY75 (например, внутриклеточного Ca^{2+} , диацилглицерина, IP3 и т.д.), детекцией каталитической или ферментативной активности LY75 или его партнера по связыванию, детекцией индукции репортерного гена (например, регуляторного элемента, который реагирует на LY75, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей детектируемый маркер, такой как люцифераза или зеленый флуоресцентный белок) или детекцией клеточного ответа (например, клеточной дифференцировки или клеточной пролиферации). Для детекции изменений активности LY75 можно использовать известные специалистам в данной области способы (см., например, патент США № 5401639, включенный в настоящее описание посредством ссылки).

В еще одном варианте осуществления тестируемые соединения, которые модулируют уровень или экспрессию LY75, идентифицируют у являющихся человеком индивидуумов, страдающих, например, заболеваниями по изобретению, предпочтительно у индивидуумов, страдающих, например, тяжелыми заболеваниями по изобретению. По этому варианту осуществления тестируемое соединение или контрольное соединение вводят являющемуся человеком индивидууму и определяют эффект тестируемого соединения на экспрессию LY75 анализом экспрессии LY75 или иРНК, кодирующей LY75, в биологическом образце (например, в сыворотке, плазме или моче). Тестируемое соединение, которое изменяет экспрессию LY75, можно идентифицировать сравнением уровня LY75 или иРНК, кодирующей LY75, у индивидуума или группы индивидуумов, получавших лечение контрольным соединением, с уровнем у индивидуума или группы индивидуумов, получавших лечение тестируемым соединением. Альтернативно, изменения экспрессии можно идентифицировать сравнением уровня LY75 или иРНК, кодирующей LY75, у индивидуума или группы индивидуумов до введения тестируемого соединения и после него. Для получения биологического образца и анализа экспрессии иРНК или белка можно использовать способы, известные специалистам в данной области. Например, для оценки изменений уровня LY75 можно использовать предпочтительные способы, описываемые в настоящем описании.

В другом варианте осуществления тестируемые соединения, которые модулируют активность LY75, идентифицируют у являющихся человеком индивидуумов, страдающих, например, заболеваниями по изобретению (предпочтительно индивидуумов, например, с тяжелыми заболеваниями по изобретению). В этом варианте осуществления тестируемое соединение или контрольное соединение вводят являющемуся человеком индивидууму и определяют эффект тестируемого соединения на активность LY75. Тестируемое соединение, которое изменяет активность LY75, можно идентифицировать сравнением биологических образцов от индивидуумов, получавших лечение контрольным соединением, с образцами от индивидуумов, получавших лечение тестируемым соединением. Альтернативно, изменения активности LY75 можно идентифицировать сравнением активности LY75 у индивидуума или группы индивидуумов до введения тестируемого соединения и после него. Активность LY75 можно оценивать детекцией в биологическом образце (например, в сыворотке, плазме или моче) индукции клеточного пути передачи сигнала LY75 (например, внутриклеточного Ca^{2+} , диацилглицерина, IP3 и т.д.), каталитической или ферментативной активности LY75 или его партнера по связыванию, или клеточного ответа, например, клеточной дифференцировки или клеточной пролиферации. Для детекции изменений индукции вторичного мессенджера LY75 или изменений клеточного ответа можно использовать известные специалистам в данной области способы. Например, можно использовать RT-ПЦР для детекции изменений индукции клеточного вторичного мессенджера.

В другом варианте осуществления тестируемое соединение, которое изменяет уровень или экспрессию LY75 до уровней, детектируемых у контрольных индивидуумов (например, людей, не страдающих, например, заболеваниями по изобретению), выбирают для дальнейшего тестирования или терапевтического использования. В другом варианте осуществления тестируемое соединение, которое изменяет активность LY75 до активности, выявляемой у контрольных индивидуумов (например, людей, не страдающих, например, заболеваниями по изобретению), выбирают для дальнейшего тестирования или терапевтического использования.

В другом варианте осуществления тестируемые соединения, которые уменьшают тяжесть одного или более симптомов, связанных, например, с заболеваниями по изобретению, идентифицируют у являющихся человеком индивидуумов, страдающих, например, заболеваниями по изобретению, предпочтительно индивидуумов, например, с тяжелыми заболеваниями по изобретению. По этому варианту осуществления тестируемое соединение или контрольное соединение вводят индивидуумам и определяют эффект тестируемого соединения на один или более симптомов, например, заболеваний по изобретению. Тестируемое соединение, которое уменьшает один или более симптомов, можно идентифицировать сравнением индивидуумов, получавших лечение контрольным соединением, с индивидуумами, получавшими лечение тестируемым соединением. Для определения, уменьшает ли тестируемое соединение один или более симптомов, связанных, например, с заболеваниями по изобретению, можно использовать способы, известные врачам, специализирующимся, например, на заболеваниях по изобретению. Например, тестируемое соединение, которое снижает опухолевую нагрузку у индивидуума, страдающего, например, заболеваниями по изобретению, будет являться эффективным для такого индивидуума.

В другом варианте осуществления тестируемое соединение, которое уменьшает тяжесть одного или более симптомов, связанных со злокачественной опухолью, например, заболеваниями по изобретению, выбирают для дальнейшего тестирования или терапевтического использования.

Терапевтические и профилактические композиции и их использование.

Изобретение относится к способам лечения (и профилактики), включающим введение индивидууму эффективного количества соединений по изобретению (например, белка LY75, аффинного реагента, способного специфически связываться с LY75 или его фрагментом, или нуклеиновой кислоты, кодирующей LY75). В конкретном аспекте соединение является в значительной степени очищенным (например, не содержит по существу веществ, которые ограничивают его эффект или оказывают нежелательные побочные эффекты).

Составы и способы введения, которые можно применять, когда соединение содержит нуклеиновую кислоту, описаны выше; дополнительные подходящие составы и пути введения описаны ниже.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения соединения по изобретению, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432), конструкция нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения могут быть энтеральными или парентеральными и включают, но не ограничиваются ими, интрадермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Соединения можно вводить любым подходящим путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистая оболочка ротовой полости, слизистая прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, желательным может являться введение фармацевтических композиций по изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую и интратекальную инъекцию; внутрижелудочковую инъекцию можно облегчать внутрижелудочковым катетером, например, прикрепленным к резервуару, такому как резервуар Оммаи. Также можно применять легочное введение, например, с использованием ингалятора или распылителя и состава с образующим аэрозоль средством.

В одном из аспектов изобретения нуклеиновую кислоту, применяемую в изобретении, можно доставлять в кожу, например, применяя опосредованную частицами эпидермальную доставку.

В конкретном варианте осуществления желательным может являться введение фармацевтических композиций по изобретению местно в область, для которой необходимо проводить лечение; это можно получать, например и без ограничения, местной инфузией во время операции, местным применением, например, посредством инъекции, посредством катетера или посредством имплантата, где указанный имплантат состоит из пористого, непористого или гелеобразного вещества, включая мембраны, такие как синалловые мембраны или волокна. В одном из вариантов осуществления введения можно проводить посредством прямой инъекции, например, в лимфоидную ткань, ткань щитовидной железы, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, пищевода, головы и шеи или кожи, или в очаг (или бывший очаг) злокачественной опухоли или неопластической или пренеопластической ткани.

В другом варианте осуществления соединение можно доставлять в везикулу, в частности липосому (см. Langer, 1990, *Science*, 249:1527-1533; Treat et al., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, p. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, p. 317-327; см. в основном там же).

В еще одном варианте осуществления соединение можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов осуществления можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery*, 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.*, 321:574). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные вещества (см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61; см. также Levy et al., 1985, *Science*, 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.*, 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.*, 71:105). В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно помещать в непосредственно близости от терапевтической мишени, например, заболеваний по изобретению, таким образом, что требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, p. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

В конкретном варианте осуществления в случае, когда соединение по изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для активации экспрессии кодируемого ей белка, посредством ее конструирования в виде части подходящего экспрессирующего нуклеиновую кислоту вектора и ее введения таким образом, чтобы она становилась внутриклеточной, например, с использованием ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286),

или посредством прямой инъекции, или с использованием бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытием липидами или рецепторами клеточной поверхности, или трансфицирующими средствами, или ее введением в связанном состоянии с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:1864-1868) и т.д. Альтернативно, нуклеиновую кислоту можно вводить внутриклеточно и встраивать в ДНК клетки-хозяина для экспрессии посредством гомологичной рекомбинации.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный органом регулирования федерального правительства или правительства штата или приведенный в фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно, предпочтительным носителем является вода. В качестве жидких носителей также можно применять физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, в частности для инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. При желании композиция также может содержать незначительные количества смачивающих средств или эмульгаторов, или буферизирующих pH средств. Такие композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с длительным высвобождением и т.п. Композицию можно формулировать в виде суппозитория с общепринятыми связывающими средствами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный состав также может содержать общепринятые носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" E.W. Martin. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения, например, в очищенной форме, совместно с подходящим количеством носителя, таким образом, чтобы обеспечивать форму для подходящего введения индивидууму. Состав должен соответствовать способу введения.

В одном из вариантов осуществления, например, в случае, когда применяют одно или более антигенов, композицию формулируют в соответствии с общепринятыми способами как фармацевтическую композицию, адаптированную для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может содержать солубилизатор и местный анестетик, такой как лидокаин, облегчения боли в участке инъекции. Как правило, ингредиенты поставляют раздельно или смешанными друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воды концентрата в герметично запечатанном контейнере, такой как ампула или саше, с указанием количества активного средства. В случае, когда композиция не предназначена для введения посредством инфузии, его можно дозировать в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В случае, когда композицию вводят посредством инъекции, можно предоставлять ампулу стерильной воды для инъекции или физиологического раствора, таким образом, чтобы можно было смешивать ингредиенты перед введением.

Соединения по изобретению можно формулировать в виде нейтральных или солевых форм. При необходимости фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные аминогруппами, такие как соли, получаемые из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные свободными карбоксильными группами, такие как соли, получаемые из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Количество соединения по изобретению, которое будет эффективным для лечения злокачественной опухоли, например, заболеваний по изобретению, можно определять общепринятыми клиническими способами. Кроме того, можно необязательно применять анализы *in vitro* для облегчения идентификации оптимальных диапазонов доз. Точная доза, которую необходимо применять в составе, также зависит от пути введения, и тяжести заболевания или нарушения, и ее устанавливают в соответствии с усмотрением практикующего врача и обстоятельств каждого индивидуума. Однако подходящие диапазоны доз для внутривенного введения, как правило, составляют приблизительно 20-500 мкг активного соединения на 1 кг массы тела. Подходящие диапазоны доз для интраназального введения, как правило, составляют приблизительно от 0,01 пг/кг массы тела до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости "доза-эффект", получаемых из тестовых систем *in vitro* или на моделях на

животных.

Суппозитории, как правило, содержат активный ингредиент в диапазоне от 0,5 до 10 мас.%; пероральные составы предпочтительно содержат от 10 до 95% активного ингредиента.

Изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или более контейнеров, наполненных одним или более ингредиентов фармацевтических композиций по изобретению. Необязательно к такому контейнеру(ам) может прилагаться уведомление в форме, предписываемой государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, где уведомление отражает (а) одобрение органом производства, использования или продажи для введения человеку, (b) инструкции по использованию или и то и другое.

Таким образом, в одном из аспектов набор содержит антитела, применяемые в изобретении, например, антитела могут находиться в лиофилизированной форме для восстановления перед введением или использованием. В случае, когда набор предназначен для применения в терапии/лечении, таком как злокачественная опухоль, антитело или антитела можно восстанавливать изотоническим водным раствором, который можно необязательно предоставлять с набором. В одном из аспектов набор может содержать полипептид, такой как иммуногенный полипептид, применяемый в изобретении, который, например, может находиться в лиофилизированной форме. Последний набор может дополнительно содержать адъювант для восстановления иммуногенного полипептида.

Изобретение также относится к композиции, как описано в настоящем описании, например, фармацевтической композиции и/или вакцинной композиции, для применения для индукции иммунного ответа у индивидуума.

В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретение относится к лекарственному средству, содержащему отдельно или совместно:

(a) аффинные реагенты, которые связываются LY75, и

(b) средство против злокачественной опухоли или другое активное средство, для одновременного, последовательного или раздельного введения для лечения злокачественной опухоли, предпочтительно для лечения одного из заболеваний по изобретению.

Определение относительного содержания LY75 способом визуализации.

Преимущество определения относительного содержания LY75 способом визуализации может заключаться в том, что такой способ является неинвазивным (за исключением того, что необходимым может являться введение реагентов), и нет необходимости получать образец от индивидуума.

Подходящие способы визуализации включают позитронно-эмиссионную томографию (PET) и однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT). Для визуализации LY75 такими способами необходимо введение или связывание подходящей метки, например, радиоактивной метки, такой как ^{18}F , ^{11}C или ^{123}I (более подробно о способах см., например, NeuroRx - The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics (2005) 2(2), 348-360 и там же стр. 361-371). Радиоактивные метки или другие метки можно встраивать в LY75 введением индивидууму (например, посредством инъекции) подходящего меченого конкретного лиганда. Альтернативно, их можно встраивать в реагент с аффинностью связывания (например, антитело), специфический к LY75, который можно вводить индивидууму (например, посредством инъекции). Для обсуждения использования аффител для визуализации см., например, Orlova A., Magnusson M., Eriksson T.L., Nilsson M., Larsson B., Hoiden-Guthenberg I., Widstrom C., Carlsson J., Tolmachev V., Stahl S., Nilsson F.Y., Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody molecule, Cancer Res., 2006 Apr 15; 66(8):4339-48).

Диагностика и лечение злокачественной опухоли, включая заболевания по изобретению, с использованием иммуногистохимии.

Имуногистохимия представляет собой превосходный используемый способ детекции и, таким образом, может являться очень пригодной при диагностике и лечении злокачественной опухоли, включая заболевания по изобретению. Иммуногистохимию можно использовать для детекции, диагностики или мониторинга злокачественных опухолей, таких как указанные выше злокачественные опухоли, посредством локализации антигенов LY75 в тканевых срезах с использованием меченых антител (или других аффинных реагентов), их производных и аналогов, которые специфически связываются с LY75, как специфические реагенты посредством взаимодействий антиген-антитело, которые визуализируют маркером, таким как флуоресцентный краситель, фермент, радиоактивный элемент или коллоидное золото.

Преимущество технологии моноклонального антитела имеет большое значение в обеспечении места иммуногистохимии в современной точной диагностике неоплазий человека.

Идентификация диссеминированных неопластически трансформированных клеток иммуногистохимией обеспечивает более четкую картину инвазии и метастазов злокачественной опухоли, а также эволюцию опухолевой клетки, связанную с иммунофенотипом, приводящим к повышенному злокачественному характеру. Дополнительно противоопухолевые терапевтические подходы могут включать различные виды персонализированной иммунотерапии, специфической для конкретного иммунофенотипического паттерна, связанного с неопластическим заболеванием каждого индивидуального пациента. Для дополнительного обсуждения см., например, Bodey B., The significance of immunohistochemistry in the

diagnosis and therapy of neoplasms, *Expert Opin Biol Ther.*, 2002 Apr; 2(4):371-93.

Предпочтительные признаки каждого аспекта изобретения являются такими как для каждого из других аспектов с соответствующими изменениями. Документы известного уровня техники, указанные в настоящем описании, включены в полном объеме, предусмотренным законом.

Изобретение проиллюстрировано следующими ниже неограничивающими примерами.

Пример 1: идентификация LY75, экспрессируемого в образцах ткани рака мочевого пузыря, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, мелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, мелкоклеточного рака легких, лимфомы, острого моноцитарного лейкоза и в образцах ткани клеток множественной миеломы с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC/MS).

С использованием следующего ниже протокола мембранные белки, экстрагируемые из образцов ткани рака мочевого пузыря, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, мелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, мелкоклеточного рака легких, лимфомы, острого моноцитарного лейкоза и в клетках множественной миеломы, и соответствующие образцы нормальной или нормальной прилежащей ткани (NAT) расщепляли и секвенировали получаемые пептиды тандемной масс-спектрометрией.

1.1. Вещества и способы.

1.1.1. Фракционирование плазматической мембраны.

Клетки, получаемые из образцов ткани рака мочевого пузыря, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, мелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, мелкоклеточного рака легких, лимфомы, острого моноцитарного лейкоза, и клетки множественной миеломы или получаемые из нормальной или нормальной прилежащей ткани гомогенизировали и подвергали центрифугированию при 1000×g. Отбирали супернатант и ультрацентрифугировали при 49500×g. Получаемый осадок повторно гомогенизировали и разделяли центрифугированием в непрерывном градиенте плотности сахарозы. После ультрацентрифугирования при 107000×g фракции на границе раздела фаз собирали и осаждали.

1.1.2. Солюбилизация плазматической мембраны.

Фракции плазматической мембраны ресуспендировали в SDS (додецилсульфате натрия) с получением конечной концентрации SDS 0,5%, центрифугировали и экстрагировали солюбилизованный белок.

1.1.3. Трипсинолиз.

Для расщепления в растворе объем раствора 50 мкг белка довели до 100 мкл с использованием 200 мМ бикарбоната аммония. К образцу добавляли 10 мкл восстановителя DL-дитиотреитола (75 мМ) и инкубировали при 80°C в течение 15 мин. После этого следовала стадия блокирования цистеином с использованием 10 мкл 150 мМ йодацетамида и инкубации в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем концентрацию SDS разводили до 0,05% добавлением ультрачистой воды. К смеси добавляли достаточный объем трипсина (Promega V5111), обеспечивающий 1 мкг трипсина на 2,75 мкг белка, и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Альтернативно, 105 мкг растворов белка восстанавливали с использованием 3 мкл 50 мМ ТСЕР и инкубации при 60°C в течение 1 ч. Затем образец обрабатывали на устройствах фильтрации FASP набора Protein Digestion (Protein Discovery) по инструкциям производителя, но с использованием триэтилбикарбоната аммония вместо бикарбоната аммония. Трипсинолиз проводили в конечном объеме 75 мкл с использованием 1 мкг трипсина на 50 мкг белка.

1.1.4. Фракционирование пептидов.

Образцы расщепленных белков сушили в вакууме, ресуспендировали в 0,1% водной муравьиной кислоты и добавляли трифторуксусную кислоту (TFA) для понижения pH раствора до <3. Пептиды разделяли ионным обменом с использованием колонки Agilent Zorbax Bio-Strong Cation Exchange series II на системе жидкостной хроматографии Agilent LC1200 Series. Альтернативно, использовали фракционирующую колонку Agilent 3100 OFFGEL и набор OFFGEL pH 3-10 для разделения на основе pI в соответствии с протоколом поставщика. После повторной гидратации в каждую лунку загружали стрипы IPG, равные объемы продукта расщепления мембраны. После разделения получаемые фракции подкисляли.

1.1.5. Масс-спектрометрия.

Фракционированные образцы анализировали жидкостной хроматографией-масс-спектрометрией с использованием системы СЭЖХ Waters nanoACQUITY, оснащенной колонкой СЭЖХ nanoACQUITY VEN 130 C18, 75 мкм ×250 мм (186003545) и LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Пептиды элюировали градиентом 300 нл/мин с увеличением ацетонитрила от 3% до 35% в течение 120 мин. Масс-спектры полного сканирования получали при разрешающей способности 60000 в диапазоне массовых чисел 400-2000 m/z в Orbitrap. В каждом цикле выбирали двадцать наиболее интенсивных пептидов для сканирования CID MS/MS в линейной ионной ловушке с источником ионов с нанораспылением, уста-

новленном на устройстве.

1.1.6. Анализ аминокислотной последовательности пептида.

Необработанные данные, получаемые из LTQ Orbitrap Velos, обрабатывали программным обеспечением Mascot (Matrix Science), в котором используют алгоритм Mowse (Curr Biol., 1993 Jun 1; 3(6):327-3) для получения последовательностей аминокислот из списков пиков путем поиска против базы данных последовательностей, состоящей из Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) и SwissProt (<http://www.uniprot.org>) наряду с загрязняющими белковыми последовательностями. Критерии идентификации пептидов включали расщепление трипсином, до 2 пропущенных участков расщепления и различные биологические и химические модификации (окисленный метионин, модификация цистеина MMTS или йодацетамидом и фосфорилирование серина, треонина и тирозина). Пептиды, ранжированные 1 с ожидаемым значением 0,05% или менее, источником ионов 28 или выше загружали в базу данных авторов изобретения OGAP, где их обрабатывали на группы белков.

1.1.7. Дискриминация белков в образцах ткани, ассоциированных с раком мочевого пузыря, раком молочной железы, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком пищевода, раком желудка, раком головы и шеи, раком почки, немелкоклеточным раком легких, раком яичника, раком поджелудочной железы, раком кожи, мелкоклеточным раком легких, лимф омой, острым моноцитарным лейкозом, и в клетках множественной миеломы.

В способе идентификации LY75 использовали пептидные последовательности, получаемые экспериментально масс-спектрометрией, как описано выше, природных белков человека для идентификации и установления кодирующих экзонов в опубликованных геномных последовательностях человека. Эти экспериментально определенные последовательности, указанные в табл. 1, сравнивали с базой данных OGAP®, которую составляли посредством обработки и интеграцией масс пептидов, сигнатур пептидов, EST и открытого источника данных геномных последовательностей, как описано в международной патентной заявке WO 2009/087462.

Таблица 1

LY75-специфические пептиды, идентифицированные LC/MS в плазматических мембранах образцов ткани рака мочевого пузыря, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, мелкоклеточного рака легких, лимфомы, острого моноцитарного лейкоза и клетках множественной миеломы

SEQ ID No	Идентифицированный пептид
3	AANDPFTIVHGNTGK
4	CLGLDITK
5	CEHHSLYGAAR
6	KGGSEESLCDQPYHEIYTR
7	GGSEESLCDQPYHEIYTR
8	WGICLKPEGCEDNWEK
9	MDAESGLWQSFSCQAQLPYVCR
10	LHNEDIK
11	EEVWIGLK
12	TPNCVSYLGELGQWK
13	VQSCEEK
14	LNDASSDK
15	MCPDEGWK
16	HGETCYK
17	FEQEYLNDLMK
18	YFWTGLR
19	DVDSCGEYNWATVGGR
20	MSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFPAASLSCYK
21	SPDLQGSWQWSDR
22	TPVSTIIMPNEFQQDYDIR
23	EFIYLRPFACDTK
24	LEWVCQIPK
25	TPDWYNPDR
26	ISEWPIDDHFTYSR

27	FPVTFGEECLYMSAK
28	TWLIDLKPTDCSTK
29	VQCSEQWIPFQNK
30	ELTYSNFHPLLVSGR
31	IPENFFEEESR
32	YHCALILNLQK
33	HFVSLCQK
34	YLNPLYK
35	TLTWHSK
36	EVKPVDSVK
37	HMATTQDEVHTK
38	SHLSIR
39	SHLSIRDEK
40	SLMWFDK
41	TPLSYTHWR
42	FLAGLSTDGFWDIQTFK
43	GQTSPGNCVLLDPK
44	DGAICYKPTK
45	SDQALHSFSEAK
46	HDHSATIVSIK
47	HDHSATIVSIKDEDENK
48	HDHSATIVSIKDEDENKFVSR
49	KVECEHGFR
50	VECEHGFR
51	VPLGPDYTAIAIVATLSILVLMGGLIWFLFQRHR
52	YAQGVNEDEIMLPFHD

1.1.8. Белковый индекс.

Белковый индекс представляет собой величину распространенности белка и относительного содержания пептида. Алгоритм учитывает число образцов, в которых наблюдали белок, и число наблюдаемых пептидов в сравнении с подающимися наблюдению пептидами из каждого образца. Затем получаемое значение располагали по рангам попарным сравнением соответствующих нормальных образцов против образцов злокачественной опухоли.

1.2. Результаты.

В этих экспериментах идентифицировали LY75, как дополнительно описано в настоящем описании. Полноразмерный LY75 детектировали в плазматической мембране образцов ткани рака мочевого пузыря, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, мелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, мелкоклеточного рака легких и лимфомы (NHL), острого моноцитарного лейкоза (AML) и клеток множественной миеломы (MM). В табл. 2 представлено распределение экспрессии LY75, измеряемое посредством белкового индекса. Экспрессия LY75 в этих тканях злокачественной опухоли указывает на то, что LY75 является ценной терапевтической и диагностической мишенью при этих злокачественных опухолях.

Таблица 2

Ткань	Злокачественная опухоль	Нормальная
Мочевой пузырь	+++	+
Молочная железа	+++	-
Прямая и толстая кишка	+++++	++
Желудок	+++	++
Пищевод	++++	-

Голова и шея	++	-
Почка	+	-
Немелкоклеточный рак легких	+++	-
Яичник	++++	-
Поджелудочная железа	+++	-
Кожа	++	-
Мелкоклеточный рак легких	+	-
AML	+	-
CLL	++	-
NHL	+++++	-
MM	+++	-

Белковый индекс LY75 (+++++=очень высокий; ++++=высокий; +++=средний; ++=низкий; +=очень низкий; -=не наблюдают).

Пример 2: иммуногистохимия с использованием антитела против LY75.

С использованием эталонного протокола проводили иммуногистохимию на опухолевых и нормальных тканях FFPE с использованием моноклонального антитела мыши против LY75 (Leica).

2.1. Вещества и способы.

2.1.1. Вещества.

Citroclear (HC5005) от TCS Biosciences, UK.

Спиртосодержащий реагент (R8382) от Sigma-Aldrich, UK.

Раствор для демаскировки, pH6 (S2369) от Dako, UK.

Блокирующий пероксидазу раствор REAL (S2023) от Dako, UK.

Разбавитель для антитела (S0809) от Dako, UK.

EnVision+ HRP-конъюгированный полимер, мышь (K4000) от Dako, UK.

Жидкий субстрат DAB+ (K3468) от Dako, UK.

Гематоксилин Майера (X0909) от Dako, UK.

Акватекс (1.08562.0050) от VWR, UK.

Тканевые срезы и микропанели являлись от US Biomax Inc., MD, USA.

2.1.2. Депарафинизация и регидратация.

Предметные стекла депарафинизировали в Citroclear (2×5 мин), затем подвергали регидратации посредством 100% спирта (2×5 мин), 50% спирта (1×5 мин) и водопроводной воды (1×5 мин).

2.1.3. Демаскировка антигена (термобарокамера).

Антиген LY75 демаскировали под давлением в течение 20 мин в 50 мл раствора для демаскировки в сосуде коплина. Затем предметные стекла оставляли остывать до комнатной температуры дополнительно в течение 20 мин. Ручкой, образующей гидрофобный барьер, рисовали круги вокруг каждого тканевого среза/ТМА, а затем предметные стекла дважды промывали в PBS, 3 мин каждое промывание.

2.1.4. Окрашивание ткани.

Активность эндогенной пероксидазы блокировали инкубацией тканей с блокирующим пероксидазу раствором в течение 10 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем предметные стекла промывали один раз в PBS и один раз в PBS-T (PBS, содержащий Tween-20, 0,125% об./об.), 3 мин каждое промывание. На каждые тканевой срез и/или микропанель наносили первичное антитело (разбавленное 1/160 в разбавителе для антитела) и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем предметные стекла промывали один раз в PBS и один раз в PBS-T, 3 мин каждое промывание. Затем на ткани наносили EnVision+ HRP-конъюгированный полимер и инкубировали предметные стекла в течение 30 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем предметные стекла промывали один раз PBS и один раз в PBS-T, 3 мин каждое промывание. Ткани инкубировали в жидком субстрате DAB+ при комнатной температуре в течение 10 мин в увлажнительной камере. Затем предметные стекла промывали один раз в PBS и один раз в PBS-T, контрастно окрашивали гематоксилином в течение 1 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере и снова промывали один раз в PBS и один раз в PBS-T, 3 мин каждое промывание. Затем на предметные стекла накладывали покровные стекла с использованием акватекса.

2.2. Результаты.

Иммуногистохимическим анализом выявляли специфическое окрашивание опухолевых клеток при раке поджелудочной железы, яичника, молочной железы, колоректальном раке, пищеводе, кожи, щитовидной железы и легкого (немелкоклеточного), а также при множественной миеломе и лимфомах Ходжкинского и неходжкинского типов. Подтипы лимфомы Ходжкина, которые окрашивали антителом против LY75, представляли собой: нодулярный склероз, с лимфоцитарным преобладанием, с лимфоцитар-

ным истощением, смешанно-клеточный и лимфому Ходжкина (без дополнительных уточнений). Подтипы неходжкинской лимфомы, которые окрашивали антителом против LY75, представляли собой: диффузную В-крупноклеточную лимфому, В-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), фолликулярную лимфому, лимфома мантийных клеток, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), Т-клеточную/обогащенную гистидином В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфоплазмоцитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому (без дополнительных уточнений), периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Таким образом, антитела, направленные на LY75, являются пригодными в качестве терапевтических средств и диагностических средств при этих злокачественных опухолях и других типах злокачественной опухоли, для которых показана экспрессия LY75.

Пример 3: специфичность моноклональных антител против LY75, определяемая анализом проточной цитометрии.

Специфичность моноклональных антител против LY75 тестировали анализом проточной цитометрии, проводимом на линиях клеток, экспрессирующих LY75.

Вещества и способы.

Антитела против LY75 инкубировали с экспрессирующими LY75 клетками. Клетки промывали в буфере FACS (DPBS, 2% FBS), центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл разбавленного первичного антитела против LY75 (также разбавленного в буфере FACS). Комплекс антитело-клетка инкубировали на льду в течение 60 мин, а затем дважды промывали буфером FACS, как описано выше. Осадок клетка-антитело ресуспендировали в 100 мкл разбавленного вторичного антитела (также разбавленного в буфере FACS) и инкубировали на льду в течение 60 мин. Осадок промывали как раньше и ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS. Образцы загружали в проточный цитометр BD FACScanto II и анализировали данные с использованием программного обеспечения BD FACSDiva.

Результаты.

Результаты анализа проточной цитометрии демонстрировали, что моноклональные антитела против LY75 эффективно связывались с LY75 человека клеточной поверхности. Специфичность связывания антител против LY75 с клетками, экспрессирующими LY75, представлена на фиг. 1. Результаты свидетельствуют о сильном связывании таких антител против LY75 с клетками, экспрессирующими LY75.

Пример 4: интернализация моноклонального антитела против LY75 клетками, экспрессирующими LY75.

Демонстрировали, что моноклональные антитела против LY75 интернализуются при связывании с клетками, экспрессирующими LY75. Антитела MabZAP связывали с первичными антителами. Затем комплекс MabZAP интернализировался клетками. Вхождение сапорина в клетки приводило к ингибированию синтеза белка и последующей гибели клеток.

Анализ MabZAP проводили так, как указано ниже. Каждые из клеток высевали в плотности 5×10^3 клеток на лунку. Моноклональные антитела против LY75 или изотипический контроль IgG человека серийно разводили, затем добавляли к клеткам. Затем добавляли MabZAP в концентрации 50 мкг/мл и оставляли планшеты инкубировать в течение 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток в планшетах детектировали набором CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7571) и считывали планшеты при 490 нМ Luminomitor (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA). Данные анализировали посредством Prism (Graphpad).

Гибель клеток являлась пропорциональной концентрации моноклональных антител против LY75.

Результаты демонстрируют, что антитела против LY75 эффективно интернализировались клетками Namalwa (фиг. 2a), RAJI (фиг. 2b), HCC1143 (протоковой карциномы молочной железы - ER-негативной, PR-негативной и Her2-негативной) (фиг. 2c), HCC1806 (акантолитической плоскоклеточной карциномы молочной железы - ER-негативной, PR-негативной и Her2-негативной) (фиг. 2d), MDA-MB-468 (фиг. 2e), SW780 (переходной карциномой мочевого пузыря) (фиг. 2f), Kato III (аденокарциномой желудка) (фиг. 2g), SCC-9 (карциномой языка) (фиг. 2h), AML-193 (фиг. 2i), THP-1 (фиг. 2j), RPMI 8226 (множественной миеломой) (фиг. 2k) и OE-19 (фиг. 2l) по сравнению с изотипическим контрольным антителом против IgG человека и являлось пропорциональным концентрации комплекса MabZAP.

Последовательности

SEQ ID No	Описание	Последовательность
1	Лимфоцитарный антиген 75 (LY75)	<p>MRTGWATPRRRPAGLLMLLFWFFDLAEPSSGRAANDPFTIVHGNTGKCIKPVYGVWIVAD DCDETEDKLWKVVSQHRFLHLSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLWWKCEH HSLYGAARYRLAKDGHGTAINASDWWKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNYSYGRP CEFPFLIDGTWHHDCILDEDHSGPWCAATLLNVEYDRKWGICLKPENGCEDNWEKNE QFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNQGADLLSINSAELTYLKEKEGIKFIWIGLNQ LYSARGWEVSDHKPLNFWDPDRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCAQPLP YVCRKPLNNTVELTDVWYSDTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCKAFS SDLISHSADVEVVVTKLHNEDIKEEVWIGLKNINIPTLQWSDGTEVTLTYWDENEPN VPYKTPNCVSYLGELGQWQVQSCEEKLYVCKRKGKELNDASSDKMCPPEGWK RHGETCYKIYEDEVFPGTNCNLTITSRFEQEYLNLMKKYDKSLRKYFWTGLRDVDS CGEYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLPASPGGCVAMSTGKSVGKWEVKDCRSFKAL SICKKMSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFPAASLSCYKVFHAERIVRKRNWEEAER FCQALGAHLSSFSHVDEIKEFLHFLTDQFSGQHWLWIGLNKRSPDLQGSWQWSDRT PVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPFACDTKLEWV CQIPKGRTPKTPDWYNPDRAGIHGPPILIEGSEYWFVADLHLNVEAVLYCASNHSFL ATITSFVGLKAIKNIANISGDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFGEELY MSAKTWLIDLKPTDCSTKLPFICEKYNVSSLEKYPDSAAKVQCSEQWIPFQNKCF KIKPVSLTFSQASDTCCHSYGGTLPVLSQIEQDFITSLPDMEATLWGLRWTFAYEKIN KWTDNRELTYSNFHPLLVSGRLRIPENFFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCS ERHFVSLCQKYSEVSRQTLQNASETVKYLNLYKIIPKTLTWHSAKRECKLNSMQLV SITDPYQQAFLSVQALLHNSSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWAKTNGQLED CVVLDTDGFWKTVDNDNQPGAICYSGNETEKEVKPVDSVKCPSVLTNPWIPFQ CCYNFIITKNRHMAATTQDEVHTKQKLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFNMASW VMLGITYRNKSLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDFGWDIQTFKVIEA VYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTLTPQFMPYEDGIYSVIQKVTWYALNMCSQSQGG HLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLWVGLSSHGSESSFEWSDGSTFDYIPWKGGT SPGNCVLLDPKGTWKHEKCNVKGDAICYKPTKSKKLSRLTYSRCPAAKENGSRWI QYKGHCYKSDQALHSFSEAKKLCCKHDHSATIVSIKDEDEDENKFVSRMLRENNTIMR WLGLSQHSVDQSWSLDGEVTFVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVECEHG FGRVVCKVPLGPDYTAIAIIVATLSILVLMGGLIWFQFQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNE DEIMLPSFHD</p>
2	Лимфоцитарный антиген 75 (NM_002349)	<p>aggccgcgctcagcaggcggcgaggccgctgcccaggaccggccggaaggcttgcgaccagctcagg atgaggacagcctggcgagccctcgcgcccggcgccctcatgctctctggtcttctgagctcggagcc ctctggccgcgagcctaatgaccctcaccatgctcctatggaatacgggcaagtgcatcaagccagtgatgctgg atagtagcagacgactgtagaactgaggacaagttatggaagtgggtgccagcatcgctcttcattgcatcc caaaagtgcctggcctgattaccaaatcgtaaatgagctgagaatgtcagctgtagctcagtgccatgctggtg gaaatgtagcaccactctctgtagcggagctgcccgtaccggctgctcgaaggatggacatggcagcaatctc aaatgcatctgtagtctggaagaaggagctcagaggaagccttctgaccagcctatcatgagatctataccaga gatggaaactcttagggagacctgtgaattccattcttaattgatggacctggatcatgattgattctgtagaagatc atagtgggccatgggtgcccaccctaaatgaatgaccgaaagtgggcctcgtctaaagcctgaaaacgggt gtgaagataatgggaaagaacgagcagttggaagtgctaccaatgaatactcagacggctcttctggaagaag ctatgittcatgtagaatcaaggagctgattactgagcatcaacagtgctgctgaattaactcctaaagaaaaga aggcattgctaagattttcggattggttaaatcagctatactctgtagaggctgggaatggtcagaccacaaccatta aaccttctcaactgggatccagacggcccagtgacactataggtgctccagctgtagaagaatgtagctgagct ggctgtagcagagcttctgtagcctcaactgcccctatgctcaggaaccataataataacagtggaatgaacag atgctggacatactcagatacccgtgtagcaggctggctgccaataatggatttctgtagtctggtgaaatgaaagt aatctcgggataaaggcactgcaaatgcaaacctcagtagtgacctaatcagcattctctagcagatggggat gtggtgtcacaatacctaataatgagatatacaagaagaagtgtagtaggccttaagaacataaacataccaactt attcagtggtcagatgtagtacttaacatattggatgagaatgagcaaatgttccatacaataagacgcc aacgtgttctacttaggagctaggtcagtggaagtccaatcatgtgaggagaaactaaatgatgtagcaagag aaagggagaaaaactgaatgacgcaagctctgataagatgtctccagatgaggctgggaagacatggagaa acctgtacaagattatgaggatgagctcctttggaacaactgcaatcagctactcagatgagattgagcagaat</p>

		acclaaatgatttgataaaaagatgataaatcttaagaaaatactctggactggcctgagagatgtagattctgtgg agagtataactgggcaactgttggggaagaaggcggcgtlaaactttccaactggaattttctgagccagctccccc ggcggctgctgctatgctactggaagctgttggaaagtgagggtgaaagactgcagaagctcagaagctcacaac aattgcaagaaaatgagtgaccctggcctgaaagaacatcccctaagcctgatgaccctgctctgaaggctgg cagagttccccgaagcttctgtataaagatttaccatgcagaagaattgaaagaaagaggaactgggaaagact gaacgattctgccaagccctggagcacacccctctagctcagccatggtgagaaataaaggaaattctcaacttttaac ggaccagttcagtgccagcattggctgtgattggttgaataaaaggagccagattacaagatcctggcaatgga gtgatgacacagctgctactatcatgcaaaatgagttcagcaggattatgacatcagagactgtgctgtgcaag gtattcataggccatggcgaagagctggcattctatgatgatagagaattattttgaggccctttgctgtgatacaaa actgaaatgggtgtgccaattccaaaaggcgtactcacaacaccagactgtacaatccagaccgctgtggaatt catggaccctcaactataatgaaaggaagtaattggttctgtgactcaccataactgaagaagccgctcgttac tggccagcaatcacagcttctgcaactataacatcttttgggactaaaagccatcaaaaacaaaatagcaaatat ctgggtgatggacagaagtggtgataaagaattagcaggtggcaatagatgatcttaccatactcagatccatggc accgcttctgtgacattggaggaatgctgtacatgctgccaagactggctatcagctaggtaacccaacaga ctgtaglaccagttgccctcatctgtgaaaaataatgttctgtagagaataacagcccagattcgcagctaaagt gcaattctgagcaatgattctttcagaataagttttctaaagatcaaacccgtctctcaactttctcaagcaagc gatacctgtcactcctatgtggcaccctctcagttgagccagattgaaacaagactttatacactcctgtccgata tggagctactttatgattggttgcgctggactgctatgaaaagataaacaatggacagataacagagactgagc tacagtaacttccacatttattggttggaggctgagaataaccagaaaatttttgaggaagactcgtccacactg tgcctaataactcaacctcaaaaatcaccgttactgggacgtggaattttacatcctcagtgaaagccactgtgctc ctgtcagaataattcagaagttaaaagcagacagactgcaagaatgctcagaactgaaagtataataatctgta caaaaataaccagaactcagctggcagactgtaaaagggagtgctgaaaagtaacatcagctgggtgagcctc acggaccctaccagcaggcattcctcagtgagcagcctcctcacaactcctctatggactggactcctcagtaag atgatgaactcaactttggtgctagatgggaaacgtctcattttagctgctgggctgaaactaatgggcaactcgaaga ctgtgtgattagacactgatgattctggaacacagttgattgcaatgacaatcaaccaggtgctatttctactattac gaaatgagactgaaaaagaggtcaaacagttgacaggttaaatgctcctctgttcaactcctgttcaactcctggatcact tcagaactgtgctcaatttataatacaagaataggcatalggcaacaacacaggaatgagttcactcaaatgct agaaactgaactcaaaaatcactatctgagttctgagatgaaaagagaataactgttctgagcaactcctgctc caattataggctcattgggtcattgtagaataactatagaataagctctctatggttgaataagcccactgtcatal cacactggagagcaggaagaccataaaaaatgagaagtttttggctggttaagtactgacgctctgggatatt caaacctttaaagttatgaaagcagttattttaccagcacagcattctgtgtaaaatgaaatgttgcctgctcaaa gaagaatataatactacactccacagttatgccaatgaaatgatttaccagtttcaaaaaaggtaacatggt atgaagcattaaacatgttctcaaatggaggtcactggcaagcgttcaacaaaaatggcagctctctggaag atattgtaaacgctgatggatttccactatgggtggcctcaagctcatgatgaaagtgaactcaagtttgaatgctgatg gtagtaacttgaactatccatgaaagccaacatctcctggaaatgttctctggatcacaaggaactgga acatgaaaaatgcaactctgtaaggatggtctattgtataaacctcaaaaactaaaagctgctccgctcactatc atcaagatgcccagcagcaaaagagaatgggctcaggtggatccagtaacagggctcactgttaacagctgatcagca attgcacagttttcagagcccaaaaatgtgtcaaaaactgatcactctgcaactatcgttcaaaaagatgaaatg gagaataaatttgagcagactgatgggaaaaataacattaccatgagagttggcctggattatcacaactctg tgaccagctctggatgggtgagtgatcagaagtgacattgtcaaatgggaaaaataaaglaagagttggttggaa gatgtagcatgtgatgctcaatgaaactggaaaaaagttgaatggaacatggttggaaagatgtctgcaaaagt gcctctggccctgattacacagcaatagctatcatgtgccaactaagatctatgctctcctgagcagctgattggt cctctcaaaaggaccggttccactggcgggttctcactagctogatagcacaaggagtgaaatgaaatgagattatg cttctcttccatgactaaattctcaaaaatgttcaatttgcactaatgtttagagaatattgactcaaaaatgcccag gtcagatttactctgctcaaaagtagaactctaaactctttcagttgttagatcttaggcctgctggtatccacagta tccctgtaaatgccaattaccctaaataatagaatgggggactccaaagctggaactgaagcacaattgttgt acagtaattgttaattgtcatttctctgtatgaatgtgtaactagatgataatttataagaatttcaaaaaact cttagaaaatataaagcatalactaggtgacatgctcacttttaattttaaagagcactccggccaaatgcaaaatg actcaaaagtaaaatgaaactgaactctacagcattgttcaaaatagctatttagcactgggaaaaataacaa taagacatgcttaactttatattttttgagactgactctctctgtgcccagctggagtaacaatggcgtgatcctggc cactgcaaatcctccgctccaggtcaagcattctcctcagcctcctgagtagctgggattacagggcaactgcca cctgcccggctaaatttttagtagagatgggtttaccatggtggcagcctgctctgcaactcgtgaccgag tgatcctccgctcctcccaaggtcgggattacagcagcagccagcctgctgctcacttttatatag caaaaatgattcctctggcaagatgttctatatttcaaaagttattcaccattatgtaaatgaaagatgttttctgt tataattgtataaaaactgactttaaagattagtgcttaacatttccaagtggtggaacatttatttagattgaggt acctftagcagtgcttgcatttctgatgattacatgactgttctttgtaagagaatcaactaggtatgaaactgata atttacaattatgctcactacatgactgcaacttttgactaagaattgtttacttttcaacatggttaaacagagaag gtccatgaaaggaagtgtatgactgcaattgtaaaaatgagactttttaggaaactcaaacctgtgatgactaaca aaatgtaaaatgagtgatgaaagaaactgtttgtggtatcacttaagtttgacacactagattatgactgata gcatcactggaaaaggtgaaaatgttattcggcatttaacttacttattttgtataaaatccatgatttatta catttagatttactactatgataaagttgtaaaatcttaagacagttttatagctcactaggtgctgacttattga attgttagactagttctctgctgtatgtaaatgtttagctactaagacttccccaagaactaagccactgatg gaaaagcacagctgtataatggtgactgataataaagttgttttacttttaagtaaaagtaaaaaa
3	Пептид 1 LY75	AANDPFTIVHGNTGK
4	Пептид 2 LY75	CLGLDITK
5	Пептид 3 LY75	CEHNSLYGAAR
6	Пептид 4 LY75	KGGSEESLCDQPYHEIYTR
7	Пептид 5 LY75	GGSEESLCDQPYHEIYTR
8	Пептид 6 LY75	WGICLKPENGCEDNWEK
9	Пептид 7 LY75	MDAESGLWQSFSCFAQLPYVCR
10	Пептид 8 LY75	LHNEDIK
11	Пептид 9 LY75	EEVWIGLK

12	Пептид 10 LY75	TPNCVSYLGELGQWK
13	Пептид 11 LY75	VQSCEEK
14	Пептид 12 LY75	LNDASSDK
15	Пептид 13 LY75	MCPPDEGWK
16	Пептид 14 LY75	HGETCYK
17	Пептид 15 LY75	FEQEYLNLMK
18	Пептид 16 LY75	YFWTGLR
19	Пептид 17 LY75	DVDSCGEYNWATVGGR
20	Пептид 18 LY75	MSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFASLSCYK
21	Пептид 19 LY75	SPDLQGSWQWSDR
22	Пептид 20 LY75	TPVSTIIMPNEFQQDYDIR
23	Пептид 21 LY75	EFYLRPFACDTK
24	Пептид 22 LY75	LEWVCQIPK
25	Пептид 23 LY75	TPDWYNPDR
26	Пептид 24 LY75	ISEWPIDDHFTYSR
27	Пептид 25 LY75	FPVTFGEECLYMSAK
28	Пептид 26 LY75	TWLIDLGKPTDCSTK
29	Пептид 27 LY75	VQCSEWIPFQNK
30	Пептид 28 LY75	ELTYSNFHPLLVSGR
31	Пептид 29 LY75	IPENFFEEESR
32	Пептид 30 LY75	YHCALILNLQK
33	Пептид 31 LY75	HFVSLCQK
34	Пептид 32 LY75	YLNPLYK
35	Пептид 33 LY75	TLTWHS AK
36	Пептид 34 LY75	EVKPVDSVK
37	Пептид 35 LY75	HMATTQDEVHTK
38	Пептид 36 LY75	SHILSIR
39	Пептид 37 LY75	SHILSIRDEK
40	Пептид 38 LY75	SLMWFDK
41	Пептид 39 LY75	TPLSYTHWR
42	Пептид 40 LY75	FLAGLSTDGFWDIQTFK
43	Пептид 41 LY75	GQTSPGNCVLLDPK
44	Пептид 42 LY75	DGAICYKPTK
45	Пептид 43 LY75	SDQALHSFSEAK
46	Пептид 44 LY75	HDHSATIVSIK
47	Пептид 45 LY75	HDHSATIVSIKDEDENK
48	Пептид 46 LY75	HDHSATIVSIKDEDENKFVSR
49	Пептид 47 LY75	KVECEHGFR
50	Пептид 48 LY75	VECEHGFR
51	Пептид 49 LY75	VPLGPDYTAIAIIVATLSILVLMGGLIWFQRRH
52	Пептид 50 LY75	YAQGVNEDEIMLPFHD
53	Внеклеточный домен LY75	SGRAANDPPTIVHGNTGKCIKPVYGVWVADDCDEDEDKLVKVVVSQHRFLHLSQKCLGLD ITKSVNELRMFSCDSSAMLWVKCEHSLYGAARYRLALKDGHGTAISNASDVWKKGGSEE SLCDQPHYEIYTRDGNYSYGRPECFPLIDGTWHHDICLDEHDSGPWCATTLNYYEDRWKVG ICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNGGADLLSINSAELTYLK EKEGIAKIFWIGLNQLYSARGWEWSDHKPLNFLNWDPRPSAPTIGSSCARMDAESGLW QSFSCAEALPYVCRKPLNNTVELTDVWYSDTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHA KCKAFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEEVWVIGLKNINIPTLQWSDGTVEVTLTYW DENEPNVYPYKTPNCVSYLGELGQWVQSCCEELKYVCKRKGKELNDASSDKMCPPEDEGW KRHGETCYKIYEDEVVPGTNCNLTITSRFEQEYLNLMKKYDKSLRKYFVWTGLRDVDSGG EYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLPASPGGCVAMSTGKSVGKWEVKDCRSFKALSICKKMS GPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFASLSCYKVFHAERIVRKRNNWEEAERFCQALGAHLSS FSHVDEIKELHFLTDQFSGQHWLWIGLNKRSPLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDY DIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPFACDTKLEWVVCQIPKGRTPKTPDWYNPD RAGIHGPPILIEGSEYWFVADLHLNYYEAVLYCASNHSFLATITSVFGLKAIKNIANIS GDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFGEECLYMSAKTVDLIDLGKPTDCSTKLP FICEKYNVSSLEKYSPPSAKVQCSEWIPFQNKCFKIKPVSLTFSQASDTCVSYGGTL PSVLSQIEQDFITSLPDMEATLWIGLRWTAYEKINKWTDNRELTYSNFHPLLVSGRRLR PENFFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCSERHFVSLCQKYSEVKSRLQNASSET VKYLNLYKIIPKTLTWHS AKRECLKSNMQLVITDPYQQAFLSVQALLHNSLSLWGLFS QDDELNFGWSDGKRLHFSRWAETNGQLEDVLDTDGFWKTVDNNDNQPAGIACYSSNET EKEVKPVDSVKCPSVLPNTWIPFQNCYFNITKRNHMAATTQDEVHTKCKQLNPKSHIL SIRDEKENNFVLEQLLYFNMASWVMLGITYRNKSLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEK FLAGLSTDGFWDIQTFKVIEEAVYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTLPQFMPYEDGIYS VIQKVTWYEAALNMQSGGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLWVGLSSHDGSESSFE WSDGSTFDYIPWKGQTSFGNVCVLLDPKGTWKHEKCNVSKDGAICYKPTKSLRDLTYSS
		RCPAAKENGRWIKYKGYKSDQALHSFSEAKKLSKHDHSATIVSIKDEDENKFVSR MRENNITMRVWGLSLSQHSVDQSWSWLDGSEVTFVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKK VECEHGFRVCKVPLGPD

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей LY75, выбранной из группы, состоящей из лимфомы, миеломы, лейкоза, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака головы и шеи и рака кожи, который включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества моноклонального антитела, которое связывается с LY75, где указанное моноклональное антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом.

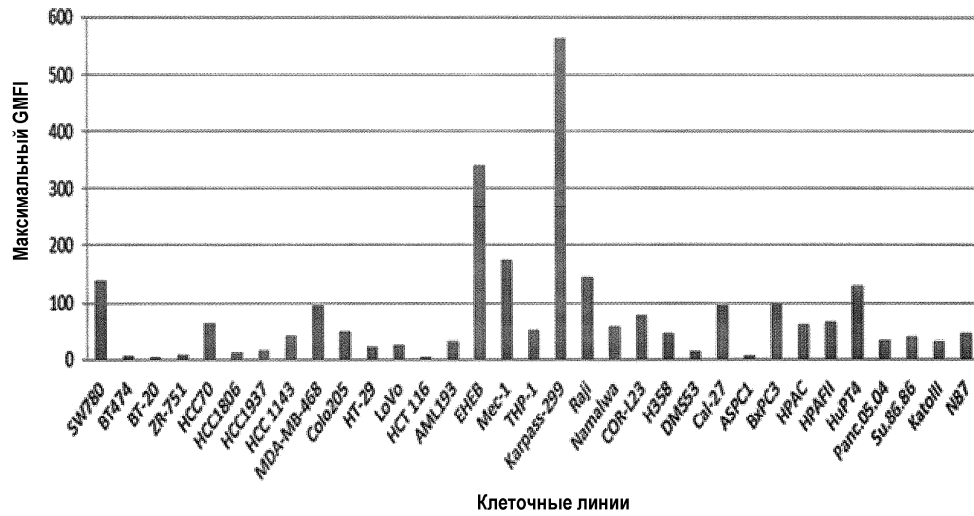
2. Способ по п.1, где лимфома выбрана из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, диф-

фузной В-крупноклеточной лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы мантийных клеток, лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), Т-клеточной/обогащенной гистицином В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, лимфоплазмочитарной лимфомы, мелкоклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, Т-клеточной лимфомы, периферической Т-клеточной лимфомы, анапластической крупноклеточной лимфомы и ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы.

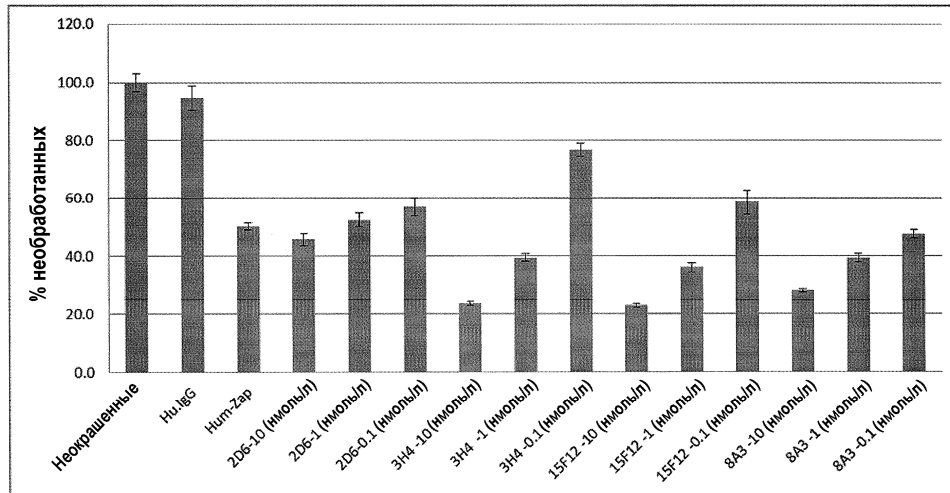
3. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому или трижды негативный рак молочной железы.

4. Способ по любому из пп.1-3, где моноклональное антитело представляет собой химерное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, дефукозилированное антитело или их антигенсвязывающую часть.

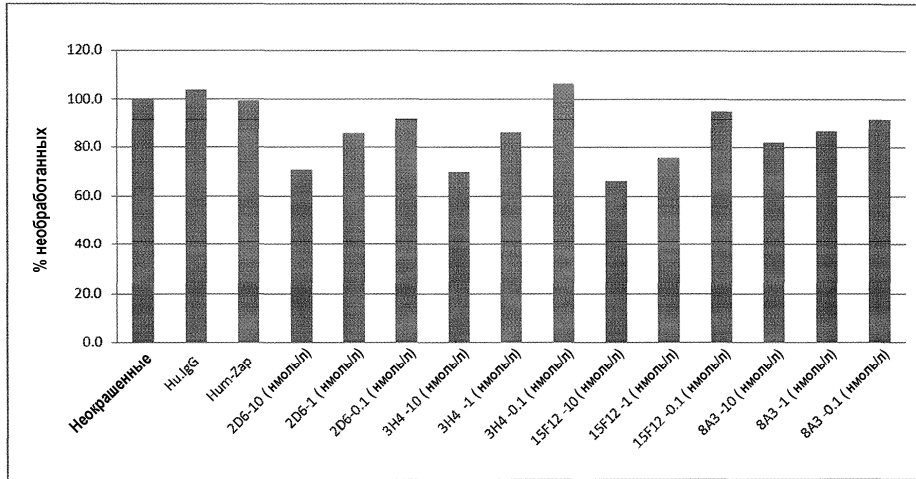
5. Способ по п.1, где цитотоксический агент представляет собой майтансин.



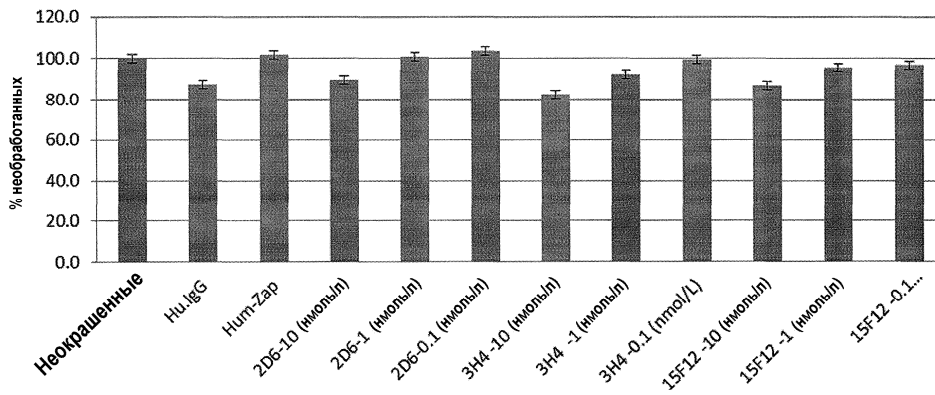
Фиг. 1



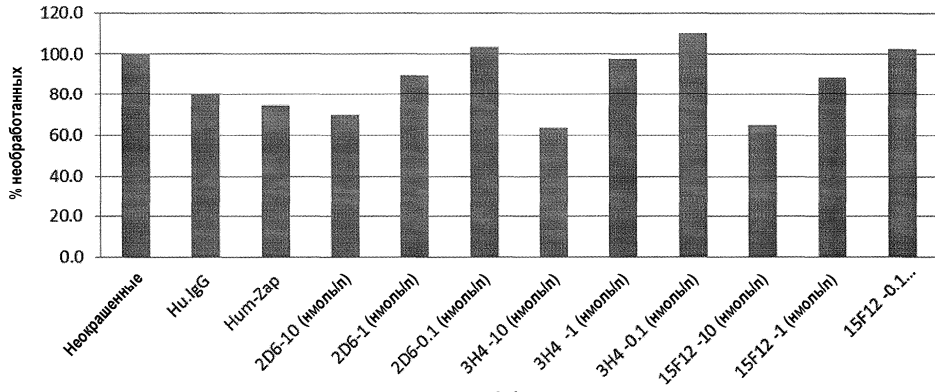
Фиг. 2а



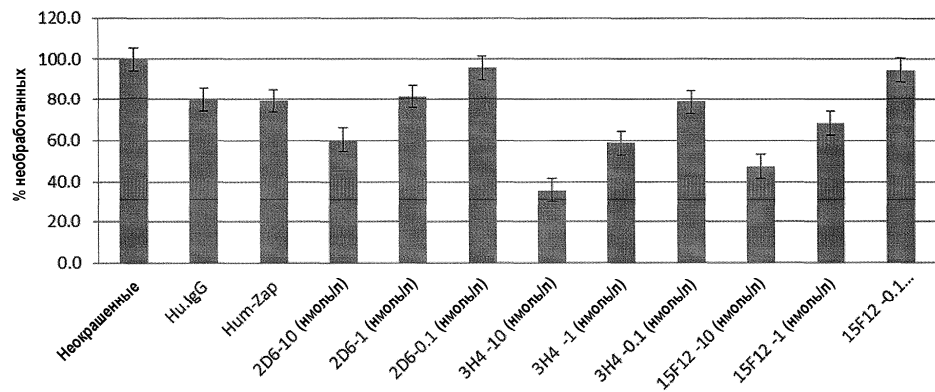
Фиг. 2b



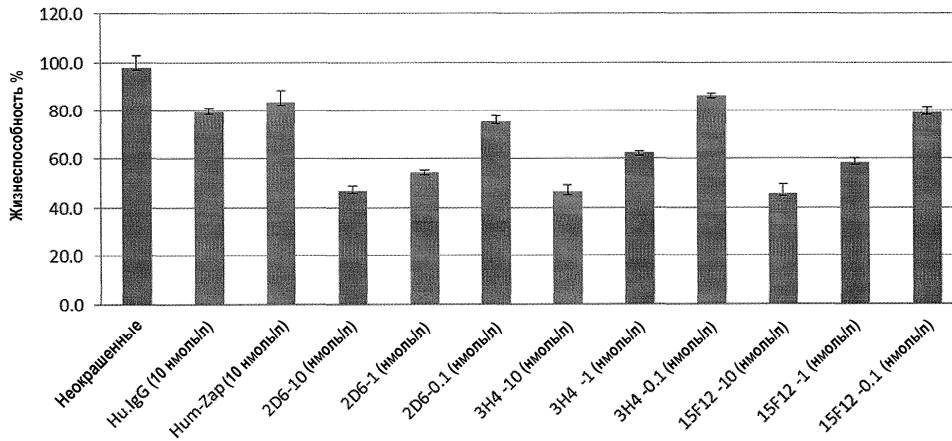
Фиг. 2c



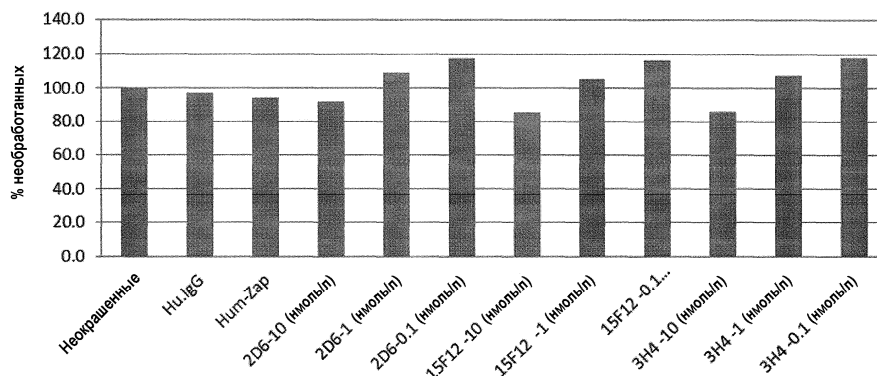
Фиг. 2d



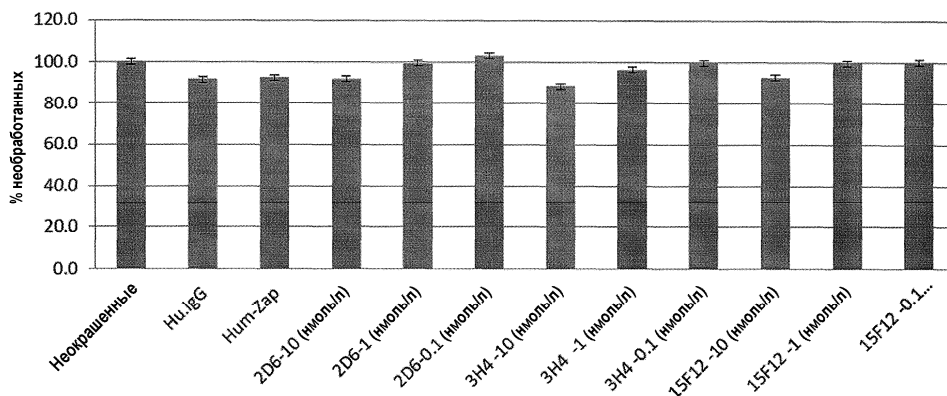
Фиг. 2e



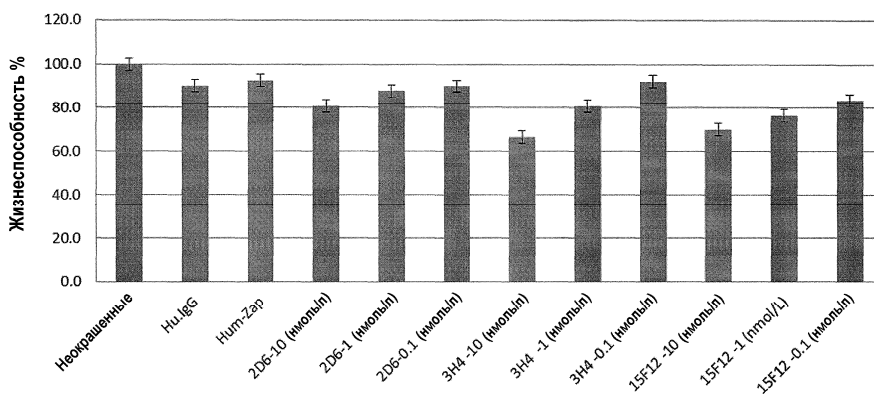
Фиг. 2f



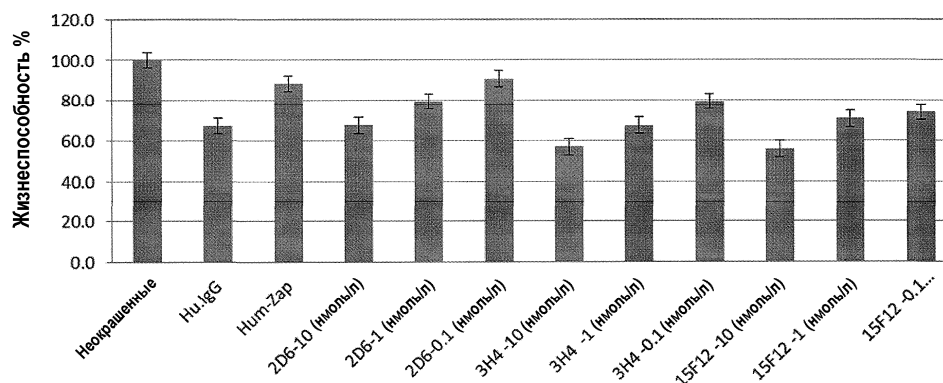
Фиг. 2g



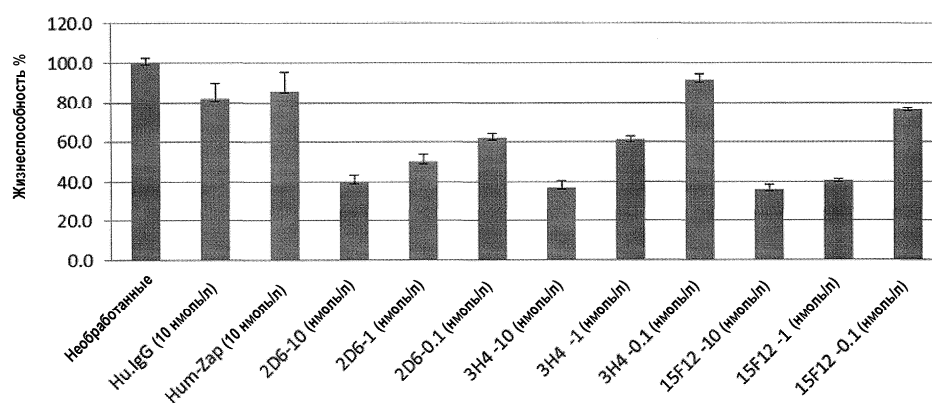
Фиг. 2h



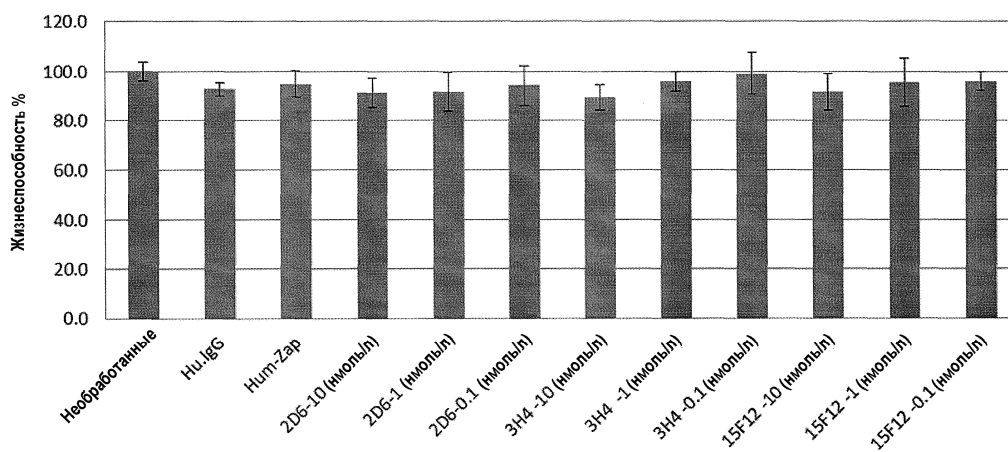
Фиг. 2i



Фиг. 2j



Фиг. 2к



Фиг. 2л

