

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034033**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.20**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201590187**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.07.03**

---

**(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

---

**(31)** 61/669,967; 61/702,916

**(56)** US-A1-20110293620  
US-A1-20100003254  
US-A1-20060167230  
WO-A1-2009073163

**(32)** 2012.07.10; 2012.09.19

**(33)** US

**(43)** 2015.06.30

**(86)** PCT/US2013/049368

**(87)** WO 2014/011489 2014.01.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Моллдрем Джеффри, Сергеева Анна  
(US)**

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

---

**(57)** Изобретение относится к гуманизированному антителу, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2. Также изобретение включает нуклеиновые кислоты, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариабельную область легкой или тяжелой цепи, вектор экспрессии и клетку-хозяина, экспрессирующую указанное антитело. Способ получения гуманизированного антитела, включающий культивирование указанной клетки-хозяина также предоставляется настоящим изобретением. В дополнение, изобретение относится к способу лечения индивида с опухолью молочной железы или острым миелобластным лейкозом, включающему введение указанному индивиду антитела.

---

**B1**

**034033**

**034033**

**B1**

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной заявки США с серийным № 61/669967, поданной 10 июля 2012 г., и 61/702916, поданной 19 сентября 2012 г., полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

### **Предпосылки изобретения**

Изобретение было осуществлено при поддержке Правительства грантом номер P50 CA100632, присужденным Национальным институтом рака/Национальным институтом здоровья. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

#### **1. Область техники изобретения.**

Настоящее изобретение в целом относится к области злокачественных опухолей и иммунотерапии. В частности, изобретение касается иммунодиагностических и иммунотерапевтических антител для лечения и профилактики злокачественных опухолей и аутоиммунного заболевания.

#### **2. Описание предпосылок изобретения.**

Иммунную систему долгое время непосредственно связывают с регулированием рака; при этом свидетельство о конкретных и эффективных иммунных реакциях при злокачественных опухолях у человека недостаточно. При хроническом миелогенном лейкозе (СМЛ) ни аллогенная трансплантация костного мозга (ВМТ), ни терапия интерфероном- $\alpha 2b$  (IFN- $\alpha 2b$ ) не приводили к полной ремиссии, но механизм контроля заболевания неизвестен и может включать иммунные противолейкозные ответы.

На основании данных уровня техники считается, что лимфоциты играют важную роль в опосредовании противолейкозного эффекта. Исследования показали, что инфузии аллогенных донорских лимфоцитов (DLI) были использованы для лечения рецидива миелобластного лейкоза после аллогенной ВМТ (Giralt and Kolb, 1996; Kolb and Holler, 1997; Kolb et al., 1995; Kolb et al., 1996; Antin, 1993). Трансфузия лимфоцитов от исходного донора костного мозга (ВМ) индуцирует как гематологические, так и цитогенетические ответы приблизительно у 70-80% пациентов с хроническим миелоцитарным лейкозом (СМЛ) при хронической форме (СР) (Kolb et al., 1996, Kolb and Holler, 1997). Ремиссии после DLI при АМЛ (острый миелобластный лейкоз), как правило, не так длительны, как ремиссии, полученные при хронической форме СМЛ, что может отражать быструю кинетику опухолевого роста, опережающую кинетику развития иммунного ответа. Кроме того, большинство пациентов с миелоидными формами лейкоза умирают от болезни, если не проходят лечение аллогенной трансплантацией костного мозга, при котором связанный с ним эффект "трансплантат против лейкоза" (GVL) излечивает пациентов. Однако реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD) и связанная с трансплантатом токсичность ограничивает такое лечение. Считается, что GVL может быть отделен от GVHD и нацеливание иммунного ответа на лейкоз-связанные антигены позволит передавать пациентам GVL без GVHD.

Таким образом, если определить больше антигенов (т.е. антигены лейкоза или антигены других видов злокачественных опухолей) и если получить большее количество наиболее эффективных антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), то это позволило бы разработать лейкоз-специфичную терапию, терапию, специфичную для рака молочной железы и др., используя антигены в качестве мишеней для вакцин или для генерирования специфических Т-клеток для использования в адоптивной иммунотерапии.

PR1, HLAА2.1-рестриктированный нонамер, полученный из протеиназы 3 (P3) и эластазы, был идентифицирован как лейкоз-ассоциированный антиген (Molldrem et al., 2000; Molldrem et al., 1996; Molldrem et al., 1997; Molldrem et al., 1999; Molldrem et al., 2003, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Вывод о том, что PR1 представляет собой лейкоз-связанный антиген, был независимо подтвержден Burchert et al. (2002) и Scheibenbogen et al. (2002). CTL, специфичных для PR1, убивают клетки АМЛ, СМЛ и МДС, но не нормальные клетки костного мозга. В настоящей фазе I/II исследования вакцины пептид PR1 вводили пациентам с АМЛ, СМЛ и МДС, и PR1-специфичный CTL-иммунитет был вызван у 47% пациентов и клинические ответы наблюдались у 26%. Таким образом, этот антиген представляет интерес как база для дальнейшего исследования противораковых иммунных ответов, а также для разработки новых терапевтических средств.

### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2, которое содержит варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и варибельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19 или 20. Кроме того, изобретение относится к варианту указанного антитела, которое содержит тяжелую цепь, содержащую варибельную область, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и константную область тяжелой цепи, которая представляет собой константную область тяжелой цепи гамма-1 человека, и легкую цепь, содержащую варибельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и константную область легкой цепи, которая представляет собой константную область легкой цепи каппа человека. Другой вариант антитела содержит тяжелую цепь, содержащую варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и константную область тяжелой цепи, которая представляет собой константную область тяжелой цепи гамма-1 человека, и легкую цепь, содержащую варибельную область легкой цепи,

состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и константную область легкой цепи, которая представляет собой константную область легкой цепи каппа человека. В еще одном варианте осуществления заявленного антитела константная область тяжелой цепи гамма-1 человека представляет собой константную область в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, и константная область легкой цепи каппа человека представляет собой константную область в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42.

Также изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, которая кодирует переменную область легкой цепи указанного выше антитела и его вариантов. Также описана нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, которая кодирует переменную область тяжелой цепи указанного антитела.

Кроме того, изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему описанные выше варианты нуклеиновой кислоты.

Изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи описанного выше антитела, и нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область легкой цепи указанного антитела.

Изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь описанного выше антитела, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь описанного выше антитела.

Также в настоящем документе описаны способ получения гуманизированного антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8 в условиях, поддерживающих экспрессию гуманизированного антитела, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2; и способ получения гуманизированного антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.9 в условиях, поддерживающих экспрессию гуманизированного антитела, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2.

Изобретение включает гуманизированные антитела, полученные описанными выше способами.

В изобретении также раскрыто применение указанного антитела для лечения злокачественного новообразования, причем указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы и острый миелобластный лейкоз. В одном из вариантов осуществления указанное злокачественное новообразование является рецидивирующим или метастатическим.

В изобретении приведено применение описанного выше антитела для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, причем указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы и острый миелобластный лейкоз. В одном из вариантов осуществления указанное злокачественное новообразование является рецидивирующим или метастатическим.

В настоящем документе описан способ лечения индивида, страдающего злокачественным новообразованием, включающий введение указанному индивиду вышеописанного антитела, причем указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы или острый миелобластный лейкоз (AML). В одном из вариантов осуществления указанное злокачественное новообразование является рецидивирующим или метастатическим.

Другие объекты и признаки настоящего изобретения станут очевидны из следующего подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, при указании предпочтительных вариантов осуществления изобретения, приведены в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации без отступления от сущности и объема изобретения станут очевидными для специалиста в данной области из этого подробного описания.

#### **Краткое описание чертежей**

Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять при обращении к одному или нескольким из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

Фиг. 1. Специфичность 8F4 к PR1/HLA-A2.

ELISA с рекомбинантным пептидом/мономерами HLA-A2, нагруженными PR1 или аналогами PR1 с модифицированными отдельными аминокислотами. Для определения положений аминокислот в PR1-последовательности, которые необходимы для оптимального 8F4-связывания, мономеры HLA-A2 нагружали пептидами, содержащими замены аланина в PR1 (ALA1-ALA9), покрывающим лунки планшета для микротитрования в возрастающих концентрациях. Лунки затем инкубировали с 8F4 в фиксированной концентрации или контрольным антителом bb7.2 (HLA-A\*0201 аллель-специфическое мышинное моноклональное антитело IgG2a). Связывание определяли способом ELISA с использованием конъюгированных с пероксидазой козьих антимышиных антител. 8F4 связывалось с HLA-A2, нагруженным PR1 и большинством PR1 аналогов, значительно меньше связывалось с аналогом ALA1 (замена аланина на валин в положении 1 пептида) и не связывалось с контрольным пептидом pp65/HLA-A2. Контрольное антитело bb7.2 связывалось одинаково хорошо с PR1-и pp65-нагруженным HLA-A2.

Фиг. 2. Аффинность моноклонального антитела 8F4 к PR1/HLA-A2.

Измерение аффинности связывания пептид/HLA-A2 с антителами 8F4 и bb7.2 проводили с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore 3000. Тестируемые антитела захватывались покрытыми анти-мышинными антителами поверхностями. Аналит, пептид/HLA-A2, разбавляли до 100 нМ и тестировали в двух повторностях на связывание с покрытыми антителами поверхностями. Анализ проводили при 25°C с использованием PBS с 0,005% Tween-20, 0,1 мг/мл BSA, pH 7,4 в качестве рабочего буфера. Для получения аффинности связывания экспериментальные данные были согласованы с кинетической моделью первого порядка (показано линиями на фигурах) и впоследствии определяли  $K_D$  для 8F4 и bb7.2.

Фиг. 3. Специфичность 8F4 к HLA-A2+ AML.

Многopараметрическая проточная цитометрия лейкемии и нормальных PBMC с 8F4 и антителами клеточной поверхности. PBMC из AML-пациентов и здоровых доноров стробировали на живых клетках с помощью aqua и затем окрашивали 8F4 (конъюгированным с ALEXA Fluor 647), bb7.2 (конъюгированным с FITC) и антителами поверхностного фенотипа для CD13 и CD33 и анализировали способом проточной цитометрии. Использовали следующую стратегию стробирования: во-первых, aqua-живые клетки анализировали на экспрессию CD13 и CD33 и двойные позитивные клетки анализировали на экспрессию PR1/HLA-A2 (8F4) и общую HLA-A2-экспрессию (bb7.2). Отрицательный квадрант стробирования был установлен с помощью HLA-A2-негативных AML контрольных клеток.

Фиг. 4А, В. Антитело 8F4 индуцирует комплементзависимую цитотоксичность (CDC) AML.

Клетки-мишени промывали и ресуспендировали в 10-RPMI/HEPES до концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл. 20 мкл антител и 100 мкл клеток смешивали и подогревали до 37°C в 96-луночных планшетах, затем 20 мкл охлажденного во льду стандартного кроличьего комплемента (Cedarlane, Онтарио, Канада) добавляли и инкубировали при 37°C в течение 90 мин. Цитотоксичность определяли с помощью Cyto-Tox Glo Cytotoxicity Assay (Promega). Антитело-специфическую CDC (AB-CDC) рассчитывали как  $AB-CDC = ((L_{C+AB} - L_{C-AB}) / (L_{max} - L_s)) \times 100\%$ , где  $L_{C+AB}$  представляет собой лизис клетки-мишени в присутствии комплемента плюс антитело;  $L_{T+C}$  представляет собой лизис в присутствии комплемента только;  $L_{spont}$  и  $L_{max}$  измеряли до и после добавления цитотоксического средства дигитонина к клеткам в соответствии с инструкциями производителя.

Фиг. 4А. Инкубация с 20 мкг 8F4 индуцировала комплементзависимую цитотоксичность PBMC и лейкоферезных (LP) клеток, взятых от HLA-A2+ AML пациентов, но не лизировала контрольные образцы PBMC от HLA-A2-отрицательных AML или PBMC от HLA-A2+ нормального донора.

Фиг. 4В. 8F4-опосредованный лизис HLA-A2+ AML был зависимым от дозы антитела, в то время как изотипическое контрольное антитело (IgG2a мыши против KLH) и внутривенный иммуноглобулин человека (коммерческих IVIG) показали отсутствие лизиса AML.

Фиг. 5. Специфичность 8F4 к AML, но не к нормальным PBMC.

Поверхностное окрашивание AML, PBMC, и T2-клеток на PR1 и HLA-A2. Клетки окрашивали антителом анти-PR1/HLA-A2 (8F4)-alexa-647 (красный) и анти-HLA-A2-FITC конъюгированным (зеленый), фиксировали 1% параформальдегидом, а затем изучали с помощью конфокальной микроскопии. T2-клетки подвергали импульсу PR1-пептидом (20 мкг/мл) в качестве положительного контроля и CMV пептидом pp65 (20 мкг/мл) в качестве отрицательного контрольного пептида. Экспрессия PR1/HLA-A2 видна на поверхности клеток AML и подвергнутых PR1-импульсу T2-клеток, но не на поверхности HLA-A2+ PBMC или подвергнутых pp65-импульсу T2-клеток. ДАПИ синий был использован для ядерного окрашивания.

Фиг. 6. Антител 8F4 предотвращает приживание AML в in vivo модели.

Первичные HLA-A2+ лейкозные клетки ( $10^6$ ) отмывали, ресуспендировали в PBS (100 мкл), смешивали с 8F4 или контрольным изотипическим антителом (20 мкг) и внутривенно инъецировали в 200 сГр-облученных HLA-A2+ трансгенных NOD/SCID мышей. Через две недели мышей забивали, вскрывали и ткани гомогенизировали и анализировали на наличие лейкозных клеток способом проточной цитометрии с помощью маркеров клеточной поверхности человека и мыши. Приведены результаты проточной цитометрии клеток, выделенных из костного мозга (BM) мыши. Контрольные (PBS-обработанные) и экспериментальные животные, получившие клетки AML плюс 8F4 (AML+ антитело 8F4), не демонстрировали никаких клеток лейкоза человека в BM. В отличие от этого животные, которые получали клетки AML плюс контрольное антитело (AML+ изотипический контроль), продемонстрировали наличие клеток CD33+CD45+ человека в костном мозге с таким же фенотипом, что и вводимые AML.

Фиг. 7. Стратегия иммунизации для получения антитела анти-PR1/HLA-A2.

Схематическое изображение молекулы МНС класса I. Класс МНС состоит из тяжелой цепи и цепи  $\beta 2$  микроглобулина. Пептидный антиген связывается с канавкой МНС-I, фланкированной  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  спиральными доменами цепи.

Фиг. 8А, В. Антитело 8F4 предотвращает приживание AML человека в HLA-A2 Tg ксенотрансплантатной модели.

Первичные HLA-A2+ AML клетки ( $10^6$ ) отмывали, ресуспендировали в PBS (250 мкл), смешивали с 20 мкг 8F4 или контрольного изотипического антитела и внутривенно вводили в сублетально облучен-

ных (200 сГр) HLA-A2 Tg NOD/SCID мышей. В назначенное время периферическую кровь, костный мозг и ткани анализировали на наличие лейкоза при помощи гистохимии (фиг. 8А) и проточной цитометрии (фиг. 8В). Облученных мышей без передачи AML и с предварительно переданными AML клетками использовали в качестве отрицательного и положительного контролей соответственно.

Фиг. 8А. AML инфильтрация в тканях экспериментальных мышей после инъекции клеток AML плюс 8F4 (в левой панели), инъекция клеток AML плюс контрольное изотипическое антитело (iso, центральная панель) и контрольные мыши без передачи AML (правая панель).

Фиг. 8В. клетки AML (показано пре-передача, левая панель) не детектировались в костном мозге (две верхние панели) и периферической крови (две нижние панели) контрольных и экспериментальных 8F4-мышей без передачи. Мыши, которые получали клетки AML, смешанные с изотипическим соответствующим контрольным антителом (iso), показали приживление AML1 и AML5 через две или четыре недели после передачи AML. Расширенная панель, включающая специфический маркер клеток мыши (mCD45), 3-6 маркеров человека (CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, HLA-DR) и Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen), использовали для проточного цитометрического анализа приживления AML. Все изображения демонстрируют жизнеспособные клетки mCD45.

Фиг. 9А-С. 8F4 индуцирует временную (21 день) нейтропению у HLA-A2 трансгенных NOD/SCID из-за экспрессии консервативной PR1-последовательности на HLA-A2-экспрессирующих гемопоэтических клетках мыши. HLA-A2 Tg NOD/SCID мышам инъецировали 200 мкг (10 мг/кг) 8F4 или изотипического контрольного Ab. Эти животные, как было показано, представляют эндогенный PR1. Девять дней спустя клетки костного мозга собирали и окрашивали mAb, направленные на антигены мыши (B220-PE, Gr-1-PB, CD11b-APC, F4/80-PE-Cy7, CD3-FITC и LIVE/DEAD Fixable Aqua) и исследовали способом проточной цитометрии.

Фиг. 9А. Снижение гранулоцитов было очевидным в рассеянных профилях костного мозга (левая панель). Gr-1<sup>lo</sup> незрелые нейтрофилы присутствовали, но Gr-1<sup>hi</sup> зрелые нейтрофилы были менее многочисленными в костном мозге 8F4-обработанных мышей (центральные панели). Кроме того, моноциты (SSC<sup>lo</sup> CD11b<sup>+</sup>; нижнее правое окно правой панели) были снижены у 8F4-обработанных животных.

Фиг. 9В. Внутривенная инъекция 8F4 (5 мг/кг) индуцировала временное снижение абсолютного числа циркулирующих зрелых гранулоцитов, макрофагов и моноцитов у HLA-A2 Tg NOD/SCID мышей. Через три недели после лечения вся популяция сохраняется. Окна, показанные на фиг. 9А, были использованы для определения частоты каждого типа клеток как процент живых клеток. Величины ошибки представляли собой стандартные отклонения n=2 животных на группу. Показан один характерный эксперимент из трех.

Фиг. 9С. Никаких значительных патологических изменений не наблюдалось в печени, легких, селезенке, почках, сердце или мозге HLA-A2 Tg NOD/SCID мышей через 7 дней после инъекций 200 мкг (10 мг/кг) 8F4. Показаны H&E срезы характерных тканей 2 мышей.

Фиг. 10А, В. 8F4 индуцирует временную лейкопению созданных гемопоэтических клеток человека после передачи пуповинной крови человека, обогащенной клетками CD34<sup>+</sup>, в NOD/SCID мышей.

Порции (50-150 мл) свежей HLA-A2<sup>+</sup> пуповинной крови (СВ) обрабатывали фиколлом с помощью Histopaque1077, промывали PBS, затем буфером CliniMACS (0,5% HSA в PBS, pH 7,2/1 mM ЭДТА, Miltenyi). 10<sup>8</sup> клеток ресуспендировали в 300 мл буфера MACS, смешанного со 100 мл CD34 микробус (Miltenyi), и инкубировали при 4°C в течение 30 мин и промывали. Клетки CD34<sup>+</sup>, меченные магнитными бусами, очищали с помощью колонок 2 LS (Miltenyi). Клетки CD34<sup>+</sup> элюировали с колонки, подсчитали и i.v. инъецировали облученным (400 рад) NOD/SCID мышам (1-2,5×10<sup>6</sup> клеток на мышь). Контрольная мышь СВ1-5 не получила клеток СВ.

Фиг. 10А. Начиная с 4 недели после трансплантации периферическую кровь мышей отбирали раз в неделю или раз в две недели, чтобы контролировать приживления трансплантата по пуповинной крови с помощью FACS с использованием CD45 мыши, CD45 человека и маркеров HLA. Через 9-12 недель после переноса мышам i.v. инъецировали 20 мкг (1 мг/кг) 8F4 два раза с недельным интервалом между инъекциями (пунктирные стрелки).

Фиг. 10В. Через четыре недели после второй инъекции 8F4 мышей забивали. Кровь, селезенку и костный мозг анализировали на приживление клеток человека, как описано выше.

Фиг. 11. Схематическая структура pCh8F4, pHu8F4-1, pHu8F4-2 и pHu8F4-2-AA (коллективный вектор экспрессии).

По часовой стрелке, начиная от сайта Sail на вершине, плазида содержит транскрипционный блок тяжелой цепи, начиная с основного быстрого раннего промотора и энхансер цитомегаловируса (CMV) человека (промотора CMV) для инициации транскрипции гена тяжелой цепи антитела. За CMV-промотором следуют VH-экзон, геномная последовательность, содержащая константную область тяжелой цепи гамма-1 человека, включая CH1, шарнир, экзоны CH2 и CH3 с промежуточными интронами, и сайт полиаденилирования после CH3 экзона. После последовательности гена тяжелой цепи начинается транскрипция блок легкой цепи с CMV-промотором, за которым следует VL-экзона и геномная последовательность, содержащая человеческой экзона константной области каппа-цепи человека (CL) частью интрона, который ей предшествовал, и сайт полиаденилирования после CL-экзона. Ген легкой цепи

затем следует за ранним промотором SV40 (SV40-промотор), ген ксантингуанинафосфорибозилтрансферазы (gpt) *E.coli* и сегмент, содержащий сайт полиаденилирования SV40 (поли(а) сайт SV40). Наконец, плазида содержит часть плазмиды pUC19, содержащей бактериальный участок начала репликации (pUC ori) и ген бета-лактамазы ( $\beta$ -лактамазы).

Фиг. 12. Выравнивание аминокислотных последовательностей VH 8F4, VH гуманизированного 8F4 (Hu8F4) и VH человеческого акцепторного U96282.

Аминокислотные остатки представлены в виде однобуквенного кода. Цифры выше последовательностей указывают на положения, согласно Rabat et al. (1991). Последовательности CDR, определенные Rabat et al. (1991), подчеркнуты. Остатки CDR в VH U96282 опускаются на фигуре.

Фиг. 13. Выравнивание аминокислотных последовательностей VL 8F4, двух версий гуманизированного VL 8F4 (VL1 и VL2 Hu8F4) и VL акцепторного AY043146 человека.

Аминокислотные остатки представлены в виде однобуквенного кода. Цифры выше последовательностей указывают на положения согласно Rabat et al. (1991). Последовательности CDR, определенные Rabat et al. (1991), подчеркнуты. Подчеркнутые остатки в VL1 Hu8F4, как было предсказано, связываются с CDR, и соответствующий остаток мыши оставался в этом положении в VL1 Hu8F4. CDR остатков в VL AY043146 опускаются в фигуре.

Фиг. 14. SDS-PAGE анализ очищенного антитела 8F4. Антитела (5 мкг каждого) разгоняли в 4-20% SDS-PAGE геле в восстанавливающих условиях.

Предварительно окрашенный стандарт SeeBluePlus2 от Invitrogen (Cat # LC5925) был использован в качестве стандарта молекулярных масс (полосы 1, 7 и 8). Образцы: 8F4.3.3 (дорожка 2), 8F4-4 (дорожка 3), Ch8F4 (дорожка 4), Hu8F4-1 (дорожка 5), Hu8F4-2 lot 9/9/10 (дорожка 6), Hu8F4-2 lot 1/23/11 (дорожка 9) и Hu8F4-2-AA (дорожка 10).

Фиг. 15. ELISA-анализ связывания Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA с PR-1/HLA-A2. Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA тестировали в различных концентрациях, начиная с 1 мкг/мл и серийными 3-кратными разведениями, для связывания с PR-1/HLA-A2.

Фиг. 16А-16С. Специфичность связывания Hu8F4 и механизм действия.

Фиг. 16А. Тест на специфичность.

Фиг. 16В. Тест на аффинность.

Фиг. 16С. CDC-анализ.

Фиг. 17. Лечение Hu8F4 исключает установление AML. Анализ определяет процент приживания трансплантата AML, полученного за 3 недели до лечения антителом.

Фиг. 18. 8F4 вызывает обратимую панцитопению: эффекты на нормальные гемопоэтические клетки-предшественники у SCID-мышей.

Фиг. 19. 8F4 вызывает обратимую панцитопению: эффекты на нормальные клетки крови у иммунокомпетентных мышей.

Фиг. 20А-С. 8F4 задерживает рост рака опухоли груди и продлевает жизнь.

Фиг. 20А. Опухолесвязанные нейтрофилы в 231 BgCA ксенотрансплантатных опухолях.

Фиг. 20В. Модель первичной опухоли.

Фиг. 20С. Модель метастатической опухоли.

Фиг. 21А, В. Поглощение NE и P3 клеточными линиями твердых опухолей.

Клеточные линии, представляющие солидные опухоли, инкубировали с (фиг. 21А) NE (10 мг/мл) или (фиг. 21В) P3 (10 мг/мл), а затем пермеализировали и окрашивали антителами анти-NE или анти-P3. Данные представляют среднее  $\pm$  6 SEM кратное увеличение поглощения NE или P3 против не подвергавшихся импульсу клеток от лунок в трех повторностях от двух независимых экспериментов. MDA-MB-231, Карцинома молочной железы; MIA PaCa-2, карцинома поджелудочной железы; Mel 624 и Mel 526, меланомы; OVCAR3, аденокарцинома яичника; SW-620, аденокарцинома толстой кишки.

Фиг. 22А-D. Рак молочной железы эндогенно не экспрессирует P3.

мРНК экстрагировали из (фиг. 22А) линии клеток рака молочной железы и (фиг. 22В) первичной ткани рака молочной железы. РТ-ПЦР проводили с использованием праймеров P3, которая показывает отсутствие экспрессии мРНК P3 в клеточных линиях рака молочной железы и первичном раке молочной железы. Клеточная линия Jurkat и лейкозная клеточная линия HL-60 были использованы в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Клетки первичного рака молочной железы из тканей пациента, образцы из молочной железы 1-3 были получены путем LCM-представления на опухоли, полученной от пациентов во время хирургической резекции. Маммаглобин-1 (MGB-1) был использован для подтверждения анализа клеток рака молочной железы.  $\beta$ -актин и GAPDH использовали в качестве контроля нагрузки.

Фиг. 22С. Иммуноблоты демонстрируют отсутствие белка P3 в WCL из пяти различных клеточных линий рака молочной железы. Гели были нагружены 20 мг белка. Очищенный P3 (5 мг) использовали в качестве положительного контроля и GAPDH использовали в качестве контроля нагрузки.

Фиг. 22D. Иммунохимическая, показывающая отсутствие P3 в ткани молочной железы пациента (молочная железа 3). Левая панель, срез H&E (первоначальное увеличение 3200), показывающая плохо

дифференцированную карциному с примесью нейтрофилов. Правая панель, иммуногистохимическое окрашивание на P3 показывает положительное окрашивание P3 (коричневый) в примешанных нейтрофилах, но не в клетках рака молочной железы. Врезка (первоначальное увеличение 3400) показывает редкую опухолевую клетку, поглощающую нейтрофил. Оба изображения получены из одного и того же пациента и являются типичными для пяти тканей. Стрелки указывают нейтрофилы.

Фиг. 23А-С. P3 поглощается клеточными линиями рака молочной железы и локализуется в лизосомальных компартментах.

Фиг. 23А. Линии клеток MDA-MB-231, MCF-7 и MCF-7-HER18 инкубировали с растворимым P3 (10 мг/мл) в течение 1, 4 и 24 ч, а затем внутриклеточно окрашивали при помощи анти-P3 Ab. MFI измеряли для экспериментальных групп в трех повторностях и нормировали MFI не подвергавшихся импульсу клеток. Кратное увеличение в MFI по сравнению с не подвергавшимися импульсу клеток наносится на  $\gamma$ -ось. Данные означают 6 стандартных погрешностей среднего и представляют два независимых эксперимента.

Фиг. 23В. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с возрастающими дозами растворимого P3 или OVA (ova) и анализировали способом проточной цитометрии на внутриклеточное поглощение P3 или OVA с помощью антител анти-P3 или анти-OVA соответственно. Данные означают 6 стандартных погрешностей среднего от повторяющихся экспериментов.

Фиг. 23С. Клетки MDA-MB-231 культивировали с растворимыми P3 (10 мг/мл) и затем окрашивали внутриклеточно для P3 (красный) и LAMP-2 (зеленый). Изображения конфокальной микроскопии демонстрируют локализацию P3 в лизосомальных компартментах через 4 ч после поглощения, что показано путем наложения изображений (желтый). Ядра кажутся синими за счет DAPI. Масштабные линейки, 5 мкм.

Фиг. 24А-Ф. Поглощение P3 и кросс-представление P3 и NE увеличивает восприимчивость рака молочной железы к убийству при помощи PR1-CTL и анти-PR1/HLA-A2.

Фиг. 24А. Клетки MDA-MB-231 рака молочной железы инкубировали с растворимым P3, облученными PMN или PBMC в течение 4 ч. Клетки пермеализировали, окрашивали анти-P3 Ab и анализировали способом проточной цитометрии. Для клеточно-связанного поглощения рассеяние света наблюдается на проточной цитометрии при условии четкого различия между клетками PBMC, PMN и MDA-MB-231. PBMC и PMN сами по себе использовались в качестве отрицательного и положительного контролей соответственно. ANOVA с последующим Tukey-тестом проводили с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*p, 0,05). Данные представляют собой средние значения 6 СПС для повторяющихся экспериментов.

Фиг. 24В. Клетки MDA-MB-231 рака молочной железы культивировали с растворимыми P3 или NE (10 мг/мл) с увеличением временных точек и затем анализировали экспрессию PR1/HLA-A2. Среднее значение 6 СПС кратного увеличения MFI PR1/HLA-A2 против не подвергавшихся импульсу клеток приведено из повторяющихся экспериментов. ANOVA с последующим Tukey-тестом проводили с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*p, 0,01, \*\*p, 0,0001).

Фиг. 24С, D. Клетки MDA-MB-231 культивировали в течение 24 ч в среде, содержащей NE или P3 (10 мг/мл) и ингибиторы Ag-представления брэфелдин или лактацистин. Клетки затем анализировали на экспрессию PR1/HLA-A2. Среднее значение 6 СПС MFI PR1/HLA-A2 показано для повторяющихся лунок типичного эксперимента. ANOVA с последующим Tukey-тестом проводили с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*p, 0,01, \*\*p, 0,0001).

Фиг. 24Е. Клетки MDA-MB-231 культивировали в течение ночи в средах, содержащих P3 или NE (10 мг/мл), нагруженных кальцеином-AM, а затем совместно культивировали с PR1-CTL в течение 4 ч. Цитотоксичность определяли путем измерения высвобожденного кальцеина-AM. NE- или P3-импульсные клетки демонстрируют более высокий уровень убийства против не подвергавшихся импульсу клеток MDA-MB-231. PR1-импульсные и не подвергавшиеся импульсу клетки T2 использовали в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Данные представляют собой средние значения 6 СПС для повторяющихся лунок типичного эксперимента.

Фиг. 24F. Клетки MDAMB-231 культивировали с NE (10 мг/мл) или P3 (10 мг/мл) в течение 24 ч. Клетки инкубировали с анти-PR1/HLA-A2 (8F4) Ab в течение 60 мин, а затем добавляли комплемент. Комплементзависимую цитотоксичность измеряли с помощью высвобождения кальцеина-AM и показывает конкретные убийства NE- или P3-импульсных клеток MDA-MB-231 при помощи 8F4 Ab. Данные по цитотоксичности представляют собой средние значения 6 СПС для повторяющихся лунок типичного эксперимента. Непарный t-тест был проведен с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*p, 0,05).

Фиг. 25А-D. PR1/HLA-A2 и PR1-CTL детектируются у пациентов с раком молочной железы и меланомой.

Фиг. 25А. Резектированные ткани рака молочной железы HLA-A2+-пациенты (молочные железы 1 и 4) окрашивали анти-PR1/HLA-A2 (8F4)-647 (красный) и анти-СК7)-FITC (зеленый) и затем отображали с помощью конфокальной лазерной микроскопии. Оказалось, что PR1/HLA-A2 экспрессируется клетками рака молочной железы, что показано совместным окрашиванием 8F4 с СК7. DAPI-синий использовался

ли для окрашивания ядер клеток.

Фиг. 25В. Последовательные срезы резецированной HLA-A2+ ткани рака молочной железы окрашивали анти-CD4 5-647 (красный) (левая панель) или анти-CK7-FITC (зеленый) и 8F4-647 (красный) (правая панель), а затем отображали с помощью конфокальной лазерной микроскопии. PR1/HLA-A2 экспрессируется клетками рака молочной железы (8F4+/CK7+) в областях, которые содержат минимальное количество лейкоцитов (CD4 52), тем самым подтверждая экспрессию PR1/HLA-A2 клетками рака молочной железы. DAPI-синий использовали для окрашивания ядер клеток.

Фиг. 25С. График с боксами и "усиками" показывает PR1-CTL в периферической крови от HLA-A2+ пациентов с раком молочной железы (n=11), меланомой (n=7) и здоровых (n=9) HLA-A2+ доноров. Mann-Whitney U-тест проводили с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*p, 0,05).

Фиг. 25D. Резецированные ткани HLA-A2+ (меланома 1) и HLA-A22 (меланома 2) пациентов окрашивали 8F4-647 (красный) и анти-MITF-FITC (зеленый) и затем отображали с помощью конфокальной лазерной микроскопии. Оказалось, что PR1/HLA-A2 экспрессируется в образце HLA-A2+ меланомы (меланома 1), что показано совместным окрашиванием 8F4 с MITF. DAPI-синий использовался для окрашивания ядер клеток. Масштабные линейки, 20 мкм.

Фиг. 26А-F. Кросс-представление P3 и NE клетками меланомы увеличивает восприимчивость к PR1-CTL.

Фиг. 26А. Двойное окрашивание NE (коричневый) и MITF (розовый).

Фиг. 26В. P3 (коричневый) и MITF (розовый) в образцах от пациентов с первичной меланомой показывает отсутствие NE и P3 в меланоме. Изображения были получены при исходном увеличении 3100. Вставка, исходное увеличение 3400, показывает разбросанные NE -или P3-позитивные клетки, которые, скорее всего, являются воспалительными клетками.

Фиг. 26С. Вестерн-блот, показывающий отсутствие NE и P3 в клеточных линиях меланомы. Лейкозную клеточную линию U-937 использовали в качестве положительного контроля для NE и P3. Тубулин использовали в качестве контроля нагрузки. M = маркер молекулярных масс.

Фиг. 26D, E. Линию клеток меланомы 526 HLA-A2+ культивировали с растворимыми NE (10 мг/мл) или P3 (10 мг/мл) с увеличением временных точек и затем анализировали (фиг. 26D) поглощение NE и P3 и (фиг. 26E) кросс-представление (т.е. экспрессию PR1/HLA-A2). Кратное увеличение MFI NE или P3 (фиг. 26D) или PR1/HLA-A2 (фиг. 26E) против не подвергнутых импульсу клеток показано на оси y. ANOVA с последующим Tukey-тестом проводили с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*\*p, 0,0001, \*p, 0,05). Данные представляют среднее значение 6 СПС для повторяющихся экспериментов.

Фиг. 26F. Кальцеин-АМ анализ на цитотоксичность показывает убийство NE (10 мг/мл) и P3 (10 мг/мл) 24 ч импульсированных клеток меланомной линии 526 HLA-A2+ при помощи PR1-CTL против не подвергнутых импульсу (Unp) Mel 526. Не подвергнутые импульсу (T2 Unp) и PR1-импульсные (T2 PR1) T2 клетки были использованы в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Данные представляют собой средние значения 6 СПС для повторяющихся лунок типичного эксперимента. Непарный t-тест был проведен с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (\*p, 0,05).

#### Описание иллюстративных вариантов осуществления

PR-1 внутренний пептид (VLQELNVTV; SEQ ID NO: 45), как было показано, распознается на мембранах экспрессируемом HLA-A\*0201 лейкозной клетки при помощи CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), и PR1-специфические CTL специфически лизируют клетки миелоидного лейкоза, но не нормальные клетки костного мозга. Вакцинация HLA-A2+ пациентов с AML, CML и MDS PR1-пептидом индуцировала PR-1-CTL иммунитет у 58% пациентов и реальные клинические ответы у 13 из 66 (20%) пациентов. Хотя эти результаты являются обнадеживающими, высокая опухолевая нагрузка остается барьером для успешной вакцинации.

На том основании, что PR1-пептид экспрессируется в достаточном количестве только на поверхности клеток миелоидной лейкемии, а не на нормальных клетках костного мозга, авторы изобретения старались разработать антитела, нацеленные на PR1/HLA-A\*0201, которые могут быть использованы в терапевтических целях для лечения пациентов с миелоидным лейкозом или которые могли бы быть использованы для определения того, какие пациенты могут быть чувствительны к иммунотерапии на основе PR1, например вакцины или адоптивная Т-клеточная передача. Поскольку HLA-A2+ является наиболее часто экспрессируемой аллелью HLA (40% общего населения белой европеоидной расы), терапия на основе антител к Т-клеточному эпитопу вследствие этого была бы новой и могла бы иметь широкое применение. Путем иммунизации иммунокомпетентных мышей BALB/c рекомбинантными мономерами PR1/HLA-A\*0201 заявители получили моноклональное антитело IgG2a-каппа (8F4) со специфичностью к комбинированному эпитопу PR1/HLA-A\*0201. Антитело 8F4, как было показано, обладает высокой аффинностью к PR1/HLA-A\*0201 ( $K_D=9,9$  наномоль), и, как было показано, распознают только PR1-импульсные T2 клетки-мишени, но не контрольные пептид-импульсные клетки. 8F4 связывается с HLA-A2+ AML с помощью как FACS, так и конфокальной микроскопии для мечения клеток, но не с нормальными клетками периферической крови HLA-A2+.

Кроме того, 8F4 индуцировало дозозависимую комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC) HLA-A2+ первичного лейкоза человека, но не нормальных клеток костного мозга. По существу, антитело 8F4 специфически предотвращало приживание AML человека в HLA-A2 трансгенной NOD/SCID животной модели с однократным лишь воздействием антитела во время адоптивной передачи в животное. Кроме того, 8F4 задерживает роста опухоли рака молочной железы и увеличивает продолжительность жизни, несмотря на тот факт, что P3 и NE не экспрессируются в клетках рака молочной железы. Взятые вместе, эти результаты показывают, что создано антитело со специфичностью к клеточно-мембран-связанному PR1/HLA-A\*0201 эпитопу, важному Т-клеточному антигену-мишени, которое специфически выявляет и уничтожает человеческие лейкозы и солидные опухоли.

### I. Определения

Выражения "выделенный" или "биологически чистый" относятся к веществу, которое в значительной степени или по существу не содержит компонентов, которые обычно сопутствуют веществу, в то время как оно находится в своем нативном состоянии. Таким образом, выделенные пептиды в соответствии с изобретением предпочтительно не содержат веществ, которые обычно связаны с пептидами в их окружающей среде *in situ*.

"Главный комплекс гистосовместимости" или "МНС" представляет собой кластер генов, которые играют роль в контроле клеточных взаимодействий, ответственных за физиологические иммунные реакции. В организме человека комплекс МНС также известен как комплекса HLA. Для подробного описания комплексов МНС и HLA см.и Paul (1993).

"Лейкоцитарный антиген человека" или "HLA" представляет собой белок класса I или класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС) человека (см., например, Stites, 1994).

"Супертип или семейство HLA", как используется в настоящем описании, описывает наборы молекул HLA, сгруппированных на основе общих пептид-связывающих специфичностей. Молекулы HLA класса I, которые разделяют в некоторой степени сходную аффинность связывания с пептидами, несущими определенные аминокислотные мотивы, сгруппированы в супертипы HLA. Термины "суперсемейство HLA, HLA семейство супертипов, семейство HLA и молекулы HLA-xx-подобного супертипа" (где xx обозначает конкретный тип HLA) являются синонимами.

Термин "мотив" относится к структуре остатков в пептиде определенной длины, обычно пептиде длиной примерно от 8 до примерно 13 аминокислоты для мотива HLA класса I, и примерно от 6 до примерно 25 аминокислот для мотива HLA класса II, который распознается конкретной молекулой HLA. Пептидные мотивы, как правило, являются разными для каждого белка, кодируемого каждой аллелью HLA человека, и отличаются в структуре первичного и вторичного якорных остатков.

"Патологическая клетка" представляет собой любую клетку, которая, как считается, имеет характеристики, характерные для этого типа клеток, в том числе атипичный рост, типичный рост в атипичном расположении или типичное действие в отношении атипичной мишени. Такие клетки включают злокачественные клетки, доброкачественные гиперпластические или диспластические клетки, воспалительные клетки или аутоиммунные клетки.

### II. PR-1 и HLA-рестрикция

#### A. PR-1.

Внутренний пептид PR-1 (VLQELNVTV; SEQ ID NO: 45) является производным протеиназы 3 (P3) и эластазы нейтрофилов (NE), каждая из которых aberrантно экспрессируется при лейкозе. Было показано, что он распознается на мембрана-экспрессируемом HLA-A\*0201 лейкозной клетки CD8<sup>+</sup> цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). PR-1-специфические CTL специфически лизируют миелоидный лейкоз, в том числе острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML) и миелодиспластический синдром (MDS), но не нормальные клетки костного мозга. Ранее, авторы изобретения показали, что PR-1-вакцинация HLA-A2+-пациентов с AML, CML и MDS PR1-пептидом в Montanide ISA-51- и GM-CSF-индуцировала PR-1-CTL иммунитет у 58% пациентов и объективные клинические ответы у 13 из 66 (20%) пациентов.

#### B. HLA-A2.

Лейкоцитарная антигенная система (HLA) человека представляет собой название главного комплекса гистосовместимости (МНС) в организме человека. Суперлокус содержит большое количество генов, связанных с функцией иммунной системы в организме человека. Эта группа генов находится на 6-й хромосоме и кодирует белки, представляющие антиген клеточной поверхности, и многие другие гены. Белки, кодируемые определенными генами, также известны как антигены, как результат их исторического открытия в качестве факторов при пересадке органов. Основные антигены HLA являются существенными элементами иммунной функции. Разные классы имеют разные функции.

Антигены HLA класса I (A, B и C) представляют пептиды внутренней части клетки (в том числе и вирусные пептиды при наличии). Эти пептиды образуются из расщепленных белков, которые расщепляются в лизосомах. Пептиды, как правило, представляют собой небольшие полимеры длиной около 9 аминокислот. Чужеродные антигены привлекают киллерные Т-клетки (также называемые CD8<sup>+</sup>-клетки), которые разрушают клетки. Антигены HLA класса II (DR, DP и DQ) представляют антигены с внешней стороны клетки Т-лимфоцитам. Эти специфические антигены стимулируют Т-хелперные клетки к вос-

произведению, и эти Т-хелперные клетки затем стимулируют продуцирующие антитела В-клетки, внутренние антигены подавляются супрессорными Т-клетками.

HLA-A2 (A2) представляет собой серотип лейкоцитарного антигена человека в пределах серотипной группы HLA-A "А". Серотип идентифицирует генные продукты многих HLA-A\*02-аллелей, в том числе генные продукты HLA-A\*0201, \*0202, \*0203, \*0206 и \*0207. А\*02 является более распространенным, однако А\*0201 встречается с высокой частотой в Северной Азии и Северной Америке. А2 является самым многообразным серотипом, показывая разнообразие в Восточной Африке и Юго-Западной Азии. Несмотря на то, что частота А\*0201 в Северной Азии является высокой, ее разнообразие ограничено менее распространенными азиатскими вариантами А\*0201 - \*0203, \*0206.

Серотип определяется при помощи распознавания антителом  $\alpha^2$ -подмножества HLA-A  $\alpha$ -цепей. Для А2,  $\alpha$  "А" цепь кодируется группой HLA-A\*02-аллелей, а  $\beta$ -цепь кодируется локусом В2М. А2 и А\*02 практически являются синонимами по смыслу. А2 является более распространенным в Северной Азии и Северной Америке, чем в других странах, и он является частью нескольких длинных гаплотипов.

### III. Антитела

Настоящее изобретение относится к продукции и использованию антител, которые связываются с PR1 в контексте презентации HLA-A2. Антитела способны к "специфическому связыванию" с конкретной мишенью или серией антигенно родственных мишеней. Как используется в настоящем документе, антитело, как говорят, способно к "специфическому связыванию" с антигеном, если антиген отличается от антигенно различных молекул по связыванию с вариабельной областью антитела. Такие взаимодействия отличаются от неспецифического связывания, которое включает классы соединений, независимо от их химической структуры (например, связывание белков с нитроцеллюлозой и др.). В частности, антитело по настоящему изобретению может проявлять "высокоспецифическое связывание" таким образом, что оно будет не способно или практически не способно связываться даже с близкородственными молекулами.

Моноклональные антитела могут быть легко получены с помощью хорошо известных способов, таких, которые приведены в качестве примера в патенте США 4196265, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. Как правило, методика предполагает первую иммунизацию подходящего животного выбранным антигеном (например, полипептидом или полинуклеотидом по настоящему изобретению) способом, достаточным для обеспечения иммунного ответа. Грызуны, такие как мыши и крысы, являются предпочтительными животными. Клетки селезенки иммунизированных животных затем сливают с клетками бессмертной миеломной линии. Успешные слияния затем проверяют на продукцию соответствующих антител.

В одном из вариантов осуществления молекулы антитела содержат фрагменты (такие как F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>), которые получают, например, при протеолитическом расщеплении mAb, или одноцепочечные иммуноглобулины, получаемые, например, с помощью рекомбинантных средств. Такие производные антител являются одновалентными. В одном из вариантов осуществления такие фрагменты могут быть объединены друг с другом, или с другими фрагментами антител, или рецепторными лигандами с образованием "химерных" молекул связывания. По существу, такие химерные молекулы могут содержать замещающие группы, способные связываться с различными эпитопами одной и той же молекулы, или они могут быть способны связываться с активированным эпитопом протеина С и "неактивированным эпитопом протеина С".

Если антитела или их фрагменты предназначены для лечебных целей, то желательно "гуманизировать" их для ослабления любой иммунной реакции. Такие гуманизированные антитела могут быть изучены в контексте *in vitro* или *in vivo*. Гуманизированные антитела могут быть получены, например, путем замены иммуногенной части антитела соответствующей, но не иммуногенной частью (т.е. химерные антитела). Заявка РСТ РСТ/U.S. 86/02269; заявка EP 184187; заявка EP 171496; заявка EP 173494; заявка РСТ WO 86/01533; заявка EP 125023; Sun et al. (1987); Wood et al. (1985); Shaw et al. (1988); каждая, включены в настоящее описание в качестве ссылки. Общие обзоры "гуманизированных" химерных антител приведены в статье Morrison (1985; также включена в настоящее описание в качестве ссылки). "Гуманизированные" антитела также могут быть получены путем замещения CDR или CEA. Jones et al. (1986); Verhoevan et al. (1988); Beidler et al. (1988); каждая из ссылок включена в настоящее описание в качестве ссылки.

#### A. Варианты.

Ниже приведено обсуждение, посвященное изменению аминокислот белка для получения модифицированного белка. В получении таких замен может рассматриваться индекс гидрофобности аминокислот. Важность индекса гидрофобности аминокислот в присвоении интерактивной биологической функции белку обычно ясна в данной области (Kyte and Doolittle, 1982). Принято считать, что относительный гидрофобный характер аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру получаемого в результате белка, что, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

Из уровня техники также известно, что замену сходных аминокислот можно эффективно выполнять на основе гидрофильности. В патенте США 4554101, который приведен в настоящем описании в качестве ссылки, описано, что самая большая локальная средняя гидрофильность белка, которая регулируется гидрофильностью соседних аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка. Как описано в патенте США 4554101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности:

основные аминокислоты: аргинин (+3,0), лизин (+3,0) и гистидин (-0,5);

кислые аминокислоты: аспарагиновая кислота (+3,0±1), глутаминовая кислота (+3,0±1), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2); гидрофильные, неионные аминокислоты: серии (+0,3), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2), треонин (-0,4);

серосодержащие аминокислоты: цистеин (-1,0) и метионин (-1,3);

гидрофобные неароматические аминокислоты: валин (-1,5), лейцин (-1,8), изолейцин (-1,8), пролин (-0,5±1), аланин (-0,5) и глицин (0);

гидрофобные ароматические аминокислоты: триптофан (-3,4), фенилаланин (-2,5) и тирозин (-2,3).

Понятно, что аминокислота может быть заменена другой аминокислотой, обладающей аналогичной гидрофильностью и продуцирующей биологически или иммунологически модифицированный белок. При таких изменениях замена аминокислот со значениями гидрофильности в пределах ±2 является предпочтительной, аминокислота с гидрофильностью в пределах ±1 является особенно предпочтительной и аминокислота с гидрофильностью в пределах ±0,5 еще более предпочтительной.

Как указано выше, аминокислотные замены, как правило, основаны на относительном сходстве боковой цепи аминокислот-заместителей, например их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т.п. Типичные замены, которые учитывают различные вышеуказанные характеристики, хорошо известны специалистам в данной области и к ним относятся аргинин и лизин; глутаминовая и аспарагиновая кислоты; серии и треонин; глутамин и аспарагин и валин, лейцин и изолейцин.

В настоящем изобретении также может использоваться применение пептидных миметиков при получении полипептидов (см., например, Johnson, 1993), имеющих многие из природных свойств антитела, но с измененными и/или улучшенными характеристиками. Разумным обоснованием использования миметиков является то, что пептидный остов белков существует в основном для ориентации боковых цепей аминокислот так, чтобы облегчить молекулярные взаимодействия, например, антитела и антигена. Эти принципы могут быть использованы в сочетании с принципами, изложенными выше, при конструировании молекул второго поколения, обладающих большим числом природных свойств антитела, но с измененными и даже улучшенными характеристиками.

Полагают, что в настоящем изобретении можно также использовать варианты последовательности, такие как инсерционные или делеционные варианты. У делеционных вариантов отсутствуют один или более остатков нативного белка. Под инсерционными мутантами, как правило, понимают добавление вещества в нетерминальную точку полипептида. Также следует понимать, что варианты с инсерционными последовательностями могут включать N- или C-концевой аминокислоты, и, тем не менее, все еще будут, по существу, такими, как изложено в одной из последовательностей, описанных здесь, при условии, что последовательность удовлетворяет критериям, изложенным выше, в том числе сохранение биологической активности.

Настоящее изобретение также относится к изотипической модификации. Как обсуждается ниже, было определено, что антитело 8F4 представляет собой IgG2a-к. Для получения другого изотипа можно достичь различных функциональных свойств путем модификации Fc-области. Например, изменение в IgG1 может увеличить антителозависимую клеточную цитотоксичность, переключение в класс A может улучшать тканевое распределение и переключение в класс M может улучшать валентность.

Модифицированные антитела могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области, в том числе экспрессией стандартными молекулярно-биологическими способами или химическим синтезом полипептидов. Способы рекомбинантной экспрессии рассматриваются в других разделах настоящего документа.

В. Одноцепочечное антитело.

Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой слияние переменных участков тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, связанных вместе коротким (как правило, серией, глицин) линкером. Эта химерная молекула сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на отсутствие константных областей и введение пептидного линкера. На изображении справа показано, как эта модификация обычно оставляет специфичность в неизменном виде. Эти молекулы исторически были созданы для облегчения фагового дисплея, где очень удобной является экспрессия антиген-связывающего домена в качестве единого пептида. Кроме того, scFv могут быть получены непосредственно из субклонированных тяжелой и легкой цепей, полученный из гибридомы. Одноцепочечные переменные фрагменты не содержат константной Fc-области, присутствующей в полноразмерной молекуле антитела, и поэтому общие сайты связывания (например, белок A/G) использовались для очистки антител. Эти фрагменты часто можно очищать/иммобилизовать с использованием белка L, поскольку белок L взаимодействует с переменной областью легких цепей каппа.

Гибкие линкеры, как правило, состоят из спиральных и способствующих повороту аминокислотных остатков, таких как аланин, серии и глицин. При этом другие остатки также могут функционировать. Tang et al. (1996) использовали фаговый дисплей в качестве средства быстрого селектирования специализированных линкеров для одноцепочечных антител (scFv) из библиотек белковых линкеров. Была сконструирована библиотека случайных линкеров, в которой гены переменных доменов тяжелой и легкой цепи были связаны сегментом, кодирующим 18-аминокислотный полипептид переменного состава. Спектр scFv (приблизительно  $5 \times 10^6$  разных членов) был показан на нитевидных фагах и подвергнут аффинной селекции с гаптенем. Популяция выбранных вариантов проявляла значительное увеличение активности связывания, но сохранила значительное разнообразие последовательностей. Скрининг 1054 отдельных вариантов впоследствии образовывать каталитически активное scFv, которое эффективно продуцировалось в растворимой форме. Анализ последовательности выявил консервативный пролин в линкере через два остатка после С-конца VH и обилие аргининов и пролинов в других положениях, как единственные общие особенности выбранных границ.

Рекомбинантные антитела по настоящему изобретению также могут включать последовательности или части, которые обеспечивают димеризацию или мультимеризацию рецепторов. Такие последовательности включают таковые, полученные из IgA, которые позволяют формировать мультимеры в соединении с J-цепью. Другой домен мультимеризации представляет собой димеризационный домен Gal4. В других вариантах осуществления цепи могут быть модифицированы веществами, такими как биотин/авидин, который позволяет комбинировать два антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения одноцепочечное антитело может быть получено путем соединения легких и тяжелых цепей рецепторов с использованием непептидного линкера или химического звена. Как правило, легкие и тяжелые цепи следует продуцировать в различных клетках, очищать, и впоследствии соединять их друг с другом надлежащим образом (т.е. N-конец тяжелой цепи прикрепляется к С-концу легкой цепи через соответствующий химический мост).

Сшивающие реагенты используются для формирования молекулярных мостиков, которые связывают функциональные группы двух различных молекул, например, стабилизирующее и коагулирующее средство. Однако предполагается, что могут быть созданы димеры или мультимеры одного и того же аналогового или гетеромерного комплексов, состоящие из различных аналогов. Для соединения двух различных соединений поэтапным образом, могут быть использованы гетеробифункциональные перекрестно сшивающие реагенты, которые устраняют образование нежелательных гомополимеров. Табл. 1 иллюстрирует некоторые перекрестно сшивающие реагенты.

Таблица 1

## Гетеробифункциональные перекрестно сшивающие реагенты

Линкер	Реагирует с	Преимущества и применения	Длина плеч спейсера \ после перекрестного сшивания
SMPT	Сульфгидрилы первичных аминов	. Вольшая стабильность	11,2 А
SPDP	Сульфгидрилы первичных аминов	. тиолирование . Расщепляемая перекрестная сшивка	6,8 А
LC-SPDP	Сульфгидрилы первичных аминов	. Удлиненное плечо спейсера	15,6 А
Sulfo-LC-SPDP	Сульфгидрилы первичных аминов	. Удлиненное плечо спейсера . Водорастворимый	15,6 А
SMCC	Сульфгидрилы первичных аминов	. Стабильная малеимидная реактивная группа . Конъюгация фермент-антитело . Конъюгация гаптен-белок-носитель	11,6 А
Sulfo-SMCC	Сульфгидрилы первичных аминов	. Стабильная малеимидная реактивная группа . Водорастворимый . Конъюгация фермент-антитело	11,6 А
MBS	Сульфгидрилы первичных аминов	. Конъюгация фермент-антитело . Конъюгация гаптен-белок-носитель	9,9 А
Sulfo-MBS	Сульфгидрилы первичных аминов	. Водорастворимый	9,9 А

SIAB	Сульфгидрилы первичных аминов	· Конъюгация фермент- антитело	10,6 А
Sulfo- SIAB	Сульфгидрилы первичных аминов	· Водорастворимый	10,6 А
SMPB	Сульфгидрилы первичных аминов	· Удлиненное плечо спейсера · Конъюгация фермент- антитело	14,5 А
Sulfo- SMPB	Сульфгидрилы первичных аминов	· Удлиненное плечо спейсера · Водорастворимый	14,5 А
EDC/Su lfo- NHS	Карбоксильные группы первичных аминов	· Конъюгация гаптен- носитель	0
ABH	Неселектируемые карбогидраты	· Реагирует с сахарными группами	11,9 А

Характерный гетеробифункциональный перекрестно сшивающий реагент содержит две реактивные группы: одну, реагирующую с первичной аминогруппой (например, N-гидроксисукцинимидом), и другую, реагирующую с тиольной группой (например, пиридилдисульфидом, малеинимидами, галогенами и т.д.). Через первичный амин реактивной группы перекрестно сшивающий реагент может реагировать с остатком(ами) лизина одного белка (например, выбранного антитела или фрагмента), а через тиольную реактивную группу перекрестно сшивающий реагент, уже присоединенный к первому белку, реагирует с остатком цистеина (свободной сульфгидрильной группой) другого белка (например, селективный реагент).

Желательно, чтобы был использован перекрестно сшивающий реагент, обладающий достаточной стабильностью в крови. Известны многочисленные виды содержащих дисульфидную связь линкеров, которые можно успешно использовать для конъюгатного нацеливания и лечебных/профилактических средств. Линкеры, содержащие дисульфидные связи, которые являются стерически затрудненными, могут дать большую стабильность *in vivo*, предотвращая высвобождение нацеленного пептида до достижения участка действия. Эти линкеры являются, таким образом, одной группой сшивающих реагентов.

Другой перекрестно сшивающий реагент представляет собой SMPT, который является бифункциональным перекрестно сшивающим реагентом, содержащим дисульфидную связь, которая является "стерически затрудненной" соседним бензольным кольцом и метильными группами. Считается, что стерическое затруднение дисульфидной связи служит функцией защиты связи от воздействия тиолатных анионов, таких как глутатион, которые могут присутствовать в тканях и крови и тем самым помочь в предотвращении отсоединения конъюгата до доставки присоединенного реагента к участку-мишени.

Перекрестно сшивающий реагент SMPT, как и многие другие известные сшивающие реагенты, придает способность перекрестно сшивать функциональные группы, такие как SH цистеина или первичных аминов (например, эpsilon аминогруппа лизина). Другой возможный тип перекрестно сшивающего реагента включает гетеробифункциональные фотореактивные фенилазиды, содержащие расщепляемую дисульфидную связь, такие как сульфосукцинимидил-2-(p-азидосалициламидо)этил-1,3'-дифтиопропионат. N-Гидроксисукцинимидильная группа реагирует с первичными аминогруппами, и фенилазид (при фотолизисе) реагирует неселективно с любым аминокислотным остатком.

В дополнение к затрудненным перекрестно сшивающим реагентам, незатрудненные линкеры также могут быть использованы в соответствии с настоящим документом. Другие полезные перекрестно сшивающие реагенты, как полагают, не содержащие или не образующие защищенный дисульфид, включают SATA, SPDP и 2-иминотиолан (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Использование таких перекрестно сшивающих реагентов хорошо известно в данной области. Другой вариант осуществления включает использование гибких линкеров.

В патенте США 4680338 описаны бифункциональные линкеры, которые можно использовать для получения конъюгатов лигандов с аминсодержащими полимерами и/или белками, особенно для образования конъюгатов антител с хелатирующими реагентами, лекарственными препаратами, ферментами, детектируемыми метками и т.п. В патентах США 5141648 и 5563250 описаны расщепляемые конъюгаты,

содержащие лабильные связи, расщепляемые при различных мягких условиях. Этот линкер является особенно эффективным, так как представляющий интерес реагент может быть связан непосредственно с линкером, при расщеплении, приводящим к высвобождению активного реагента. Конкретные варианты применения включают добавление свободной аминной или свободной сульфгидрильной группы к белку, такому как антитело или лекарственный препарат.

В патенте США 5856456 описаны пептидные линкеры для использования при соединении полипептидных компонентов для получения слитых белков, например, одноцепочечных антител. Линкер составляет примерно до 50 аминокислот в длину, содержит по меньшей мере одно нахождение заряженной аминокислоты (предпочтительно, аргинина или лизина), за которой следует пролин, и характеризуется большей стабильностью и сниженной агрегацией. В патенте США 5880270 описаны аминокислосодержащие линкеры, эффективные в разнообразии иммунодиагностических и разделительных методик.

#### C. Очистка.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть очищены. Термин "очищенный", как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения композиции, которую можно отделить от других компонентов, где белок очищают до любой степени относительно его естественно-доступного состояния. Очищенный белок, следовательно, также относится к белку, свободному от среды, в которой он может естественно присутствовать. Если используется термин "по существу очищенный", то это обозначение относится к композиции, в которой белок или пептид образует основной компонент композиции, например, составляющий примерно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более белков композиции.

Способы очистки белков хорошо известны специалистам в данной области. Эти способы включают, на одном уровне, грубое фракционирование клеточного окружения на полипептидную и отличную от полипептидной фракции. После отделения полипептида от других белков представляющий интерес полипептид может быть дополнительно очищен с помощью хроматографического и электрофоретического способов для достижения частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитические способы, особенно подходящие для подготовки чистого пептида, представляют собой ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию; электрофорез в полиакриламидном геле; изоэлектрическую фокусировку. Другие способы очистки белка включают осаждение сульфатом аммония, ПЭГ, антителами и т.п. или путем тепловой денатурации с последующим центрифугированием; гель-фильтрация, обращенная фаза, гидроксилатит и аффинная хроматография и комбинация этих и других способов.

При очистке антитела по настоящему изобретению может быть желательным экспрессировать полипептид в прокариотической или эукариотической системе экспрессии и экстрагировать белок с использованием денатурирующих условий. Полипептид может быть очищен от других клеточных компонентов с помощью аффинной колонки, которая связывается с тег-содержащей частью полипептида. Как известно в данной области, считается, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен или что некоторые стадии могут быть опущены и, тем не менее, давать в результате подходящий способ получения в существенной степени очищенного белка или пептида.

Обычно полноразмерные антитела фракционируют с использованием средств (например, белок А), которые связывают Fc-часть антитела. Кроме того, можно использовать антигены, чтобы одновременно очищать и отбирать соответствующие антитела. Такие способы часто используют связывание средства селекции с поддержкой, такой как колонка, фильтр или бусы. Антитела связывают с поддержкой, загрязнения удаляют (например, смываются) и антитела высвобождают с использованием условий (соль, тепло и др.).

Различные способы количественной оценки степени очистки белка или пептида известны специалистам в данной области в свете настоящего описания. К ним относятся, например, определение специфической активности активной фракции или оценка количества полипептидов во фракции путем анализа методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Другой способ оценки чистоты фракции для расчета удельной активности фракции представляет собой расчет специфической активности фракции, сравнение ее со специфической активностью исходного экстракта, и, таким образом, вычисление степени чистоты. Фактические единицы, используемые для представления количества активности, будут, конечно, зависеть от конкретного способа анализа, выбранного, чтобы следовать очистке, и от того, проявляет или нет экспрессированный белок или пептид детектируемую активность.

Известно, что миграция полипептида может отличаться, иногда значительно, при различных условиях электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Capaldi et al., 1977). Поэтому следует учитывать, что при различных условиях электрофореза кажущаяся молекулярная масса очищенных или частично очищенных продуктов экспрессии может отличаться.

#### D. Конъюгирование антител с терапевтическими или диагностическими средствами.

В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть соединены с различными реагентами для использования в диагностике и терапии заболевания. Связывание может быть выполнено с использованием множества хорошо известных химических реакций и средств, некото-

рые из которых описаны в других разделах настоящего описания.

#### 1. Диагностические реагенты.

Многие диагностические/визуализирующие средства известны специалистам в данной области, как и способы их присоединения к белкам, включая антитела (см., например, патенты США 5021236; 4938948; и 4472509, каждый из которых приведен в настоящем описании в качестве ссылки). Используемые для визуализации вещества могут представлять собой парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы, ЯМР-детектируемые вещества и средства рентгеновской визуализации.

В случае парамагнитных ионов можно отметить в качестве примера ионы, такие как хром(III), марганец(II), железо(III), железо(II), кобальт(II), никель(II), медь(II), неодим(III), самарий(III), иттербий(III), гадолиний(III), ванадий(II), тербий(III), диспрозий(III), гольмий(III) и/или эрбий(III), гадолиний является особенно предпочтительным. Ионы, полезные в других контекстах, таких как рентгеновская визуализация, включают в качестве неограничивающих примеров лантан(III), золото(III), свинец(II) и особенно висмут(III).

В случае радиоактивных изотопов для использования в терапевтических и/или диагностических приложениях можно отметить астат<sup>211</sup>, <sup>14</sup>углерод, <sup>51</sup>хром, <sup>36</sup>хлор, <sup>57</sup>кобальт, <sup>58</sup>кобальт, медь<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, галлий<sup>67</sup>, <sup>3</sup>водород, йод<sup>123</sup>, йод<sup>125</sup>, йод<sup>131</sup>, индий<sup>111</sup>, <sup>59</sup>железо, <sup>32</sup>фосфор, рений<sup>186</sup>, рений<sup>188</sup>, <sup>75</sup>селен, <sup>35</sup>сера, технеций<sup>99m</sup> и/или иттрий<sup>90</sup>. <sup>125</sup>I часто является предпочтительным для использования в определенных вариантах осуществления, и технеций<sup>99m</sup> и/или индий<sup>111</sup> также часто являются предпочтительными из-за их низкой энергии и пригодности для детекции с большим радиусом действия. Радиоактивно меченые рецепторы по настоящему изобретению могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области. Например, рецепторы могут йодироваться при контакте с йодидом натрия и/или калия и химическим окислительным средством, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окисляющим средством, таким как лактопероксидаза. TcR согласно изобретению может быть мечен технецием<sup>99m</sup> при помощи процесса обмена лигандов, например путем редуцирования пертехната раствором олова, хелатирования редуцированного технеция на колонке с Сефадексом и применения антитела к этой колонке. Кроме того, могут быть использованы способы прямой маркировки, например путем инкубации пертехната, восстанавливающего средства, такого как  $\text{SNCl}_2$ , буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия и антитела. Промежуточные функциональные группы, которые часто используются для связывания радиоизотопов, которые существуют как металлические ионы, с антителом представляют собой диэтиленetriаминопентауксусную кислоту (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

Среди флуоресцентных меток, предусмотренных для использования в качестве конъюгатов, являются Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, изотиоцианат флуоресцина, HEX, 6-JOE, Орегон зеленый 488, Орегон зеленый 500, Орегон зеленый 514, Pacific Blue, REG, родамин зеленый, родамин красный, ренографин, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин и/или Техас красный.

#### 2. Терапевтические реагенты.

Создано широкое разнообразие терапевтических средств, связывающихся с антителами по настоящему изобретению. Например, радиоизотопы, которые обсуждались выше, хотя и полезны в диагностических контекстах, могут быть также использованы в качестве терапевтических средств. Химиотерапевтические средства также можно конъюгировать с антителами, и они включают цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, меклоретамин, циклофосфамид, камптотecin, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нитросурейя, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, блеомицин, пликомицин, митомицин, этопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, рецептор эстроген связывающие вещества, таксол, гемцитабин, навелбин, ингибиторы фарнезил-протеин-трансферазы, трансплатинум, 5-фторурацил, винкристин, винбластин и метотрексат.

Другой класс терапевтических средств представляет собой токсины. Предусмотрены холерный токсин, токсин ботулизма, коклюшный токсин, А и В цепи рицина, а также другие природные или синтетические токсины.

Цитокины и лимфокины представляют собой еще один класс терапевтических средств, которые могут связываться с TcR по настоящему изобретению, и включают IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, TNF $\alpha$ , GM-CSF, INF $\alpha$ , INF $\beta$  и IFN $\gamma$ .

В других вариантах осуществления противовоспалительные средства предусмотрены в качестве терапевтических средств, которые могут быть конъюгированы с антителами.

Противовоспалительные средства включают средства нестероидной противовоспалительной терапии, стероиды, рапамицин, инфликсимаб и онтек. Иммуносупрессивные средства включают FK-506 и циклоспорин А.

Агонист TLR может быть связан с антителом, например, через Fc-часть молекулы. Агонисты TLR являются соединениями, которые стимулируют или "включают" иммунную систему. Природными агонистами для TLR9 являются компоненты ДНК, которые являются общими для бактерий и вирусов. Природными агонистами для TLR 7 и 8 являются структуры РНК, обнаруживаемые в вирусах. После распо-

знавания своих природных ДНК и РНК-агонистов каждый из TLR 7, 8 и 9 инициирует каскад различных защитных иммунных реакций. Агонисты TLR включают олигодезоксинуклеотиды, фрагменты гиалуроновой кислоты, имиквимод, лавендустин С, липид А, лороксибин, LPS, монофосфориллипида А, миристицин, резиквимод, флагеллин *S. typhimurium*, НКLM, PAM3CSK4 и polyI:C.

#### IV. Нуклеиновые кислоты и экспрессия А

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела.

В одном из аспектов изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим различные фрагменты тяжелой и легкой цепи антитела, переменных и константных доменов. Сегмент нуклеиновой кислоты может быть получен из геномной ДНК, комплементарной ДНК (кДНК) или синтетической ДНК. Если желательно включение в вектор экспрессии, нуклеиновая кислота также может включать природный интрон или интрон, полученный от другого гена, а также другие некодирующие (например, регуляторные) и кодирующие области (например, линкеры). Как используется в настоящем документе, термин "кДНК" предназначен для обозначения ДНК, полученной с использованием матричной РНК (мРНК) в качестве матрицы. Преимущества использования кДНК, в отличие от геномной ДНК или ДНК полимеризуются с геномной, необработанной или частично обработанной матрицы РНК, кДНК в первую очередь содержит кодирующие последовательности соответствующего белка.

Термин "рекомбинантный" может использоваться в сочетании с полипептидом или названием конкретного полипептида и, как правило, означает полипептид, продуцируемый с молекулы нуклеиновой кислоты, на которой осуществлялись манипуляции *in vitro* или которая представляет собой реплицированный продукт такой молекулы. Рекомбинантные векторы и выделенные сегменты нуклеиновой кислоты могут различным образом включать собственно антитело-кодирующие области, несущие выбранные изменения или модификации в основной кодирующей области, или они могут кодировать более крупные полипептиды, которые включают области, отличные от областей антител.

"Нуклеиновая кислота", как используется в настоящем документе, включает одноцепочечные и двухцепочечные молекулы, а также ДНК, РНК, химически модифицированные нуклеиновые кислоты и аналоги нуклеиновых кислот. Предполагается, что нуклеиновая кислота в пределах объема настоящего изобретения может состоять из примерно 10, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90, примерно 100, примерно 110, примерно 120, примерно 130, примерно 140, примерно 150, примерно 160, примерно 170, примерно 180, примерно 190, примерно 200, примерно 210, примерно 220, примерно 230, примерно 240, примерно 250, примерно 275, примерно 300, примерно 325, примерно 350, примерно 375, примерно 400, примерно 425, примерно 450, примерно 475, примерно 500, примерно 525, примерно 550, примерно 575, примерно 600, примерно 625, примерно 650, примерно 675, примерно 700, примерно 725, примерно 750, примерно 775, примерно 800, примерно 825, примерно 850, примерно 875, примерно 900, примерно 925, примерно 950, примерно 975, примерно 1000, примерно 1100, примерно 1200, примерно 1300, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1750, примерно 2000, примерно 2250, примерно 2500 или более нуклеотидных остатков в длину.

Предполагается, что антитело может кодироваться с помощью любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует соответствующую аминокислотную последовательность, такую как последовательности в SEQ ID NO: 3, 60, 5, 8, 9, 10 (тяжелые CDR 1, 2 и 3; легкие CDR 1 и 2, 3/ЖК) и SEQ ID NO: 9 или 25, которые включают тяжелые CDR и каркасные области 1, 2 и 3, которые фланкируют вверх по течению тяжелых CDR 1, 2 и 3 соответственно, и SEQ ID NO: 24, которая включает легкие CDR и каркасные области 1, 2 и 3, которые фланкируют вверх по течению легких CDR 1, 2 и 3 соответственно. Конструирование и продукция нуклеиновых кислот, кодирующих желаемые последовательности аминокислот, хорошо известны специалистам в данной области, с использованием стандартизированных таблиц кодонов (табл. 4). В конкретных вариантах осуществления кодоны, выбранные для кодирования каждой аминокислоты, могут быть изменены для оптимизации экспрессии нуклеиновой кислоты в представляющей интерес клетке-хозяине. Термин "функционально эквивалентный кодон" используется в настоящем документе для обозначения кодонов, которые кодируют одинаковые аминокислоты, такие как шесть кодонов для аргинина или серина, а также относится к кодонам, которые кодируют биологически эквивалентные аминокислоты. Кодоновые предпочтения для различных видов клетки-хозяина хорошо известны в данной области. Кодоны, предпочтительные для использования в организме человека, хорошо известны специалистам в данной области (Wada et al., 1990). Кодоновые предпочтения для других организмов также хорошо известны специалистам в данной области (Wada et al., 1990, приведен в настоящем описании в полном объеме в качестве ссылки).

Таблица 2

Таблица кодонов			
Аминокислоты	Кодоны		
Аланин	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Цистеин	Cys	C	UGC UGU
Аспарагиновая кислота	Asp	D	GAC GAU
Глутаминовая кислота	Glu	E	GAA GAG
Фенилаланин	Phe	F	UUC UUU
Глицин	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Гистидин	His	H	CAC CAU
Изолейцин	Ile	I	AUA AUC AUU
Лизин	Lys	K	AAA AAG
Лейцин	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метионин	Met	M	AUG
Аспарагин	Asn	N	AAC AAU
Пролин	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Глутамин	Gln	Q	CAA CAG
Аргинин	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонин	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Валин	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAC UAU

#### В. Экспрессия нуклеиновых кислот.

Системы на основе прокариотов и/или эукариотов могут быть использованы для продукции последовательности нуклеиновой кислоты, или их родственных полипептидов, белков и пептидов. Настоящее изобретение относится к использованию такой экспрессионной системы для продукции антител, которые связывают PR-1/HLA-A2. Одна эффективная экспрессионная технология использует систему клеток насекомых/бакуловирусов. Система клеток насекомых/бакуловирусов может обеспечивать высокий уровень белковой экспрессии сегмента гетерологичной нуклеиновой кислоты так, как описано в патентах США 5871986 и 4879236, каждый из которых представлен в настоящем описании в качестве ссылки, и которую можно приобрести, например, под названием MAXBAC® 2.0 от INVITROGEN® и BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM от CLONTECH®.

Кроме того, существует множество других систем экспрессии, которые коммерчески и широко доступны. Одним из примеров такой системы является индуцибельная система экспрессии млекопитающих STRATAGENE®'s COMPLETE CONTROL, которая включает синтетический экдизон-индуцируемый рецептор или его систему экспрессии pET, систему экспрессии в *E.coli*. Другой пример индуцируемой системы экспрессии доступен от INVITROGEN®, которая несет систему T-REX™ (тетрациклин-регулируемая экспрессия), индуцируемая система экспрессии млекопитающих, которая использует полноразмерный промотор CMV. INVITROGEN® также предоставляет дрожжевую систему экспрессии, называемую *Pichia methanolica* Expression System, которая предназначена для высокого уровня продукции рекомбинантных белков в метилотрофных дрожжах *Pichia methanolica*. Любой специалист в данной области знает, как экспрессировать вектор, такой как экспрессионная конструкция, чтобы продуцировать последовательность нуклеиновой кислоты или родственного ей полипептида, белка или пептида.

#### 1. Вирусные векторы и доставка.

Существует ряд способов, в которых векторы экспрессии могут быть введены в клетки. Вирусы являются мощным инструментом для экспрессии белковых продуктов, кодируемых нуклеиновыми кислотами. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретения вектор экспрессии содержит вирусный или сконструированный вектор, производный от вирусного генома. Способность некоторых вирусов проникать в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, интегрироваться в геном клетки-хозяина и экспрессировать вирусные гены стабильно и эффективно сделали их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных генов в клетки млекопитающих (Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986). Первые вирусы, используемые в качестве генных векторов, представляли собой ДНК-содержащие вирусы, в том числе паповавирусы (вакуолизирующий обезьяний вирус 40, вирус бычьей папилломы и вирус полиомы) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986) и аденовирусы (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986).

Аденовирусные векторы.

Конкретный способ для доставки нуклеиновой кислоты включает использование аденовирусного вектора экспрессии. Несмотря на то что аденовирусные векторы, как известно, имеют низкий потенциал для интеграции в геномную ДНК, эта особенность уравнивается высокой эффективностью переноса генов, предоставляемой этими векторами. Под "аденовирусным вектором экспрессии" подразумеваются те конструкции, которые содержат аденовирусные последовательности, достаточные (а) для обеспечения упаковки конструкции и (b) для того, чтобы, в конечном счете, экспрессировать ткане- или клеточно-специфическую конструкцию, которая была клонирована в нем. Знание генетической организации или аденовируса, вирус с 36 т.п.н. линейной двухцепочечной ДНК, позволяет замещать крупные фрагменты ДНК аденовируса чужеродными последовательностями до 7 т.п.н. (Grunhaus and Horwitz, 1992).

Векторы AAV.

Нуклеиновую кислоту можно вводить в клетку с использованием аденовирусной ассистированной трансфекции. Повышенная эффективность трансфекции была зарегистрирована в клеточных системах с использованием аденовирус-связанных систем (Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994). Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой привлекательную векторную систему для использования в вакцинах по настоящему изобретению (Muzyczka, 1992). AAV имеет широкий круг хозяев для инфекционности (Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988). Подробности, касающиеся получения и использования векторов гAAV, описаны в патентах США 5139941 и 4797368, каждый из которых представлен в настоящем описании в качестве ссылки.

Ретровирусные векторы.

Ретровирусы подаются надежду в качестве векторов генной доставки в вакцинах из-за способности интегрировать свои гены в геном хозяина, перенося большое количество чужеродного генетического материала, заражая широкий спектр видов и типов клеток и являясь упакованными в специальных клеточных линиях (Miller, 1992).

Чтобы сконструировать ретровирусный вектор, нуклеиновая кислота (например, кодирующая представляющий интерес антиген) вставляется в вирусный геном в участок определенных вирусных последовательностей для продуцирования вируса, который является дефектным по репликации. Для продуцирования вирионов конструируется упаковочная клеточная линия, содержащая гены gag, pol и env, но без LTR и компонентов упаковки (Mann et al., 1983). Когда рекомбинантная плазмида, содержащая кДНК, вместе с ретровирусной LTR и последовательностями упаковки вводятся в специальную клеточную линию (например, при помощи преципитации в фосфате кальция), упаковочная последовательность обеспечивает упаковку РНК-транскрипта рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем секретируются в культуральную среду (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, затем собирают, при необходимости концентрируют и используют для переноса генов. Ретровирусные векторы способны инфицировать множество типов клеток. При этом интеграция и устойчивая экспрессия требуют деления клеток хозяина (Paskind et al., 1975).

Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые в дополнение к общим ретровирусным генам gag, pol и env содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Лентивирусные векторы хорошо известны в данной области (см., например, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; патенты США 6013516 и 5994136). Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1, ВИЧ-2 и обезьяньего вируса иммунодефицита: SIV. Лентивирусные векторы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например гены env, vif, vpr, vrn и nef удаляются, делая вектор биологически безопасным.

Рекомбинантные лентивирусные векторы, которые способны инфицировать неделящиеся клетки и могут быть использованы для переноса генов как *in vivo*, так и *ex vivo* и экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Например, рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделящуюся клетку, где подходящая клетка-хозяин трансфицируется двумя или более векторами, несущих функции упаковки, а именно gag, pol и env, а также rev и tat, описан в патенте США 5994136, который включен в настоящее описание в качестве ссылки. Можно нацелить рекомбинантный вирус путем связывания белка оболочки с антителом или конкретным лигандом для нацеливания на рецептор конкретного клеточного типа. Путем встраивания представляющей интерес последовательности (в том числе регуляторной области) в вирусный вектор, наряду с другим геном, который кодирует лиганд для рецептора на конкретной клетке-мишени, например, вектор теперь становится мишень-специфическим.

Другие вирусные векторы.

Другие вирусные векторы могут быть использованы в качестве вакцинных конструкций по настоящему изобретению. Векторы, полученные из вирусов, таких как вирус осповакцины (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988), вирус Синдбис, цитомегаловирус и вирус простого герпеса, могут использоваться. Они обладают рядом привлекательных особенностей для различных клеток млекопитающих (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990). Лентивирусы также были изучены в качестве вакцинных векторов (VandenDriessche et al., 2002).

Доставка с помощью модифицированных вирусов.

Доставляемые нуклеиновые кислоты могут быть размещены в инфекционном вирусе, который был сконструирован для экспрессии специфического лиганда связывания. Вирусная частица, таким образом, будет специфически связываться с родственными рецепторами клетки-мишени и доставлять содержимое к клетке. Новый подход, спланированный для обеспечения конкретного нацеливания ретровирусных векторов, был разработан на основе химической модификации ретровируса при помощи химического добавления остатка лактозы к оболочке вируса. Эта модификация может обеспечить специфическое инфицирование гепатоцитов через сиалогликопротеиновые рецепторы.

Другой подход к нацеливанию рекомбинантных ретровирусов был разработан, в котором были использованы биотинилированные антитела против ретровирусного белка оболочки и против специфического клеточного рецептора. Антитела были соединены через компоненты биотина с помощью стрептавидина (Roux et al., 1989). С помощью антител против антигенов класса I и класса II главного комплекса гистосовместимости они продемонстрировали инфицирование множества клеток человека, что несло эти поверхностные антигены с экотропным вирусом *in vitro* (Roux et al., 1989).

## 2. Невирусная доставка нуклеиновых кислот.

Подходящие невирусные способы доставки нуклеиновой кислоты для эффективной экспрессии композиции по настоящему изобретению, как полагают, включают практически любой способ, с помощью которого нуклеиновая кислота (например, ДНК) может быть введена в органеллу, клетку, ткань или организм, как описано в настоящем документе или как может быть известно любому специалисту в данной области. Такие способы включают, без ограничения, прямую доставку ДНК, например путем инъекции (патенты США 5994624, 5981274, 5945100, 5780448, 5736524, 5702932, 5656610, 5589466 и 5580859, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки), включая микроинъекцию (Harland and Weintraub, 1985; патент США 5789215, включенный в настоящее описание в качестве ссылки); путем электропорации (патент США 5384253, включенный в настоящее описание в качестве ссылки); путем преципитации фосфатом кальция (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); с использованием DEAE-декстрана с последующим полиэтиленгликолем (Gopal, 1985); путем непосредственной загрузки при сонификации (Fechheimer et al., 1987); путем липосомо-опосредованной трансфекции (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991); путем микропроекционной бомбардировки (заявки РСТ № WO 94/09699 и 95/06128; патенты США 5610042; 5322783, 5563055, 5550318, 5538877 и 5538880, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки); путем взбалтывания с карбид-кремниевыми волокнами (Kaerpler et al., 1990; патенты США 5302523 и 5464765, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки) или путем ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов (Omirulleh et al., 1993; патенты США 4684611 и 4952500, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки); при помощи высушивания/ингибирования-опосредованного поглощения ДНК (Potrykus et al., 1985). Используя эти способы, можно стабильно или временно трансформировать органеллу(ы), клетку(и), ткань(и) или организм(ы).

## V. Антитела для диагностики раковых, или гиперпластических, или диспластических нарушений

В одном из вариантов осуществления по настоящему изобретению предложены способы диагностики злокачественной опухоли, такой как лейкемия (например, AML, CML, MDS), а также миелодиспластических расстройств. Миелодисплазия (MDS) относится к группе заболеваний, при которых костный мозг не функционирует нормально и вырабатывает недостаточное количество нормальных клеток крови. MDS влияет на продуцирование любых, а иногда всех типов клеток крови, включая эритроциты, тромбоциты и белые клетки крови (цитопении). Около 50% детской миелодисплазии можно разделить на пять типов МДС: рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная анемия с избытком бластов при трансформации и хронический миеломоноцитарный лейкоз. Оставшиеся 50%, как правило, присутствуют с выделенными или объединенными цитопениями, такими как анемия, лейкопения и/или тромбоцитопения (низкое количество тромбоцитов). Несмотря на хронический характер, MDS прогрессирует, чтобы стать острым миелоидным лейкозом (AML) у 30% пациентов.

Также предусмотренными для диагностики по настоящему изобретению являются твердые опухолевые раки. Такой злокачественной опухолью является рак легкого, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почек, рак кости, рак яичка, рак шейки матки, рак двенадцатиперстной кишки, лимфомы, предопухолевые поражения в легких, рак толстой кишки, меланома и рак мочевого пузыря. Другие гиперпластические, опухолевые и диспластические заболевания, включая доброкачественные гиперпролиферативные заболевания, также находятся в сфере применения диагностических процедур, описанных в настоящем документе.

### A. Введение диагностических реагентов.

Введение диагностических реагентов хорошо известно специалистам в данной области и должно варьироваться в зависимости от диагноза, который следует достичь. Например, в случае, где предполагается дискретная опухолевая масса или массы, может применяться местное или регионарное введение

(например, в кровеносные сосуды опухоли, локальную лимфатическую систему или местные артерии или вены). Кроме того, можно предоставлять диагностические реактивы регионально или системно. Это может быть способ введения выборки, где желательна визуализация всей конечности или организма, где была определена известная специфическая опухолевая масса, или при подозрении на метастазы.

#### В. Инъекционные композиции и составы.

Одним из способов доставки лекарственных средств по настоящему изобретению является системный способ. Тем не менее, фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, можно также вводить парентерально, внутривенно, внутримышечно, внутримышечно, чрескожно или даже внутрибрюшинно, как описано в патенте США 5543158; патенте США 5641515 и патенте США 5399363 (каждый из которых конкретно включен в настоящее описание в качестве ссылки во всей его полноте).

Инъекцию лекарственных средств можно проводить с помощью шприца или любого другого способа, используемого для инъекции раствора, при условии, что средство может пройти через иглу специфического размера, необходимую для инъекции. Была описана новая безыгольная система впрыска (патент США 5846233), имеющая выпускное отверстие, определяющее камеру ампулы для подачи раствора и энергетическое устройство для подачи раствора из выпускного отверстия в участок доставки. Также была описана шприцевая система для применения в генной терапии, которая позволяет осуществлять множественные инъекции заданного количества раствора точно на любую глубину (патент США 5846225).

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и маслах. При обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Фармацевтические формы, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема (патент США 5466468, специально включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы легко вводиться через шприц. Она должна быть стабильной в условиях продуцирования и хранения и должна быть сохранена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие их смеси и/или растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабе-нов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические средства, например сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута за счет использования в композициях средств, задерживающих абсорбцию, например моностеарат алюминия и желатин.

Для парентерального введения в водном растворе, например, раствор должен быть соответствующим образом забуферен, если необходимо, и жидкий разбавитель сначала становится изотоническим при помощи достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутриопухолевого и внутрибрюшинного введения. В этой связи стерильные водные среды, которые могут использоваться, должны быть известны специалистам в данной области в свете настоящего изобретения. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и или добавить к 1000 мл гиподермолитической жидкости или вводить в предполагаемый участок инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15-е изд., с. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые различия в дозировке обязательно будут возникать в зависимости от состояния подвергаемого лечению индивидуума. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять соответствующую дозу для отдельного индивидуума. Более того, для введения человеку препараты должны соответствовать в плане стерильности, пирогенности, общей безопасности и стандартам чистоты в соответствии с требованиями Службы биологических стандартов управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

Стерильные инъекционные растворы готовят путем включения активных соединений в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, как требуется, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются способы вакуумного высушивания и лиофилизации, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильного-профильтрованного раствора этого.

Композиции, раскрытые в настоящем описании, могут быть сформулированы в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образуются со свободными аминогруппами белка) и соли, которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. После составления раствор будет вводиться в соответствии с дозированным составом и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводить в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, капсулы высвобождения лекарственного препарата и т.п.

Как используется в настоящем документе, "носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие всасывание средства, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и т.п. Использование таких сред и средств для фармацевтических активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев несовместимости какого-либо обычного носителя или средства с активным ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. Выражение "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относится к молекулярным сущностям и композициям, которые не вызывают аллергическую или подобную нежелательную реакцию при введении в организм человека. Получение водной композиции, содержащей белок в качестве активного ингредиента, хорошо известно специалистам в данной области. Как правило, такие композиции получают в качестве инъекционных либо в виде жидких растворов или суспензий; твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, также могут быть получены.

#### **VI. Терапевтические способы**

**A. Раковые и гиперпластические/диспластические/неопластические заболевания.**

Антитела по настоящему изобретению могут применяться в способах лечения гиперпластических/диспластических/неопластических заболеваний/состояний, включая злокачественные опухоли. Виды заболеваний/условий, предусмотренных для лечения пептидами по настоящему изобретению, без ограничения, включают лейкозы, такие как AML, MDS и CML, а также миелодисплазии. Другие виды злокачественных опухолей могут включать рак легких, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почек, рак кости, рак яичка, рак шейки матки, рак двенадцатиперстной кишки, лимфомы, предопухолевые поражения в легких, рак толстой кишки, меланомы, рак мочевого пузыря и другие опухолевые заболевания.

Чтобы убить клетки, ингибировать рост клеток, ингибировать метастазирование, уменьшить размер опухоли/ткани, тяжесть опухолевых клеток или иным образом изменить или уменьшить злокачественный фенотип опухолевых клеток с помощью способов и композиций по настоящему изобретению, обычно следует гиперпластическую/опухолевую/злокачественную клетку подвергнуть приведению в контакт с терапевтическим соединением, таким как полипептид, или экспрессионной конструкцией, кодирующей антитело по настоящему изобретению, как правило, диспергированным в фармацевтически приемлемом буфере или носителе (см. выше в обсуждении диагностических средств). Способы введения будут меняться, естественно, в зависимости от расположения и характера поражения и включают, например, внутрикожное, трансдермальное, парентеральное, внутривенное, внутримышечное, интраназальное, подкожное, чрескожное, интратрахеальное, внутрибрюшинное, внутриопухолевое, перфузионное, через полоскание, через непосредственную инъекцию и пероральное введение и состав. Любой из составов и способов введения, рассматриваемый относительно лечения или диагностики рака, также может использоваться в отношении неопластических заболеваний и состояний. Предусмотрены варианты осуществления *ex vivo*, где опухолевые клетки обрабатываются/транслируются вне организма пациента (либо специально, либо как часть большой популяции клеток).

Внутриопухолевая инъекция, или инъекция в сосудистое русло опухоли специально предусмотрены для дискретных, твердых, доступных опухолей. Местное, региональное или системное введение также может быть уместным. Для опухолей >4 см объем вводимого должен составлять примерно 4-10 мл, тогда как для опухоли <4 см используется объем примерно 1-3 мл. Множественные инъекции, поставляемые в виде однократной дозы, составляют по объему от примерно 0,1 до примерно 0,5 мл. Вирусные частицы могут эффективно контактировать путем введения многократных инъекций в опухоль на расстоянии примерно 1 см друг от друга.

В случае хирургического вмешательства, настоящее изобретение может применяться во время операции и/или после нее для лечения рецидивных или метастатических заболеваний. Например, в резекционное основание опухоли можно вводить или впрыскивать состав, содержащий антитело. Перфузия может быть продолжена после резекции, например, через оставленный катетер, имплантированный в участок хирургического вмешательства. Периодическое пост-хирургическое лечение также предусмотрено.

Непрерывное введение также может применяться там, где это уместно, например, когда опухоль иссекается и основание опухоли подвергается лечению для ликвидации остаточного, микроскопического заболевания. Доставка через шприц или катетер является предпочтительной. Такая непрерывная перфузия может проводиться в течение периода времени примерно 1-2 ч, примерно 2-6 ч, примерно 6-12 ч, примерно 12-24 ч, примерно 1-2 дней, примерно 1-2 недель или более после начала лечения. Как правило, доза терапевтической композиции посредством непрерывной перфузии должна быть эквивалентна дозе, получаемой при помощи одной или нескольких инъекций, скорректируемых в течение периода времени, в течение которого перфузия происходит. Далее представляется, что перфузия конечности может применяться для введения терапевтических композиций по настоящему изобретению, в частности, при лечении меланом и сарком.

Схемы лечения также могут отличаться и часто зависят от типа опухоли, локализации опухоли, прогрессирования заболевания и состояния здоровья и возраста пациента. Очевидно, что некоторые виды опухоли требуют более агрессивного лечения и в то же время некоторые пациенты не могут выдерживать более обременительные протоколы. Чтобы принимать такие решения на основе известной эффективности и токсичности (если таковая имеются) терапевтических составов, лучше всего подходит врач.

В некоторых вариантах осуществления подвергаемая лечению опухоль, по меньшей мере, первоначально может быть неоперабельной. Лечение может увеличить резектабельность опухоли из-за сжатия на границах или устранения определенных, в частности, инвазивных частей. После процедур лечения резекция может быть возможной. Дополнительные процедуры лечения после резекции позволяют устранить микроскопическое остаточное заболевание в участке опухоли.

Типичный курс лечения для первичной опухоли или после иссечения основания опухоли включает несколько доз. Лечение типичной первичной опухоли включает б-дозовое приложение через две недели. Двухнедельный режим лечения может быть повторен один, два, три, четыре, пять, шесть или более раз. Во время курса лечения необходимость завершения запланированного дозирования может быть рассмотрена.

#### В. Комбинированная терапия.

Также может оказаться полезным применение комбинированной терапии, если включено второе противоопухолевое средство. "Противораковое" средство способно оказывать отрицательное воздействие на злокачественную опухоль у индивидуума, например, путем уничтожения злокачественных клеток, индукции апоптоза в злокачественных клетках, уменьшения скорости роста злокачественных клеток, снижения частоты или количества метастазов, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, уменьшения кровоснабжения опухоли или злокачественных клеток, стимулирования иммунного ответа в отношении злокачественных клеток или опухоли, предотвращения или ингибирования прогрессирования злокачественной опухоли или увеличения продолжительности жизни индивидуума, имеющего злокачественную опухоль. Противораковые средства включают биологические средства (биотерапия), средства химиотерапии и средства лучевой терапии. В целом, эти другие композиции будут предоставлены с терапией по настоящему изобретению в объединенном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации клетки. Этот процесс может включать приведение клеток в контакт с обоими средствами(ом) в одно и то же время. Это может быть достигнуто путем приведения клетки в контакт с отдельной композицией или фармакологическим составом, который включает оба средства, или путем приведения клетки в контакт с двумя различными композициями или составами одновременно.

Альтернативно, терапия с применением антитела может предшествовать или следовать за лечением другим средством с интервалами в диапазоне от минут до недель. В вариантах осуществления, где другое средство и антитела применяются по отдельности к клетке, можно было бы, как правило, убедиться, что значительный период времени не прошел между временем каждой доставки, так, что средство и экспрессионная конструкция все еще были бы в состоянии оказывать преимущественное комбинированное воздействие на клетку. В таких случаях предполагается, что можно привести клетку в контакт с обоими средствами с интервалом приблизительно 12-24 ч друг от друга и более предпочтительно приблизительно 6-12 ч друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательным значительное продление срока лечения, при этом промежуток между соответствующими введениями составляет от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Могут быть использованы различные комбинации, например терапия с применением антитела (с или без конъюгированного терапевтического средства) представляет собой "А", а вторичная противораковая терапия представляет собой "В":

A/B/A V/A/V V/B/A A/A/V A/B/V V/A/A A/B/V/V V/A/B/V  
 V/V/B/A V/V/A/V A/A/B/V A/B/A/V A/B/B/A V/B/A/A  
 V/A/B/A V/A/A/V A/A/A/V V/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Введение терапевтических средств по настоящему изобретению пациенту должно следовать общим протоколам назначения этой конкретной вторичной терапии, с учетом токсичности, если таковая имеется, лечения антителом. Ожидается, что циклы лечения могли бы повторяться по мере необходимости.

Также предполагается, что различные стандартные терапии, а также хирургическое вмешательство могут применяться в комбинации с описанными способами лечения злокачественных опухолей.

### 1. Химиотерапия.

Терапия злокачественных опухолей также включает различные варианты комбинированной терапии на основе как химических, так и радиационных подходов лечения. Комбинированная химиотерапия включает, например, цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлорэтамин, циклофосфамид, камптотecin, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нитрозомочевину, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, блеомицин, пликомицин, митомицин, этопозид (VP 16), тамоксифен, ралоксифен, вещества, связывающиеся с рецептором эстрогена, таксол, гемцитабин, навелбин, ингибиторы фарнезил-протеинтрансферазы, трансплатинум, 5-фторурацил, винкристин, винбластин, метотрексат, темазоломид (водная форма DTIC) или любой аналог или производное вышеуказанного. Комбинирование химиотерапии с биологической терапией называется биохимиотерапией. Настоящее изобретение относится к любому химиотерапевтическому средству, которое может быть использовано или известно в данной области, для лечения или профилактики злокачественных опухолей.

### 2. Лучевая терапия.

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включать, как общеизвестно,  $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам. Также предполагаются другие формы ДНК-повреждающих факторов, такие как волны СВЧ и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, на предшественники ДНК, репликацию и репарацию ДНК и на сборку и поддержание хромосом. Дозовые диапазоны для рентгеновских лучей находятся в диапазоне от суточных доз 50-200 рентген в течение длительного времени (3-4 недели) до однократных доз от 2000 до 6000 рентген. Дозовые диапазоны для радиоизотопов широко изменяются и зависят от периода полураспада изотопа, интенсивности и типа излучения и поглощения опухолевыми клетками.

Термины "контактировавший" и "подверженный действию" применительно к клетке используются в настоящем документе для описания процесса, посредством которого терапевтическая конструкция и химиотерапевтическое или радиотерапевтическое средство доставляются в клетки-мишени или помещаются в соприкосновение с клеткой-мишенью. Для достижения уничтожения или остановки роста клетки оба средства доставляются в клетки в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки или предотвращения ее деления.

### 3. Иммунотерапия.

Иммунотерапевтические средства, как правило, основываются на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для выявления и уничтожения злокачественных клеток. Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфическое для некоторых маркеров на поверхности опухолевой клетки. Антитело само по себе может служить в качестве эффектора терапии или оно может привлекать другие клетки, чтобы фактически осуществить уничтожение клетки. Антитело также можно конъюгировать с лекарственным препаратом или токсином (химиотерапевтическим средством, радионуклидом, цепью А рибина, холерным токсином, токсином коклюша и др.), и оно служит лишь в качестве направляющего средства. Кроме того, эффектором может быть лимфоцит, несущий молекулу поверхности, которая взаимодействует непосредственно или косвенно с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки. Комбинация терапевтических средств, т.е. прямое цитотоксическое действие и ингибирование или снижение фортлина, могло бы обеспечивать терапевтический эффект при лечении злокачественных опухолей.

Иммунотерапия также может использоваться как часть комбинированной терапии. Общий подход к комбинированной терапии обсуждается ниже. В одном из аспектов иммунотерапии опухолевая клетка должна нести некий маркер, который поддается нацеливанию, т.е. не присутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в контексте настоящего изобретения. Общепринятые опухолевые маркеры включают карциноэмбриональный антиген, антиген простаты, антиген, связанный с опухолями мочевой системы, эмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, антиген Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, рецептор эстрогена, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии являются противоопухолевые эффекты с иммуностимулирующим воздействием. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, в том числе цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8, и факторы роста, такие как лиганд FLT3. Комбинирование иммуностимулирующих молекул либо в качестве белков, либо с помощью доставки генов в сочетании с опухолевым супрессором, таким как mda-7, как было показано, усиливало противоопухолевые воздействия (Ju et al., 2000).

Как обсуждалось ранее, примеры иммунотерапии, находящиеся в настоящее время в стадии исследования или используемые, представляют собой иммунные адьюванты (например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения) (патенты США 5801005; 739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998), терапию цитокинами (например, интерфероны; IL-1, GM-CSF и TNF) (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998), генную

терапию (например, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США 5830880 и 5846945) и моноклональные антитела (например, против ганглиозида GM2, против HER-2, против p185) (Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; патент США 5824311). Герцептин (трастузумаб) представляет собой химерное (мышь-человек) моноклональное антитело, которое блокирует рецептор HER2-neu. Оно обладает противоопухолевой активностью и было одобрено для применения при лечении злокачественных опухолей (Dillman, 1999). Комбинированная терапия злокачественных опухолей с герцептином и химиотерапией показала, что является более эффективной, чем индивидуальная терапия. Таким образом, предполагается, что одна или несколько противораковых терапий может применяться с терапиями опухолесвязанных HLA-рестриктированных пептидов, описанных в настоящем документе.

#### Адоптивная иммунотерапия.

В адоптивной иммунотерапии циркулирующие в крови пациента лимфоциты или противоопухолевые эффекторные лимфоциты выделяют *in vitro*, активируют при помощи лимфокинов, таких как IL-2 или трансдуцированных генами некроза опухоли, и вводят обратно (Rosenberg et al., 1988; 1989). Чтобы достичь этого, можно было бы ввести животному или пациенту-человеку иммунологически эффективное количество активированных лимфоцитов в сочетании с включающей адъювант антигенной пептидной композицией, как описано в настоящем документе. Активированные лимфоциты наиболее предпочтительно должны представлять собой собственные клетки пациента, которые ранее были выделены из крови или опухоли образца и активированы (или "их количество увеличено") *in vitro*. Эта форма иммунотерапии вызвала несколько случаев регрессии меланомы и рака почки, но процент реагирующих был небольшим по сравнению с теми, кто не реагировал.

#### Пассивная иммунотерапия.

Существует ряд различных подходов для пассивной иммунотерапии злокачественных опухолей. Они могут быть приблизительно разделены на следующие категории: инъекция антител самих по себе; инъекция антител, соединенных с токсинами или химиотерапевтическими средствами; инъекция антител, соединенных с радиоактивными изотопами; инъекция антиидиотипических антител и, наконец, очистка опухолевых клеток в костном мозге.

Предпочтительно человеческие моноклональные антитела используются в пассивной иммунотерапии, поскольку они вызывают мало или совсем не вызывают побочных эффектов у пациента. Однако их применение несколько ограничено дороговизной и до сих пор осуществлялось только внутриопухолево. Человеческие моноклональные антитела к антигенам ганглиозидов использовались внутриопухолево у пациентов, страдающих от кожной рецидивирующей меланомы (Irie & Morton, 1986). Регрессия была отмечена у шести из десяти пациентов после ежедневных или еженедельных внутриопухолевых инъекций. В другом исследовании умеренный успех был достигнут от внутриопухолевых инъекций двумя человеческими моноклональными антителами (Irie et al., 1989). Возможные терапевтические антитела включают анти-TNF, анти-CD25, анти-CD3, анти-CD20, CTLA-4-IG и анти-CD28.

Может быть благоприятным вводить более чем одно моноклональное антитело, направленное против двух различных антигенов, или даже антитела с множественной антигенной специфичностью. Протоколы лечения также могут включать введение лимфокинов или других иммунных энхансеров, как описано Vajorin et al. (1988). Разработка человеческих моноклональных антител описывается далее более подробно.

#### 4. Генная терапия.

В еще одном варианте осуществления изобретения вторичное лечение является генной терапией, при которой терапевтический полинуклеотид вводят до, после или одновременно с введением опухолю-ассоциированного HLA-рестриктированного пептида.

Доставка вектора, кодирующего опухолю-ассоциированный HLA-рестриктированный пептид в сочетании со вторым вектором, кодирующим один из следующих генных продуктов, будет иметь комбинированный антигиперпролиферативный эффект на ткани-мишени. Кроме того, можно использовать единый вектор, кодирующий оба гена. Разнообразие белков охватывается изобретением, некоторые из которых описаны ниже. Различные гены, которые могут быть мишенью для генной терапии некоторого вида в сочетании с настоящим изобретением, должны быть известны специалистам в данной области и могут включать любой ген, имеющий отношение к злокачественным опухолям.

#### Индукторы клеточной пролиферации.

Белки, которые индуцируют клеточную пролиферацию, далее разделены по категориям в зависимости от функции. Общим для всех этих белков является способность регулировать клеточную пролиферацию. Например, форма PDGF, онкоген *sis* представляет собой секретлируемый фактор роста. Онкогены редко возникают из генов, кодирующих факторы роста, и в настоящее время *sis* является единственным известным природным онкогенным фактором роста. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предполагается, что антисмысловая мРНК, направленная на конкретный индуктор клеточной пролиферации, используется для предотвращения экспрессии индуктора клеточной пролиферации.

Белки FMS, ErbA, ErbB и neu являются рецепторами факторов роста. Мутации в этих рецепторах приводят в результате к потере регуляторной функции. Например, точечная мутация, влияющая на трансмембранный домен рецепторного белка neu, приводит в результате к онкогену neu. Онкоген ErbA

является производным внутриклеточных рецепторов для гормона щитовидной железы. Модифицированный онкогенный рецептор ErbA, как полагают, может конкурировать с эндогенным рецептором гормона щитовидной железы, вызывая неконтролируемый рост.

Крупнейший класс онкогенов включает сигнал-передающие белки (например, Src, Abl и Ras). Белок Src представляет собой цитоплазматическую тирозиновую протеинкиназу, и его превращение из протоонкогена в онкоген в некоторых случаях происходит в результате мутации по тирозиновому остатку 527. В отличие от этого трансформация ГТФазного белка Ras из протоонкогена в онкоген в одном примере происходит в результате мутантной замены валина на глицин в положении 12 аминокислотной последовательности, уменьшая активность ГТФазы Ras. Белки Jun, Fos и Myc представляют собой белки, которые непосредственно оказывают свое действие на ядерные функции как факторы транскрипции.

Ингибиторы клеточной пролиферации.

Опухоль-супрессорные онкогены действуют для подавления избыточной клеточной пролиферации. Инактивация этих генов нарушает их ингибирующую активность, что приводит к неконтролируемой пролиферации. Наиболее распространенными опухолевыми супрессорами являются Rb, p53, p21 и p16. Другие гены, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, *zac1*, p73, VHL, C-CAM, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, *rsk-3*, p27, слияния p27/p16 и слияния p21/p27.

Регуляторы программируемой клеточной смерти.

Апоптоз, или запрограммированная смерть клетки, представляет собой важный процесс для нормального эмбрионального развития, поддержания гомеостаза во взрослых тканях и подавления канцерогенеза (Kerr et al., 1972). Семейство белков Bcl-2 и ICE-подобные протеазы, как было подтверждено, являются важными регуляторами и эффекторами апоптоза в других системах. Белок Bcl-2, открытый в связи с фолликулярной лимфомой, играет заметную роль в контроле апоптоза и повышении клеточной выживаемости в ответ на разнообразные апоптотические стимулы (Bakhshi et al., 1985; Cleary and Sklar, 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto and Croce, 1986). Эволюционно консервативный белок Bcl-2, как теперь признается, является членом семейства родственных белков, которые могут быть классифицированы как агонисты смерти или антагонисты смерти.

После открытия Bcl-2 было показано, что его действие состоит в подавлении клеточной гибели, вызванной различными сигналами возбуждения. Кроме того, также сейчас является очевидным, что существует семейство регуляторных белков клеточной гибели Bcl-2, которые разделяют общие структурные гомологии и гомологии последовательностей. Эти различные члены семейства, как было показано, либо обладают сходными с Bcl-2 функциями (например, Bcl<sub>XL</sub>, Bcl<sub>w</sub>, Bcl<sub>s</sub>, Mcl-1, A1, Bfl-1), либо препятствуют функции Bcl-2 и способствуют клеточной гибели (например, Bax, Bak, Bik, Vim, Bid, Bad, Hrakiti).

5. Хирургия.

Примерно 60% людей, имеющих злокачественную опухоль, подвергаются какому-либо типу хирургического вмешательства, которое включает профилактические, диагностические или промежуточные, лечебные и паллиативные операции. Лечебная хирургия представляет собой способ лечения злокачественных опухолей, который может быть использован в сочетании с другими видами терапии, например, при лечении по настоящему изобретению, химиотерапии, лучевой терапии, гормональной терапии, генной терапии, иммунотерапии и/или альтернативных способов лечения.

Лечебная хирургия включает резекцию, при которой все или часть злокачественных тканей физически удаляют, иссекают и/или уничтожают. Резекция опухоли означает физическое удаление по меньшей мере части опухоли. В дополнение к резекции опухоли, лечение при помощи хирургического вмешательства включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и микроскопически контролируруемую хирургию (хирургия Мооса). Далее представляется, что настоящее изобретение может использоваться в сочетании с удалением поверхностных злокачественных опухолей, предопухолевых состояний или случайных количеств нормальной ткани.

После иссечения части от всех злокачественных клеток, ткани или опухоли в организме может формироваться полость. Лечение может выполняться путем перфузии, прямой инъекцией или локального нанесения на область с дополнительной противораковой терапией. Такое лечение можно повторять, например, раз в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти процедуры также могут быть с различными дозировками.

С. Аутоиммунные заболевания.

Настоящее изобретение также относится к лечению аутоиммунного заболевания с помощью антител по настоящему изобретению. PR1 является производным от миелоидных внутренних белков. Протеиназа 3 (Pr3), которая содержит PR1, является мишенью аутоиммунной атаки при гранулематозе Вегенера. Миелопероксидаза (MPO) представляет собой антиген-мишень при васкулите небольших сосудов (Franssen et al., 1996; Brouwer et al., 1994; Molldrem et al., 1996), с признаками как Т-клеточного, так и антитело-обусловленного иммунитета у пациентов с этими заболеваниями. Гранулематоз Вегенера связан с продуцированием цитоплазматических антинейтрофильных цитоплазматических антител (cANCA) со специфичностью к Pr3 (Molldrem et al., 1997), в то время как микроскопическая ангиопатия и синдром

Чарг-Стросса связаны с перинуклеарной ANCA (pANCA) со специфичностью к MPO (Moldrem et al., 1999; Savage et al., 1999). Как таковое, ингибирование распознавания PR1 иммунными клетками может оказывать терапевтический эффект на аутоиммунное заболевание.

Таким образом, антитела по настоящему изобретению вводят индивидуумам, страдающим аутоиммунным заболеванием, чтобы нейтрализовать действие других аутоантител (например, pANCA против протеиназы 3). Альтернативно, антитело проектируют так, чтобы оно являлось "биспецифическим", т.е. обладало иммунологической специфичностью к двум антигенам, где один представляет собой PR1/HLA-A2, а другой - поверхностные антигены дендритных клеток наподобие DEC-205, LOX-1, RAGE, тем самым блокируя функцию дендритных клеток в представлении антигена.

#### 1. Васкулит.

Васкулит представляет собой процесс, вызванный воспалением стенок кровеносных сосудов, и приводит к различным расстройствам. Принятая система классификации васкулитов отсутствует, несмотря на то, что они могут быть классифицированы по размеру или типу участвующих кровеносных сосудов как васкулит крупных, средних или малых кровеносных сосудов. Васкулит малых кровеносных сосудов определяется как васкулит, который поражает сосуды, меньшие чем артерии (т.е. артериолы, вены и капилляры); при этом васкулит малых кровеносных сосудов также может включать артерии средних размеров. Васкулит, связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), является наиболее распространенной причиной васкулита малых кровеносных сосудов и включает микроскопическую ангиопатию, гранулематоз Вегенера, синдром Чарга-Стросса и некоторые виды лекарственного васкулита.

#### Гранулематоз Вегенера.

Гранулематоз Вегенера представляет собой редкое заболевание, которое вызывает воспаление кровеносных сосудов в верхних дыхательных путях (нос, пазухи, уши), легких и почках. Многие другие области организма также могут быть затронуты, с артритом (воспаление суставов), имеющим место почти в половине всех случаев. Глаза и кожа также могут быть затронуты. Причина неизвестна, но гранулематоз Вегенера считается аутоиммунным заболеванием и часто классифицируется как одно из ревматических заболеваний. Деструктивные поражения развиваются в верхних и нижних дыхательных путях и почках. В почках эти поражения вызывают гломерулонефрит, который может привести к гематурии (кровь в моче) и почечной недостаточности. Это происходит чаще всего в возрасте от 30 до 50, и мужчины поражаются в два раза чаще, чем женщины. Он редко встречается у детей, но наблюдается у младенцев в возрасте 3 месяцев. Заболевание почек может быстро прогрессировать, с почечной недостаточностью, имеющей место в течение нескольких месяцев после первоначального диагноза. При отсутствии лечения почечная недостаточность и смерть происходят более чем у 90% всех пациентов с гранулематозом Вегенера.

Ранние симптомы могут включать усталость, недомогание, озноб, ощущение дискомфорта в области вокруг носа и пазух. Инфекции верхних дыхательных путей, такие как синусит или ушные инфекции, часто предшествуют диагнозу гранулематоз Вегенера. Другие симптомы верхних дыхательных путей включают кровотечения из носа, боли и болячки вокруг отверстия носа. Затяжная лихорадка без очевидной причины (лихорадка неизвестного происхождения - FUO) может являться начальным симптомом. Ночная потливость может сопутствовать лихорадке. Потеря аппетита и потеря веса являются общими. Поражения кожи встречаются часто, однако нет ни одного признака поражения, связанного с болезнью. Заболевание почек является необходимым, чтобы поставить окончательный диагноз - гранулематоз Вегенера. Моча может быть с кровью, что зачастую сначала появляется как красная или дымчатая моча. Может не быть никаких симптомов, но это легко диагностируется с помощью лабораторных исследований. Проблемы с глазами развиваются у значительного числа пациентов и могут варьировать от легкого конъюнктивита до серьезного воспаления глазного яблока и тканей вокруг глазного яблока. Дополнительные симптомы включают слабость, потерю аппетита, потерю веса, кровянистые выделения из носа, боль за пазухой, синусит, поражения внутри и вокруг отверстия носа, кашель, кровохарканье, кровавую мокроту, одышку, свистящее дыхание, боль в груди, кровь в моче, сыпь и боли в суставах.

Диагноз поставлен по отобранной биопсии патологических тканей, которая может включать биопсию открытых легких, биопсию верхних дыхательных путей, биопсию слизистой оболочки носа, бронхоскопию с транстрахеальной биопсией, биопсию почки, анализ мочи, рентген грудной клетки, аспирация костного мозга, анализ крови (на аутоантитела). Лечение включает кортикостероиды, циклофосфамид, метотрексат или азатиоприн, что может привести к длительной ремиссии более чем у 90% пострадавших.

#### Синдром Чарга-Стросса.

Синдром Чарга-Стросса (CSS), также известный как аллергический гранулематоз, представляет собой форму системного васкулита. CSS сходен с узелковым полиартериитом, однако обилие эозинофилов отличает это заболевание. Большинство CSS-пациентов представляет собой пациентов среднего возраста на фоне возникшей астмы или астмы с увеличивающейся тяжестью - астмы, являющейся одной из кардинальных особенностей CSS. Симптомы астмы могут начать проявляться задолго до наступления васкулита. Другие ранние симптомы включают полипы носа и аллергический ринит. Заболевание часто пе-

реходит в эозинофилию с числом, достигающим 60%. Следующая стадия заболевания представляет собой выраженный васкулит, который может включать кожу, легкие, нервы, почки и другие органы. Вовлечение периферических нервов может быть особенно изнурительным и включает боль, онемение или покалывание в конечностях (нейропатический/мононевритный мультиплекс). До появления терапии CSS часто представляло собой смертельное заболевание. Большинство пациентов умирали от безудержного, неконтролируемого заболевания.

Причина CSS не известна, но оно напоминает многофакторное. Несмотря на то что генетический фактор может присутствовать, только в очень редких случаях можно наблюдать CSS у двух членов одной семьи. Таким образом, факторы окружающей среды и инфекции имеют больше шансов являться причиной, однако окончательные доказательства этого отсутствуют. Диагноз осуществляется по определенному сочетанию симптомов и признаков, структуре вовлечения органов и по присутствию некоторых патологических анализов крови (эозинофилия, в частности). Помимо подробного анамнеза и физического обследования, анализы крови, рентген грудной клетки и другие типы отображающих исследований, тесты нервной проводимости и биопсия тканей (легких, кожи или нервных) могут быть выполнены для помощи в диагностике. Для того чтобы быть классифицированным в качестве CSS-пациента, пациент должен соответствовать по меньшей мере 4 из 6 следующих критериев: 1) астма; 2) эозинофилия [ $>10\%$  по дифференциальному подсчету лейкоцитов]; 3) мононейропатия; 4) преходящие легочные инфильтраты на рентгенограмме грудной клетки; 5) аномалии придаточных пазух носа; 6) биопсия, содержащая кровеносные сосуды с экстравазальными эозинофилами.

CSS обычно реагирует на преднизон. Изначально применяют высокие дозы перорального преднизона, однако после первого месяца или около того высокая доза преднизона постепенно уменьшается в течение последующих месяцев. Другие иммуносупрессивные препараты, такие как азатиоприн, селлсепт, метотрексат или циклофосфамид можно применять в дополнение к преднизону. Высокие дозы внутривенных стероидов могут быть эффективными для пациентов с тяжелой формой заболевания или для тех, кто не реагирует на другие виды лечения. При правильной терапии симптомы начинают быстро ослабевать с постепенным улучшением сердечной и почечной функции, а также с ослаблением боли, что является результатом вовлечения периферических нервов. Терапия может длиться от 1 года до 2 лет, в зависимости от реакции больного и продолжительности заболевания.

## 2. Болезнь Крона.

Симптомы болезни Крона включают воспаление кишечника и развитие кишечных стенозов и свищей; невропатия нередко сопровождает эти симптомы. Обычно назначают противовоспалительные препараты, такие как 5-аминосалицилаты (например, месаламин) или кортикостероиды, но они не всегда бывают эффективны (обзор в В.А. Botoman et al., 1998). Иммуносупрессия циклоспорином иногда является полезной для пациентов, резистентных к или непереносящих кортикостероиды (Brynskov et al., 1989).

Тем не менее, хирургическая коррекция в конечном итоге требуется у 90% пациентов; 50% подвергаются резекции толстой кишки (Leiper et al., 1998; Makowiec et al., 1998). Частота рецидивов после операции высокая, составляет 50%, что требует хирургического вмешательства в течение 5 лет (Leiper et al., 1998; Besnard et al., 1998).

Одна из гипотез этиологии болезни Крона состоит в том, что несостоятельность кишечного барьера слизистой оболочки, возможно, в результате генетической чувствительности и экологических факторов (например, курение), подвергает иммунную систему действию антигенов из просвета кишечника, в том числе бактериальных и пищевых антигенов (например, Soderholm et al., 1999; Hollander et al., 1986; Hollander, 1992). Другая гипотеза заключается в том, что постоянные кишечные инфекции патогенными микроорганизмами, такими как *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, патологическая *Escherichia coli* или парамиксовирус, стимулируют иммунный ответ; или, альтернативно, симптомы являются результатом нарушения регуляции иммунного ответа на вездесущие антигены, такие как нормальная кишечная микрофлора, метаболиты и токсины, которые она производит (Sartor, 1997). Было установлено наличие антител IgA и IgG (ASCA) против *Saccharomyces cerevisiae* в сыворотке крови, что является в высокой степени диагностическим признаком болезни Крона у детей (Ruemmele et al., 1998; Hoffenberg et al., 1999).

При болезни Крона нарушение регуляции иммунного ответа свидетельствует о клеточно-обусловленной иммунопатологии (Murch, 1998). Однако иммуносупрессивные препараты, такие как циклоспорин, такролимус и месаламин, были использованы для лечения кортикостероид-резистентных случаев болезни Крона с переменным успехом (Brynskov et al., 1989; Fellerman et al., 1998).

В последних усилиях для разработки диагностических и лечебных средств против болезни Крона был сделан акцент на центральную роль цитокинов (Schreiber, 1998; van Hogezaand & Verspaget, 1998). Цитокины представляют собой небольшие секретлируемые белки или факторы (от 5 до 20 кДа), которые оказывают специфическое воздействие на межклеточные взаимодействия, межклеточные связи или поведение других клеток. Цитокины вырабатываются лимфоцитами, особенно лимфоцитами  $T_H1$  и  $T_H2$ , моноцитами, макрофагами кишечника, гранулоцитами, эпителиальными клетками и фибробластами (обзор в Rogler & Andus, 1998; Galley & Webster, 1996). Некоторые цитокины являются про-

воспалительными (например, TNF- $\alpha$ , IL-1 ( $\alpha$  и  $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-12 или ингибирующий фактор лейкоза (LIF)); другие являются противовоспалительными (например, антагонист рецептора IL-1, IL-4, IL-10, IL-11 и TGF- $\beta$ ). Тем не менее, могут происходить перекрытие и функциональная избыточность их эффектов при некоторых воспалительных заболеваниях.

В активных случаях болезни Крона повышенные концентрации TNF- $\alpha$  и IL-6 секретируются в кровоток, и TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 и IL-8 производятся в избытке местно клетками слизистой (Funakoshi et al., 1998). Эти цитокины могут оказывать широкие воздействия на физиологические системы, включая развитие костей, кроветворение и печень, щитовидную железу и нервно-психическую функцию. Кроме того, у пациентов с болезнью Крона наблюдается дисбаланс соотношения IL-1 $\beta$ /IL-1ra в пользу провоспалительного IL-1 $\beta$  (Rogler & Andus, 1998; Saiki et al., 1998; Dionne et al., 1998; однако см. S. Kuboyama, 1998). Одно из исследований показало, что цитокиновые профили в образцах стула могут быть эффективным диагностическим инструментом для лечения болезни Крона (Saiki et al., 1998).

Способы лечения, которые были предложены для болезни Крона, включают использование различных антагонистов цитокинов (например, IL-1ra), ингибиторов (например, IL-1 $\beta$ -превращающий фермент и антиоксиданты) и антител против цитокинов (Rogler и Andus, 1998; van Hogezaand & Verspaget, 1998; Reimund et al., 1998; H. Luger et al., 1998; McAlindon et al., 1998). В частности, была попытка использования моноклональных антител против TNF- $\alpha$  с некоторым успехом при лечении болезни Крона (Targan et al., 1997; Stack et al., 1997; van Dullemen et al., 1995). Эти соединения могут быть использованы в комбинированной терапии с соединениями по настоящему изобретению.

Другой подход к лечению болезни Крона был сфокусирован, по меньшей мере, на частичной ликвидации бактериального сообщества, что может представлять собой запуск воспалительной реакции и замену его непатогенным сообществом. Например, в патенте США 5599795 описан способ профилактики и лечения болезни Крона у пациентов-людей. Этот способ был направлен на стерилизацию кишечника по меньшей мере одним антибиотиком и по меньшей мере одним противогрибковым средством, чтобы убить существующую флору и заменить ее другими, отобранными, хорошо охарактеризованными бактериями, взятыми от нормальных людей. Vorody сообщил способ лечения болезни Крона путем, по меньшей мере, частичного удаления существующей микрофлоры кишечника промыванием и заменой новым бактериальным сообществом, введенным при помощи фекального инокулята от скринированного на заболевание человека-донора или при помощи композиции, содержащей виды *Bacteroides* и *Escherichia coli* (патент США 5443826). Однако не известна никакая-либо причина болезни Крона, на которую могли бы быть направлены диагностика и/или лечение.

### 3. Ревматоидный артрит.

Точная этиология ревматоидного артрита (РА) остается неизвестной, однако понятно, что он имеет аутоиммунные аспекты. Первые признаки заболевания суставов появляются в синовиальном покрывающем слое, с пролиферацией синовиальных фибробластов и их прикреплением к суставной поверхности на границе сустава (Lipsky, 1998). Впоследствии макрофаги, Т-клетки и другие воспалительные клетки рекрутируются в сустав, где они производят ряд медиаторов, включая цитокины интерлейкин-1 (IL-1), который способствует хроническим осложнениям, ведущим к костной и хрящевой деструкции, и фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), который играет роль в воспалении (Dinarello, 1998; Burger & Dayer, 1995; van den Berg, 2001). Концентрация IL-1 в плазме крови значительно выше у пациентов с РА, чем у здоровых лиц, и, в частности, в плазме уровни IL-1 коррелируют с интенсивностью заболевания РА (Eastgate et al., 1988). Кроме того, в синовиальной жидкости уровни IL-1 коррелировали с различными рентгенологическими и гистологическими характеристиками РА (Kahle et al., 1992; Rooney et al., 1990).

В нормальных суставах действие этих и других провоспалительных цитокинов уравновешивается различными противовоспалительными цитокинами и регуляторными факторами (Burger & Dayer, 1995). Значимость этого цитокинового баланса показана для несовершеннолетних РА-пациентов, которые имеют циклические усиления лихорадки в течение дня (Prieg et al., 1987). После каждого пика лихорадки фактор, который блокирует действие IL-1, обнаруживается в сыворотке крови и моче. Этот фактор был выделен, клонирован и определен в качестве антагониста рецептора IL-1 (IL-1ra), член генного семейства IL-1 (Hannum et al., 1990). IL-1ra, как следует из названия, является природным рецепторным антагонистом, который конкурирует с IL-1 за связывание с рецепторами IL-1 I типа и, как следствие, блокирует действие IL-1 (Arend et al., 1998). 10-100-кратный избыток IL-1ra может быть необходим для эффективного блокирования IL-1; однако синовиальные клетки, выделенные из пациентов с РА, по-видимому, не производят достаточно IL-1ra, чтобы противодействовать эффектам IL-1 (Firestein et al., 1994; Fujikawa et al., 1995).

### 4. Системная красная волчанка.

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой аутоиммунное ревматическое заболевание, характеризующееся отложением в тканях аутоантител и иммунных комплексов, ведущих к тканевой травме (Kotzin, 1996). В отличие от аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и сахарный диабет I типа, СКВ потенциально охватывает несколько систем органов непосредственно, и ее клинические проявления разнообразны и непостоянны (обзор Kotzin & O'Dell, 1995). Например, некоторые

пациенты могут продемонстрировать, прежде всего, кожную сыпь и боли в суставах, показать спонтанные ремиссии и практически не требуют лекарства. На другом конце спектра находятся пациенты, которые демонстрируют тяжелое и прогрессирующее поражение почек, которое требует терапии высокими дозами стероидов и цитотоксическими препаратами, такими как циклофосфамид (Kotzin, 1996).

Серологический признак СКВ и доступный первичный диагностический тест представляют собой повышенные сывороточные уровни IgG-антител к составляющим клеточного ядра, таким как двухцепочечная ДНК (dsDNA), одноцепочечная ДНК (ss-ДНК) и хроматин. Среди этих аутоантител IgG-антитела против dsDNA играют важную роль в развитии волчаночного гломерулонефрита (GN) (Hahn & Tsao, 1993; Ohnishi et al., 1994). Гломерулонефрит представляет собой тяжелое состояние, при котором стенки капилляров почечных клубочков, очищающих кровь, становятся толще из-за наслоений на эпителиальной стороне клубочковых базальных мембран. Болезнь часто является хронической и прогрессирующей и может привести в итоге к почечной недостаточности.

Механизмы, с помощью которых аутоантитела индуцируются при этих аутоиммунных заболеваниях, остаются неясными. Поскольку не известны причины СКВ, к которым могли бы быть направлены диагностика и/или лечение, лечение направлено на подавление иммунных реакций, например, при помощи макролидных антибиотиков, а не на основную причину (см., например, патент США 4843092).

#### 5. Ювенильный ревматоидный артрит.

Ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА) - термин для наиболее распространенной формы артрита у детей, применяется для семейных болезней, характеризующихся хроническим воспалением и гипертрофией синовиальной оболочки. Термин перекрывается, но не полностью синонимичен с семейством болезней, называемых ювенильным хроническим артритом и/или ювенильным идиопатическим артритом в Европе.

Sarvis (1998) и другие (Arend, 2001) предположили, что патогенез ревматических заболеваний у взрослых и детей включает сложные взаимодействия между врожденным и адаптивным иммунитетом. Эта сложность лежит в основе трудности объяснения патогенеза заболевания.

Системы как врожденного, так и адаптивного иммунитета используют несколько типов клеток, широкий спектр белков клеточной поверхности и секретируемых белков и взаимосвязанные системы положительной и отрицательной обратной связи (Lo et al., 1999). Кроме того, хотя и отделимы мысленно, "врожденная" и "адаптивная" ветви иммунной системы функционально пересекаются (Fearon & Locksley, 1996), и патологические события, происходящие в этих точках пересечения, вероятно, являются весьма актуальными для понимания авторами изобретения патогенеза взрослых и детских форм хронического артрита (Warrington et al., 2001).

Полиартикулярный ЮРА представляет собой отдельный клинический подтип, характеризующийся воспалением и синовиальной пролиферацией в нескольких суставах (четыре или больше), в том числе в мелких суставах кистей (Jarvis, 2002). Этот подтип ЮРА может быть тяжелым как из-за вовлечения нескольких суставов, так и из-за способности быстро прогрессировать с течением времени. Несмотря на клиническую отчетливость, полиартикулярный ЮРА не является однородным, и пациенты различаются проявлениями заболевания, возрастом начала болезни, прогнозом и терапевтическим ответом. Эти различия весьма вероятно отражают спектр изменчивости в природе иммунной и воспалительной атаки, которые могут возникать при данном заболевании (Jarvis, 1998).

#### 6. Синдром Шегрена.

Первичный синдром Шегрена (SS) представляет собой хроническое, медленно прогрессирующее, системное аутоиммунное заболевание, поражающее преимущественно женщин среднего возраста (соотношение женщин и мужчин составляет 9:1), хотя его можно увидеть во всех возрастах, в том числе у детей (Jonsson et al., 2002). Он характеризуется лимфоцитарной инфильтрацией и деструкцией экзокринных желез, которые инфильтруются мононуклеарными клетками, включая CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоциты и В-клетки (Jonsson et al., 2002). Кроме того, экстрагландулярные (системные) проявления наблюдаются у одной трети пациентов (Jonsson et al., 2001).

Гландулярная лимфоцитарная инфильтрация является прогрессивной особенностью (Jonsson et al., 1993), которая при распространении может восстановить большую часть органов. Интересно, что glandулярные инфильтраты у некоторых пациентов напоминают эктопические лимфоидные микроструктуры в слюнных железах (обозначенные как эктопические зародышевые центры (GC)) (Salomonsson et al., 2002; Xanthou & Polihronis, 2001). При SS эктопические GC определяются как Т- и В-клеточные агрегаты пролиферирующих клеток с сетью фолликулярных дендритных клеток и активированных эндотелиальных клеток. Эти GC-подобные структуры, образованные в ткани-мишени, также изображают функциональные свойства с продуцированием аутоантител (анти-Ro/SSA и анти-La/SSB) (Salomonsson & Jonsson, 2003).

В других системных аутоиммунных заболеваниях, таких как РА, факторов, критических для эктопических GC, выявлено не было. Ревматоидные синовиальные ткани с GC, как было показано, продуцируют хемокины CXCL13, CCL21 и лимфотоксин (LT)-β (детектируется на фолликулярном центре и В-клетках зоны мантии). Многофакторный регрессионный анализ этих анализов выявил CXCL13 и LT-β

в качестве солитарных цитокинов, прогнозирующих GC при ревматоидном синовите (Weyand & Goronzy, 2003). Недавно было показано, что CXCL13 и CXCR5 в слюнных железах играют важную роль в воспалительном процессе путем привлечения В- и Т-клеток, тем самым способствуя лимфоидному неогенезу и формированию эктопических GC при SS (Salomonsson & Larsson, 2002).

#### 7. Псориаз.

Псориаз представляет собой хроническое кожное заболевание с масштабированием и воспалением, которое затрагивает от 2 до 2,6% населения Соединенных Штатов Америки, или от 5,8 до 7,5 млн человек. Хотя заболевание встречается во всех возрастных группах, оно в первую очередь влияет на взрослых. Оно появляется примерно поровну у мужчин и женщин. Псориаз возникает, когда клетки кожи быстро поднимаются от их источника ниже поверхности кожи и накапливаются на поверхности, прежде чем они имеют шанс созреть. Обычно такое движение (также называемый оборот) занимает около месяца, но при псориазе это может произойти в течение всего нескольких дней. В своей типичной форме псориаз приводит в результате к пятнам толстой, красной (воспаленной) кожи, покрытой серебристыми чешуйками. Эти пятна, которые иногда называют бляшки, как правило, зудят или чувствительны к боли. Они чаще всего появляются на локтях, коленях, на других частях ног, волосистой части головы, нижней части спины, лица, ладоней и подошв ног, но они могут возникать на коже на любом участке тела. Эта болезнь может поражать ногти на руках, ногти на ногах и мягкие ткани половых органов и полости рта. Несмотря на то что для кожи вокруг пораженных суставов не является необычным растрескивание, приблизительно 1 млн человек с псориазом испытывают воспаление суставов, которое вызывает симптомы артрита. Это состояние называется псориазический артрит.

Псориаз представляет заболевание кожи, управляемое иммунной системой, особенно с участием Т-клеток. При псориазе Т-клетки вводятся в действие по ошибке и становятся настолько активными, что они вызывают другие иммунные реакции, которые приводят к воспалению и быстрому обороту клеток кожи. Примерно в одной трети случаев существует семейный анамнез псориаза. Исследователи изучили большое количество семей, пострадавших от псориаза, и выявили гены, связанные с болезнью. Люди с псориазом могут замечать, что временами их кожа то ухудшается, то улучшается. Условия, которые могут вызвать воспаления, включают инфекции, стрессы, изменения климата, которые сушат кожу. Кроме того, некоторые лекарственные средства, в том числе литий и бета-блокаторы, которые предписаны при высоком кровяном давлении, могут спровоцировать вспышку или усугубить болезнь.

#### 8. Рассеянный склероз.

Рассеянный (множественный) склероз (РС) продолжает оставаться серьезной проблемой здравоохранения, которая поражает сотни тысяч каждый год только в США и миллионы по всему миру. Это одно из наиболее распространенных заболеваний центральной нервной системы (головного и спинного мозга). РС представляет собой воспалительное заболевание, связанное с демиелинизацией, или потерей миелина. Миелин, жирное вещество, которое изолирует нервы, действует как изолятор, давая возможность нервам передавать импульсы от одной точки к другой. При РС потеря миелина сопровождается нарушением способности нервов проводить электрические импульсы от головного мозга, и это порождает различные симптомы РС, такие как нарушения зрения, потеря координации, силы, чувствительности, речи и глотания, мочеиспускания, половой жизни и когнитивной функции. Бляшки или поражения, где миелин утрачен, появляются как загрубевшие, рубцеобразные области. Эти рубцы появляются в разное время и в различных участках головного и спинного мозга, отсюда и термин "множественный" склероз, буквально означающий множество шрамов.

В настоящее время нет ни одного лабораторного теста, симптома или физического обнаружения, которые предоставляют окончательный диагноз РС. Ситуация осложняется тем, что симптомы РС можно легко спутать с множеством других заболеваний, таких как острый рассеянный энцефаломиелит, болезнь Лайма, ВИЧ-связанная миелопатия, HTLV-I-связанная миелопатия, нейросифилис, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, системная красная волчанка, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, болезнь Бехчета, саркоидоз, паранеопластические синдромы, подострая комбинированная дегенерация мозга, подострая миелооптическая нейропатия, аденомиелоневропатия, спиноцеребеллярные синдромы, наследственный спастический парапарез/первичный боковой склероз, инсульты, опухоли, артериовенозные мальформации, арахноидальные кисты, мальформации Арнольда-Киари и шейный спондилез. Следовательно, диагноз РС должен быть поставлен при помощи процесса, который демонстрирует результаты в соответствии с РС, а также исключает другие причины.

Как правило, диагноз РС опирается на два критерия. Во-первых, при этом должно быть два приступа, по меньшей мере, с перерывом в один месяц. Приступ, также известный как обострение, вспышка или рецидив, представляет собой внезапное появление или ухудшение симптома или симптомов РС, который длится не менее 24 ч. Во-вторых, должна существовать более чем одна область повреждения миелиновой оболочки центральной нервной системы. Повреждение оболочки должно иметь место более чем в один момент времени, а не было вызвано какой-либо другой болезнью, которая может приводить к демиелинизации или аналогичным неврологическим симптомам. МРТ (магнитно-резонансная томография) в настоящее время является предпочтительным способом визуализации мозга, чтобы проводить детекцию наличия бляшек или рубцевания, вызванного РС.

При этом диагноз РС не может быть сделан только на основании данных МРТ. Другие заболевания могут привести к сопоставимым поражениям в мозге, которые напоминают те, которые вызваны РС. Кроме того, поражения головного мозга, выявленные с помощью МРТ, могут быть довольно разнородными у разных пациентов, даже напоминающие у некоторых опухоли мозга или спинного мозга. Кроме того, нормальный МРТ-скан не исключает диагноза РС, поскольку небольшое число пациентов с подтвержденным РС при МРТ не показывают каких-либо повреждений в ткани мозга. Эти индивидуумы часто имеют поражения или повреждения спинного мозга, которые не могут быть детектированы с помощью МРТ. Как результат, важно, чтобы тщательное клиническое обследование также включало историю болезни пациента и функциональное тестирование. Оно должно охватывать умственные, эмоциональные и языковые функции, движение и координацию, зрение, равновесие и функции пяти органов чувств. Пол, место рождения, семейная история и возраст человека, когда впервые появились симптомы, также являются важными соображениями. Другие тесты, в том числе вызванные потенциалы (электрические диагностические исследования, которые могут выявить задержки во временах передачи нервного импульса центральной нервной системе), спинномозговая жидкость (при поиске присутствия клонально-распространенных иммуноглобулиновых генов, называемых олигоклональными полосами) и кровь (чтобы исключить другие причины) могут требоваться в определенных случаях.

#### Д. Комбинированная терапия.

Комбинированные терапии для иммунных нарушений, перечисленных выше, также предоставляются. Такие терапии будут включать стандартные терапии, такие как противовоспалительные средства и иммуносупрессивные препараты, используемые в комбинации с терапевтическими способами по настоящему изобретению. Такие стандартные способы терапии могли бы негативно влиять на иммунные клетки, вызывающие заболевание у индивидуума, или способствовать облегчению таких заболеваний. Этот процесс может включать приведение клеток или индивидуумов в контакт с обоими средствами(м) в одно и то же время. Этого можно достичь при помощи единой композиции или фармакологического состава, который включает оба средства, или при помощи двух различных композиций или составов одновременно. Альтернативно, терапия с использованием антител может предшествовать или следовать за другим средством лечения с интервалами в диапазоне от минут до недель.

Могут быть использованы различные комбинации, например терапия с использованием антител (с или без конъюгированного терапевтического средства) представляет собой "А" и вторичная терапия иммунного заболевания представляет собой "В":

A/B/A V/A/B V/B/A A/A/B A/B/V V/A/A A/B/V/B V/A/B/V  
 V/B/V/A V/B/A/B A/A/B/V A/B/A/B A/B/V/A V/B/A/A  
 V/A/V/A V/A/A/B A/A/A/V V/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Введение терапевтических средств по настоящему изобретению пациенту должно следовать общим протоколам по назначению этой конкретной вторичной терапии, учитывая токсичность, если таковая имеется, терапии с использованием антител. Ожидается, что циклы лечения будут повторяться по мере необходимости. Также предполагается, что различные стандартные терапии, а также хирургическое вмешательство могут применяться в сочетании с описанной терапией.

### VII. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения.

Специалисты в данной области могут оценить, что методики, раскрытые в примерах, которые следуют представленным методикам, раскрыты изобретателями, чтобы хорошо функционировать в практике изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться в качестве представляющих предпочтительные режимы для его практики. При этом специалисты в данной области должны оценить в свете настоящего раскрытия, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах осуществления, которые раскрыты и по-прежнему достигают сходный или аналогичный результат без отхода от сущности и объема изобретения.

#### Пример 1. Способы.

##### Продуцирование антител.

Для получения антитела против объединенного эпитопа PR1/HLA-A\*0201 авторы изобретения иммунизировали мышью BALB/c мономерами рекомбинантного PR1/HLA-A\*0201 при помощи подкожного (SQ) и внутрибрюшинного (IP) способов, три раза с интервалом в две недели. Спленоциты были изолированы от иммунизированных животных, и В-клетки были слиты с HGPRТ-отрицательными, бессмертными миеломными клетками с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ). Гибридные клетки затем отбирали при помощи мономеров pp65/HLA-A\*0201 и PR1/HLA-A\*0201 и помещали в 96-луночные планшеты для клонирования до отдельных клеток.

##### Скрининг антител и определения характеристик.

Моноклональные клеточные линии (~20000) скринировали при помощи мономеров PR1/HLA-A\*0201 способом ELISA для выявления положительной антитело-секретирующей гибридомы. Гибридома 8F4 была выявлена способом ELISA по специфичности к PR1/HLA-A\*0201 и охарактеризо-

вана с использованием изотип-специфических антител и антител легких цепей иммуноглобулинов.

Клонирование антитела, анализ последовательности и исследования связывания.

Тяжелая цепь 8F4 была клонирована из кДНК гибридомы, и была получена первичная последовательность. Картирование эпитопов проводили путем фолдинга измененных PR1-пептидов, содержащих замены Ala в каждой из позиции P1-P9, с тяжелой цепью HLA-A\*0201 плюс микроглобулин  $\beta$ -2. Аффинность связывания 8F4 с PR1/HLA-A\*0201 определяли способом поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore с иммобилизованным 8F4 и увеличенными концентрациями растворимого PR1/HLA-A\*0201. FACS-анализ и конфокальное отображение были использованы для изучения связывания 8F4 с нормальными и патологическими клетками.

Активность антитела.

Чтобы определить, запускает ли связывание 8F4 с AML лизис клеток, были выполнены анализы антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). AML-клетки из материала пациента, для которого было показано, что он является чувствительным к 8F4 CDC-опосредованному лизису, инкубировали в присутствии или в отсутствие 8F4 или изотипического контроля, а затем переносили в облученных (200 сГр) иммунодефицитных HLA-A2 трансгенных мышей NOD/SCID. Через две недели животных забивали и спленоциты и костный мозг анализировали с помощью FACS.

Выделение общей РНК.

Использовали Qiagen RNA easy kit с минелут-колонками. РНК-загрузочный буфер готовили следующим образом: добавить 1 мкл бромида этидия (EtBr) (10 мг/мл) к 100 мкл, 10 $\times$  краситель для нанесения ДНК, 1% агарозе в 1X TAE, не содержащий РНКаз H<sub>2</sub>O (в комплекте). Инструкции представляют собой "Замороженный флакон гибридомных клеток или 1-5 $\times$ 10<sup>6</sup> живых клеток". Если активные культуры доступны, осадить 1-5 $\times$ 10<sup>6</sup> живых клеток в 15 мл конической пробирке, как в стадии 4, и перейти к стадии 5. Если доступны только замороженные клетки, оттаять 1 флакон с гибридомными клетками при 37 $^{\circ}$ C, снять с водяной бани сразу после оттаивания и аккуратно перемешать. Протереть флакон 70% этанолом и открутить колпачок осторожно, чтобы избежать прикосновения с резьбой. Перенести содержимое флакона в 15 мл коническую пробирку, содержащую 15 мл в полной среды. Центрифугировать 100 $\times$ g (~1000 об/мин на низкоскоростной центрифуге Sorvall) в течение 5 мин. Во время вращения добавить  $\beta$ -меркаптоэтанол к малой аликвоте буфера RLT. Осторожно отобрать всю среду с клеток при помощи 10-мл пипетки. Лизировать клеточный осадок в буфер RLT с помощью Qiashtredder и следовать протоколу Qiagen для выделения РНК. Элюировать РНК с минелут-колонки 2X 15 мкл не содержащей РНКаз dH<sub>2</sub>O на начальное количество клеток (если с 6-луночный, элюировать 1 $\times$ 13 мкл). РНК должны оставаться на льду в течение последующих процедур. Залить 1% агарозный мини-гель, содержащий 1 мкг/мл EtBr, и в течение 15-минутного времени затвердевания произвести количественный анализ РНК. Произвести количественный анализ 2 мкл РНК с помощью спектрофотометра, используя тот же свободный от РНКаз H<sub>2</sub>O, описанный выше, в качестве пустого. Рассчитать концентрацию РНК: (A<sub>260</sub>)(40) - 1 мкг/мл, отношение A<sub>260</sub>/280 должно быть >1,6. Проверить качество РНК путем разгона 1 мкг на 1% агарозном минигеле в 1X РНК загружающем буфере общим объемом 10 мкл. Прогнать в геле ~1 дюйм. Анализировать гель в фотодокументирующей системе. Нанесенный образец РНК высокого качества характеризуется четко выраженными полосами 28s и 18s рибосомальных РНК в идеальном соотношении 2:1 по интенсивности. Соотношение 1:1 может быть приемлемым, однако отсутствие полос или размытость в нижней части геля свидетельствуют о деградациии РНК и указывают на то, что эта РНК не должна использоваться".

Выделение и анализ последовательности перегруппированных генов варибельной области (V) Ig гибридомы.

Для получения последовательностей ДНК из генов V тяжелой цепи (VH) и V легкой цепи (VL), использовали быструю амплификацию кДНК-концевой (RACE) ПЦР в сочетании с праймерами константной области тяжелой цепи человека или с праймерами константной области легкой цепи человека. 5'RACE кДНК амплификацию выполняли с использованием с BD Smart TM RACE cDNA amplification kit (BD Bioscience), следуя прилагаемым к нему инструкциям. Были использованы PFU ultra ("Stratagene"), Universla primer A mix (UPM) и ген-специфические праймеры (GSP) к константной области IgG H&L человека.

Для клонирования и ДНК-секвенирования 5'RACE ПЦР-продуктов были использованы набор для клонирования TOPO (Invitrogen) и набор для экстрагирования из геля (Qiagen). Для IgG L было отобрано 8 колоний для микровыделения и скринировано расщеплением EcoRI. Шесть положительных клонов секвенировали с праймеров M13 rev и T7. Для IgG было отобрано 8 колоний для микровыделения и скринировано расщеплением EcoRI. Шесть положительных клонов секвенировали с праймеров M13 rev и T7.

## Пример 2. Результаты.

### Продуцирование антител.

Для получения антител против объединенного эпитопа PR1/HLA-A\*0201 авторы изобретения иммунизировали мышей BALB/c мономерами рекомбинантного PR1/HLA-A\*0201 при помощи подкожного (SQ) и внутрибрюшинного (IP) способов, три раза с интервалом в две недели. У иммунизированных животных отбирали спленоциты и В-клетки сливали с отрицательными бессмертными миеломными клетками HGPRT с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ). Гибридомные клетки затем отбирали с использованием мономеров pp65/HLA-A\*0201 и PR1/HLA-A\*0201 и помещали в 96-луночные планшеты для клонирования до отдельных клеток.

### Скрининг антител и определение характеристик.

Моноклональные клеточные линии были скринированы при помощи мономеров PR1/HLA-A\*0201 способом ELISA для выявления положительной антитело-секретирующей гибридомы. Почти 2000 гибридом были проверены, и одна, названная 8F4, была выявлена способом ELISA со специфичностью к PR1/HLA-A\*0201. Гибридому 8F4 характеризовали использованием изотип-специфических антител и антителами легкой цепи иммуноглобулина, и было показано, что она секретирует единственное IgG2a-к PR1/HLA-A\*0201-специфическое антитело.

### Оценка связывания антитела.

Картирование эпитопов проводили путем фолдинга измененных PR1-пептидов, содержащих замены Ala в каждом из положений P1-P9, с использованием тяжелой цепи HLA-A\*0201 плюс  $\beta 2$  микроглобулина. P1 оказался наиболее важным для связывания 8F4, хотя изменение всех аминокислотных положений нарушало связывание (фиг. 1). Аффинность связывания 8F4 с PR1/HLA-A\*0201 определяли способом поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore с иммобилизованным 8F4 и нарастающей концентрацией растворимого PR1/HLA-A\*0201, как показано на фиг. 2.  $K_D$  для 8F4 составляет 9,9 нМ по сравнению с  $K_D=162$  нМ для коммерчески доступного мышинового моноклонального антитела BB7.2, которое распознает отдельный аллель-специфический сайт на HLA-A\*0201. С помощью конфокальной микроскопии прямые флуоресцентные конъюгаты 8F4 связывались только с PR1-пептид-импульсными T2-клетками (которые экспрессируют HLA-A\*0201), но не с посторонними pp65-импульсными или не подвергнутыми импульсам T2-клетками. Взятые вместе, были подтверждены 8P4-специфичность к и высокая аффинность связывания 8F4 с объединенным PR1/HLA-A\*0201. Используя как FACS-анализ, так и конфокальное отображение (снова с 8F4, FITC-конъюгированное анти-HLA-A\*0201 антитело BB7.2 и DAPI), 8F4, как было показано, связывается с циркулирующими бластами от HLA-A2+ пациентов с AML, но не связывается ни с PBMC от HLA-A2+ здоровых доноров, ни с HLA-A2 негативными AML-бластами (Фиг. 3 и 5).

### Клонирование и секвенирование генов варибельной области 8F4 мыши.

Гибридомные клетки 8F4 мыши выращивали в среде RPMI-1640 (HyClone, Logan, UT), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; HyClone) и 1 мМ пирувата натрия при 37°C в 7,5% CD<sub>2</sub>-инкубаторе. Общую РНК экстрагировали из приблизительно 10<sup>7</sup> клеток гибридомы с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) в соответствии с протоколом поставщика. Олиго dT-затравленную кДНК синтезировали с использованием набора для амплификации кДНК SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA) в соответствии с протоколом поставщика. Варибельная область кДНК для тяжелых и легких цепей 8F4 была амплифицирована с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ДНК-полимеразы Phusion (New England Biolabs, Beverly, MA), используя 3'-праймеры, которые отжигали соответственно с константными областями  $\gamma$ -2а и  $\kappa$ -цепей мыши и Universal Primer A Mix или Nested Universal Primer A, представленного в SMARTer RACE cDNA Amplification Kit в качестве 5'-праймера. Для ПЦР-амплификации варибельной области тяжелой цепи (VH) 3'-праймер имеет последовательность 5'-GCCAGTGGATAGACCGATGG-3' (SEQ ID NO: 46). Для ПЦР-амплификации варибельной области легкой цепи (VL) 3'-праймер имеет последовательность 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO: 47). Амплифицированные VH и VL кДНК были клонированы в вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) для определения последовательности. ДНК-секвенирование варибельных областей проводили в Tosco (Menlo Park, CA). Несколько клонов тяжелой и легкой цепей были секвенированы и были определены уникальные последовательности, гомологичные типичным варибельным областям тяжелой и легкой цепей мыши. Консенсусные последовательности кДНК вместе с установленными аминокислотными последовательностями VH и VL 8F4 показаны на фиг. 1 и 2 соответственно. Никаких необычных особенностей не было замечено в последовательностях аминокислот VH и VL зрелого 8F4.

### Конструирование химерного антитела 8F4 IgG1/ $\kappa$ .

Ген, кодирующий VH 8F4, был создан как экзон, включающий донорский сигнал сплайсинга и соответствующие фланговые сайты ферментов рестрикции, с помощью ПЦР с использованием

8F4 VH кДНК в качестве матрицы,

5'-GCAACTAGTACCACCATGAACCTTCGGGCTCAGC-3' (SEQ ID NO: 48; сайт SpeI подчеркнут) в качестве 5'-праймера и

5'-CGAAAGCTTGAAGTTAGGACTCACCTGCAGAGAGAGTGACCAGAG-3' (SEQ ID NO: 49; сайт HindIII подчеркнут) в качестве 3'-праймера.

Кроме того, ген, кодирующий VL 8F4, был создан как экзон, включающий донорский сигнал сплайсинга и соответствующие фланговые сайты ферментов рестрикции, с помощью ПЦР с использованием кДНК VL 8F4 в качестве матрицы,

5'-GCAGCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTCAG-3' (SEQ ID NO: 50; сайта NheI подчеркнут) в качестве 5'-праймера и

5'-CGAGAATTCTTTGGATTCTACTTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTG-3' (SEQ ID NO: 51; сайта EcoRI подчеркнут) в качестве 3'-праймера.

Донорские сигналы сплайсинга экзонов VH и VL 8F4 были получены от последовательностей JH3 и JK1 зародышевой линии мыши, соответственно. ПЦР-амплифицированные фрагменты выделяли из геля с помощью NucleoSpin extraction II Kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) и клонировали в вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) для подтверждения последовательности. Правильные V фрагменты были расщеплены SpeI и HindIII (для VH) или NheI и EcoRI (для VL), выделяли из геля и очищали и клонировали в вектор экспрессии млекопитающих, несущий константные области  $\gamma$ -1 и  $\kappa$  человека для продуцирования химерного антитела 8F4 IgG1/ $\kappa$ . Схематическая структура результирующего вектора экспрессии, pCh8F4, показана на фиг. 11.

Создание гуманизованных генов VH и VL 8F4.

Проектирование аминокислотных последовательностей гуманизованных VH и VL 8F4 проводили следующим образом. Во-первых, была построена трехмерная молекулярная модель переменных областей 8F4 с использованием запатентованного Biosciences алгоритма JN. Далее, каркасные аминокислотные остатки, важные для формирования структуры CDR, были определены с использованием молекулярной модели. Параллельно, были отобраны кДНК-производные VH- и VL-последовательностей аминокислот человека с высокой гомологией к VH и VL 8F4 соответственно. Наконец, последовательности CDR вместе с каркасными аминокислотными остатками, важными для поддержания структуры CDR, были перенесены от VH и VL 8F4 в соответствующие отобранные человеческие каркасные последовательности.

Для VH-последовательностей человека, гомологичных каркасным VH 8F4, был проведен поиск в базе данных GenBank, и VH-последовательность, кодируемая кДНК U96282 человека (U96282 VH) (номер доступа GenBank; Rassenti and Kipps, J. Exp. Med. 185: 1435, 1997), была выбрана в качестве акцептора для гуманизации. Последовательности CDR VH 8F4 были впервые перемещены в соответствующие положения VH U96282. Никакие замены человеческих каркасных аминокислот, как было предсказано, не были необходимыми для поддержания структуры CDR. Последовательность аминокислот полученных в результате гуманизованных VH, Hu8F4 VH, наряду с последовательностями 8F4 и VH U96282, показана на фиг. 12.

На основе поиска гомологии с последовательностями каркасной области VL 8F4, область V $\kappa$  человека, кодируемая кДНК AY043146 (AY043146 VL) (входящий номер GenBank; Ghiotto et al., помещенная в базу данных GenBank 29 июня 2001 г.), была выбрана в качестве акцептора для гуманизации.

Последовательности CDR VL 8F4 впервые были перемещены в соответствующие положения VL AY043146. Далее, в каркасном положении 70, которое, как показывает анализ трехмерной модели переменной области 8F4, контактирует с CDR, аминокислотный остаток VL 8F4 мыши был заменен на соответствующий остаток человека. Последовательность аминокислот, полученных в результате гуманизованных VL, Hu8F4 VL1, показана, наряду с последовательностями 8F4 и VL AY043146, на фиг. 13.

Несмотря на то что Val в положении 70 в VL 8F4 мыши находится в каркасном положении, важном для формирования структуры CDR, подробный анализ молекулярной модели переменных областей 8F4 указывает на возможность того, что аминокислотный остаток в положении 70 в VL1 Hu8F4 может быть заменен на соответствующий остаток человека Asp в VL AY043146 без потери антигенсвязывающей способности. В целях дальнейшего снижения потенциальной иммуногенности гуманизованного антитела 8F4 был разработан второй гуманизованный VL (Hu8F4 VL2), в котором Val в позиции 70 в VL1 Hu8F4 был заменен на Asp. Последовательность аминокислот Hu8F4 VL2 показана на фиг. 13.

Ген, кодирующий VH Hu8F4, был разработан в качестве экзона, включая сигнальный пептид, донорский сигнал сплайсинга и соответствующие сайты рестрикции для последующего клонирования в вектор экспрессии млекопитающих. Донорский сигнал сплайсинга экзона VH Hu8F4 являлся производным от последовательности зародышевой линии JH3 человека. Сигнальная пептидная последовательность в гуманизованном экзоне VH Hu8F4 была получена из соответствующей последовательности VH 8F4 мыши.

Каждый из генов, кодирующих VL1 и VL2 Hu8F4, был спроектирован в качестве экзона, включая сигнальный пептид, донорский сигнал сплайсинга и соответствующие сайты рестрикции для последующего клонирования в вектор экспрессии млекопитающих. Донорский сигнал сплайсинга экзонов VL1 и VL2 Hu8F4 являлся производным от последовательности зародышевой линии JK4 человека. Сигнальная пептидная последовательность в гуманизованных экзонах VL1 и VL2 Hu8F4 была получена из соот-

ветствующей последовательности VL 8F4 мыши.

Гены Hu8F4, VH, VL1 и VL2 были сконструированы GenScript USA (Piscataway, NJ) по конфиденциальному неразглашаемому соглашению. После расщепления SpeI и HindIII (VH) или NheI и EcoRI (для VL) гены Hu8F4 VH, VL1 и VL2 были субклонированы в соответствующие сайты в векторе экспрессии млекопитающих для продуцирования в виде IgG1/κ человека. Результирующий вектор экспрессии, pHu8F4-1, экспрессирует гуманизованное антитело 8F4 IgG1/κ, содержащее VH Hu8F4 и VL1 (Hu8F4-1). Аналогично, pHu8F4-2 экспрессирует гуманизованное антитело 8F4 IgG1/κ, содержащее VH Hu8F4 и VL2 (Hu8F4-2). Схематическая структура pHu8F4-1 и pHu8F4-2 показана на фиг. 11. Нуклеотидные последовательности генов VH Hu8F4, VL1 и VL2, наряду с выведенными аминокислотными последовательностями, показаны как SEQ ID NO: 22/23, 24/25 и 26/27 соответственно.

Гены VH Hu8F4 и VL2 были клонированы в другой вектор экспрессии млекопитающих для продуцирования альтернативной формы IgG1/κ человека, называемой IgG1-AA. Форма IgG1-AA несет в себе две аминокислотные замены в области γ-1 тяжелой цепи: с Leu на Ala в положении 234 и с Leu на Ala в положении 235 (нумерации Eu; Rabat et al., 1991), в результате чего сильно снижается связывание с рецепторами Fc γ (патент США 64 91916). Схематическая структура результирующей плазмиды pHu8F4-2-AA показана на фиг. 11.

Создание стабильных трансфектантов NS0, продуцирующих химерные и гуманизованные антитела 8F4 IgG1/κ.

Для получения клеточных линий, стабильно продуцирующих IgG1/κ антитела Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA, векторы экспрессии pCh8F4, pHu8F4-1, pHu8F4-2 и pHu8F4-2-AA соответственно были введены в хромосому миеломной клеточной линии NS0 мыши (Европейская коллекция культур клеток животных, Солсбери, Уилтшир, Великобритания). Клетки NS0 выращивали в среде DME, содержащей 10% FBS при 37°C в 7,5% CO<sub>2</sub> инкубаторе. Стабильную трансфекцию в NS0 проводили путем электропорации, как описано в Bebbington et al. (Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Перед трансфекцией каждый вектор экспрессии линеаризовали при помощи FspI. Приблизительно 10<sup>7</sup> клеток трансфицировали 20 мкг линеаризованной плазмиды, суспендируемой в среде DME, содержащей 10% FBS, и засеивали в несколько 96-луночных планшетов. Через 48 ч использовали селективную среду (среда DME, содержащая 10% FBS, средовая добавка HT (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 мг/мл ксантина и 1 мкг/мл микофеноловой кислоты). Примерно через 10 дней после начала селекции супернатанты культур анализировали на продуцирование антител.

Экспрессию химерных и гуманизованных антител 8F4 IgG1/κ определяли с помощью сэндвич-анализа ELISA. В типичных экспериментах ELISA-планшеты покрывали в течение ночи при 4°C 100 мкл/лунку разбавленными 1/2000 козлиными поликлональными специфическими антителами против Fcγ-цепи IgG человека (Sigma) в PBS, промывали промывочным буфером (PBS, содержащий 0,05% Tween 20) и блокировали в течение 0,5 ч при комнатной температуре 300 мкл/лунку блокирующим буфером (PBS, содержащий 2% обезжиренного молока и 0,05% Tween 20). После промывки промывочным буфером 100 мкл/лунку образцов, соответствующим образом разбавленных в ELISA-буфере (PBS, содержащий 1% обезжиренного молока и 0,025% Tween 20), были использованы для ELISA-планшетов. Соответствующее гуманизованное антитело IgG1/κ было использовано в качестве стандартного. После инкубации ELISA-планшета в течение 1 ч при комнатной температуре и промывки промывочным буфером связанные антитела детектировали с помощью 100 мкл/лунку разбавленных 1/2000 HRP-конъюгированных козьих поликлональных антител против каппа-цепи человека (SouthernBiotech). После инкубации в течение 0,5 ч при комнатной температуре и промывки промывочным буфером развитие цвета осуществляли путем добавления 100 мкл/лунку субстрата ABTS (bioWORLD, Dublin, OH). Развитие цвета останавливали путем добавления 100 мкл/лунку 2% щавелевой кислоты. Абсорбцию считывали при 405 нм. Стабильные NS0 трансфектанты, продуцирующие высокий уровень антител Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA (NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 и NS0-Hu8F4-2-AA 1D3 соответственно), были адаптированы для роста в бессывороточных средах с использованием Hybridoma-SFM (Invitrogen). Тестирование с использованием PCR Mycoplasma Detection Set (Takara Bio USA, Madison, WI) показало, что NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 и NS0-Hu8F4-2-AA 1D3 были отрицательными на наличие микоплазмы.

Аутентичность тяжелых и легких цепей, продуцируемых в NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 и NS0-Hu8F4-2-AA 1D3, была подтверждена путем кДНК-секвенирования. Тотальную РНК выделяли из клеток с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) и олиго-dT-затравленную кДНК синтезировали с помощью Superscript III First-Strand Synthesis System для RT-PCR (Invitrogen) в соответствии с протоколом поставщика. Кодировующую область тяжелой цепи γ-1 амплифицировали с помощью ПЦР с использованием CMV2 и JNT098 в качестве праймеров (фиг. 11) и ДНК-полимеразы Phusion. ПЦР-фрагменты были выделены из геля и подвергнуты секвенированию с использованием CMV2, JNT082, JNT097 и JNT098 в качестве праймеров, показанных как SEQ ID NO: 26 и 28-30. Аналогичным образом, кодировующую область легкой цепи амплифицировали с помощью CMV2 и JNT026 (SEQ ID NO: 26 и 27). Выделенные из геля и очищенные фрагменты ДНК подвергали секвенированию с

использованием CMV2 и JNT026 в качестве праймеров. Полученная нуклеотидная последовательность кодирующей области для каждого из тяжелой цепи Ch8F4, легкой цепи Ch8F4, тяжелой цепи Hu8F4-1, легкой цепи Hu8F4-1, тяжелой цепи Hu8F4-2, легкой цепи Hu8F4-2, тяжелой цепи Hu8F4-2-AA и легкой цепи Hu8F4-2-AA совершенно соответствует соответствующей последовательности в рCh8F4, рHu8F4-1, рHu8F4-2 или рHu8F4-2-AA векторе (SEQ ID NO: 33/34, 35/36, 37/38, 39/40, 37/38, 41/42, 43/44 и 41/42).

Очистка антител 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA.

Гибридому 8F4-4 (предоставленную Dr. Molldrem) культивировали в среде RPMI (Hyclone), содержащей 10% FBS, и адаптировали для роста в Hybridoma-SFM. Клетки 8F4-4, NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 и NS0-Hu8F4-2-AA 1D3 выращивали в Hybridoma-SFM в роллерных флаконах с плотностью около  $10^6$ /мл, подпитывали 1/10 объема 60 мг/мл ультрафильтрованного соевого гидролизата (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), растворенного в среде SFM4MAb (HyClone), и далее выращивали до тех пор, пока жизнеспособность клеток не становилась меньше чем 50%. После центрифугирования и фильтрации супернатант культуры нагружали на колонку протеин-А-сефарозой (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Колонку промывали PBS перед элюированием антитела 0,1 М глицин-HCl (pH 3,0). После нейтрализации 1 М Трис-HCl (pH 8) буфер для элюирования антитела был заменен на PBS с помощью диализа. Концентрацию антитела определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм ( $1 \text{ мг/мл} = 1,4 \text{ OD}$ ). Очистка и выход каждой из партий 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA обобщены в табл. 3.

Таблица 3

Антитело	Партия	Выход
8F4-4	1/27/11	30 мг из 1 л культуры
Ch8F4	8/10/10	7 мг из 500 мл культуры
Hu8F4-1	9/8/10	6,5 мг из 1 л культуры
Hu8F4-2	9/9/10	11 мг из 1 л культуры
Hu8F4-2	1/23/11	21 мг из 1 л культуры
Hu8F4-2-AA	3/15/11	10 мг из 500 мл культуры

Различные очищенные партии и выходы 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA.

Очищенные 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA характеризовали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в соответствии со стандартными процедурами. Анализ в редуцирующих условиях показал, что каждое из антител состоит из тяжелой цепи с молекулярной массой около 50 кДа и легкой цепи с молекулярной массой около 25 кДа (фиг. 14). Чистота каждого из антител оказалась более чем 95%.

Характеристика антител Ch8F4 и Hu8F4.

Связывание с антигеном для Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA исследовали способом ELISA с использованием комплекса PR1-пептида (VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45)) с HLA-A2 (PR1/HLA-A2). ELISA-планшет сначала покрывали 100 мкл/лунку 5 мкг/мл стрептавидина (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) в PBS. После промывания лунки промывочным буфером (PBS, содержащим 0,05% Tween 20) и блокированием с использованием блокирующего буфера добавляли 50 мкл/лунку 2 мкг/мл биотинилированного PR1/HLA-A2, который был предоставлен Molldrem. После 30 мин инкубации при комнатной температуре ELISA-планшет промывали промывочным буфером. Антитела Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA добавляли, начиная с 1 мкг/мл и серийными 3-кратными разведениями в ELISA-буфере для связывания с PR1/HLA-A2. После инкубации ELISA-планшета в течение 1 ч при комнатной температуре и промывки промывочным буфером связанные антитела детектировали с помощью / 100 мкл/лунку разбавленных 1/2000 HRP-конъюгированных козьих поликлональных антител против каппа-цепи человека. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре и промывки промывочным буфером развитие цвета осуществляли путем добавления 100 мкл/лунку субстрата ABTS. Развитие цвета останавливали путем добавления 100 мкл/лунку 2% щавелевой кислоты. Абсорбцию считывали при 405 нм. Данные показаны на фиг. 15. Значения  $EC_{50}$ , рассчитанные с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), составляли 0,054 мкг/мл для Ch8F4, 0,050 мкг/мл для Hu8F4-1, 0,07 мкг/мл для Hu8F4-2 и 0,07 мкг/мл для Hu8F4-2-AA. Этот результат указывает на то, что каждое из Hu8F4-1, Hu8F4-2 и Hu8F4-2-AA сохраняет аффинность связывания антигена антитела 8F4 мыши.

Действие антитела в отношении клеток-мишеней.

Чтобы определить, запускает ли связывание 8F4 клеточный лизис, были выполнены анализы антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). CDC-опосредованный лизис HLA-A2+ AML при помощи 8F4, но не HLA-A2 негативных AML или HLA-A2+PBMC от здорового контрольного донора показал зависимость от дозы антитела (фиг. 4). Клетки AML от материала пациента, которые, как было показано, являются чувствительными к 8F4 CDC-опосредованному лизису, инкубировали в присутствии или в отсутствие 8F4 или изотипического

контроля, а затем передавали облученным (200 сГр) иммунодефицитным HLA-A2 трансгенным NOD/SCID мышам. Через две недели животных забивали и спленоциты и костный мозг анализировали с помощью FACS. При некропии AML были выявлены только у животных, подвергшихся обработке изотипическим контрольным IgG2a, но не у животных, подвергшихся обработке 8F4 (фиг. 6). Не было никакой очевидной токсичности у мышей, которые получали 8F4 само по себе, по сравнению мышами, подвергшимся обработке изотипическим антителом. В целом, эти данные подтверждают вывод, что моноклональное антитело 8F4:

(1) специфически связывается с высокой аффинностью с комбинированным эпитопом PR1/HLA-A\*0201;

(2) специфически связывается и может быть использовано для идентификации молекул занятого PR1-пептидом HLA-A\*0201 на поверхности клеток человека, в том числе миелоидного лейкоза;

(3) вызывает специфический лизис HLA-A2+AML в присутствии комплемента;

(4) может препятствовать приживлению AML в модели иммунодефицитной мыши.

Предупреждение приживления опухоли.

AML-инфильтрация в тканях экспериментальных мышей после инъекции клеток AML плюс 8F4 была определена и показана на фиг. 8А, В. Клетки AML не детектировались в костном мозге и периферической крови неконтрольных мышей без передачи и экспериментальных мышей, обработанных 8F4. Мыши, которые получали клетки AML, смешанные с изотипическим соответствующим контрольным антителом (iso), показали приживление AML1 и AML5 через две или четыре недели после передачи AML. Расширенную панель, включающую специфический маркер клетки мыши (mCD45), 3-6 маркеров человека (CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, HLA-DR), Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen), использовали для проточного цитометрического анализа приживления AML. Все панели показывают жизнеспособность клеток mCD45.

8F4 индуцирует транзистентную нейтропению у HLA-A2 трансгенных NOD/SCID мышей. Мышам HLA-A2 Tg NOD/SCID, для которых показано наличие эндогенного PR1, инъекцировали 8F4 или контрольное Ab. Клетки костного мозга собирали и окрашивали mAb против антигенов мыши. Снижение гранулоцитов было очевидно в рассеянных профилях костного мозга (фиг. 9А; левая панель). Незрелые нейтрофилы Gr-1lo присутствовали, но зрелые нейтрофилы Gr-1hi были менее многочисленными в костном мозге 8F4-обработанных мышей (фиг. 9А; центральная панель). Кроме того, моноциты (SSClo CD11b+; фиг. 9А; нижнее правое окно правой панели) были снижены у 8F4-обработанных животных. Внутривенная инъекция 8F4 индуцировала временное снижение абсолютного числа циркулирующих зрелых гранулоцитов, макрофагов и моноцитов у мышей HLA-A2 Tg NOD/SCID (фиг. 9В). Через три недели после лечения все популяции сохраняются. Незначительные патологические изменения наблюдались в печени, легких, селезенке, почках, сердце или мозге мышей HLA-A2 Tg NOD/SCID через 7 дней после инъекций 200 мкг (10 мг/кг) 8F4 (фиг. 9С).

8F4 индуцирует транзистентную лейкопению в установившихся человеческих гемопоэтических клетках. Периферическую кровь мышей отбирали для отслеживания приживления пуповинной крови, и через 9-12 недели после переноса мышам вводили 8F4. Мышей впоследствии забивали и кровь, селезенку и костный мозг анализировали на приживление клеток человека (фиг. 10В). Как видно, введение антитела временно снижает % приживления переданных клеток (фиг. 10А).

Специфичность связывания, аффинность и активность гуманизированного антитела 8F4 в отношении AML человека.

Для характеристики специфичности связывания Hu8F4 авторы изобретения провели FACS-анализа, чтобы показать, что Hu8F4 связывается только с PR1-импульсными T2-клетками (фиг. 16А), но не с pp65-импульсными T2-клетками. Чтобы охарактеризовать аффинность связывания Hu8F4, авторы изобретения использовали ELISA-сравнение связывания двух форм гуманизированных антител, Hu8F4-1 (Hu1) и Hu8F4-2 (Hu2) с помощью 8F4 мыши и контрольного изотипического антитела (rhIgG1). Авторы изобретения использовали планшеты, покрытые мономерным рекомбинантным PR1/HLA-A2, для захвата антитела, и античеловеческие антитела были использованы в колориметрическом анализе, чтобы определить связанную фракцию по оптической плотности (OD). Как показано на фиг. 16В, Hu1 и Hu2 показали  $K_D=7,7$  и  $7,8$  нМ соответственно, что было сходно с таковым для 8F4 мыши ( $K_D=9,9$  нМ). Поэтому два гуманизированных антитела идентичны по специфичности лиганда и аффинности сравнения с родительским антителом мыши. Эти данные устанавливают биохимическое обоснование использования антитела Hu8F4 в дальнейших экспериментах для определения спектра активности в доклинических моделях на животных.

Для устранения возможного механизма действия Hu8F4 авторы изобретения обрабатывали PR1-импульсные T2 клетки-мишени Hu8F4 или контрольным изотипическим антителом (IgG1) в присутствии комплемента кролика и определяли комплемент-опосредованный лизис с помощью стандартного анализа. Как показано на фиг. 16С, ни Hu8F4, ни химерное Ch8F4 (Fc человека от IgG1 и F(ab)<sub>2</sub> мыши от 8F4) не опосредовало комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Поэтому, в отличие от 8F4 (IgG2) мыши, Hu8F4 не лизировало клетки-мишени с помощью комплемента. Авторы изобретения проводят дальнейшие исследования, чтобы определить, опосредует ли Hu8F4 АЗКЦ, прямой апоптоз или подавление

ние митоза и пролиферации в проводимых экспериментах.

Далее, авторы изобретения использовали Hu8F4 для лечения прижившегося ксенотрансплантата первичных AML человека у NSG-мышей. Мышам сначала приживляли AML в течение двух недель и затем обрабатывали Hu8F4, Ch8F4 или изотипическим IgG1 3 раза в неделю в течение 2 недель с 10 мг/кг антитела. ВМ и химеризм периферической крови анализировали после лечения. Как показано на фиг. 17, три отдельных эксперимента с 3 разными образцами AML были либо уничтожены, либо их рост был значительно ингибирован при помощи Hu8F4 и Ch8F4 по сравнению с изотипическим контролем. Таким образом, эти данные устанавливают, что Hu8F4 в высокой степени биологически активно в отношении первичной AML человека от пациентов с лечение-резистентным рецидивирующим заболеванием и что механизм действия Hu8F4 является комплемент-независимым, поскольку у NSG-мышей отсутствует экспрессия ключевых белков комплемента.

Биологическая безопасность 8F4 в HLA-A2 трансгенных иммунокомпетентных (B6) и иммунодефицитных (NOD/scid) мышах.

Авторы изобретения создали три мышинные модели для доклинического исследования Hu8F4: HLA-A2 трансгенные B6 иммунокомпетентные мыши, HLA-A2 трансгенные NOD/scid мыши и NSG- (с отсутствием общей  $\gamma$ -цепи IL-2) мыши. Для определения потенциальной токсичности авторы изобретения впервые показали, что PR1 экспрессируется на HLA-A2 на 5 и 6% гемопоэтических стволовых клеток и гранулоцитов соответственно HLA-A2-трансгенных животных. Далее, авторы изобретения показали, что однократное внутривенное введение высокой дозы 8F4 (10 мг/кг) индуцирует временную и полностью обратимую цитопению у обеих HLA-A2 трансгенных мышей (фиг. 18, 19). NSG-мышам приживляли CD34-селектированную пуповинной крови человека, чтобы установить долгосрочный стабильный человеческий химеризм, которые будут лечиться одной и несколькими дозами Hu8F4, чтобы определить эффекты mAb в отношении PR1/HLA-A2+ гемопоэтических стволовых клеток человека.

H8F4, анти-PR1/HLA-A2 mAb, задерживает опухолевый рост ксенотрансплантатов из тройного негативного рака молочной железы и продлевает жизнь.

В дополнение к вышеописанной работе на лейкозах авторы изобретения показали, что PR1 9-мерный пептид, полученный из гемопоэтических-рестриктивных сериновых протеиназ нейтрофилов эластазы (НЭ) и протеиназа 3 (P3), также может быть кросс-представлен на HLA-A2 на многих негематопоэтических опухолях, которые не экспрессируют эндогенные P3 или NE, в том числе меланома, мелкоклеточный рак легких и рак молочной железы (Alatrash et al., 2012). Клеточная линия тройного негативного рака молочной железы MB-MDA-231 (именуемые как 231 клетка) не экспрессирует P3 и NE, однако экспрессирует HLA-A2. При этом эти клетки поглощают растворимые P3 и NE и кросс-представляют PR1, что впоследствии делает 231 клетку восприимчивыми к 8F4-опосредованному лизису. Важно, что PR1/HLA-A2 экспрессируется на клетках рака молочной железы биопсий пациентов (Alatrash et al., 2012), включая пациентов с тройным негативным раком молочной железы (TNBC). Поэтому PR1/HLA-A2 может представлять собой антиген-мишень рака молочной железы, и авторы изобретения заключили, что 8F4 может иметь биологическую активность в отношении HLA-A2+ рака молочной железы.

Чтобы проверить эту гипотезу, авторы изобретения исследовали воздействие h8F4 на (a) первичную опухоль и (b) ксенотрансплантатную модель метастатической опухоли на NSG-мышах. В модели первичной опухоли 231 TNBC клетки инъецировали в молочную жировую прослойку NSG-мышей, после чего инъецировали разовую дозу h8F4, контрольного изотипического антитела или PBS. 231 клетка была трансфицирована геном *ffluc*, так что рост опухоли можно контролировать по времени при помощи биолюминесцентного отображения (BLI). H&E пятна биопсий опухолевого узла через 1-2 дня после имплантации показали опухолевую инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов, которые представляют собой клетки, природно экспрессирующие P3 и NE (фиг. 20A). Как показано на фиг. 20B, рост опухоли был задержан у мышей, которые получали h8F4, по сравнению с мышами, которые получали либо изотипический контроль, либо PBS. Кроме того, h8F4 пролонгировало выживаемость по сравнению с контрольными мышами ( $p < 0,01$ ).

Во второй модели модифицированную геном *ffluc* 231 клетку ( $2 \times 10^5$ ) вводили в хвостовую вену NSG-мышей и на 7-й день мышей, получавших 10 мг/кг h8F4 или контрольное изотипическое антитело 3 раза в неделю. У необработанных NSG-мышей инъецированные i.v. 231 клетки быстро метастазировали в легкие (подтверждено BLI), а затем в других тканях, включая селезенку, желудочно-кишечный тракт и печень. Как показано на фиг. 20C, h8F4 значительно задерживало метастатический опухолевый рост 231 клеток и значительно увеличивало выживаемость по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем ( $p = 0,0006$ ). Эти результаты позволяют предположить, что P3 и NE от опухолесвязанных нейтрофилов и макрофагов поглощаются 231 клетками *in vivo* и PR1 кросс-представляется на HLA-A2, что вызывает рост TNBC-клеток, ингибируемый лечения h8F4. Поэтому h8F4 биологически активно в отношении TNBC, и результаты заявителей убедительно показывают, что mAb h8F4 имеет потенциал в качестве терапевтического mAb для лечения негематопоэтических HLA-A2+ опухолей, включая рак молочной железы.

## Пример 3. Способы.

Ткани пациента, клетки и клеточная культура.

Блоки замороженной ткани пациента с раком молочной железы были куплены у Origene. Образцы больного и здорового донора были собраны после того, как было получено информированное согласие на участие в исследовании, одобренных экспертным советом при MDAnderson Cancer Center (Houston, TX). Клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231, MCF-7, MDAMB-453 и T47D и клеточные линии SW-620 (колоректальная аденокарцинома), OVCAR-3 (аденокарцинома яичника), MIA PaCa-2 (карцинома поджелудочной железы), Jurkat (острый Т-клеточный лейкоз), T2 (В-клеточная/Т-клеточная гибридома), HL-60 (острый промиелоцитарный лейкоз) и U-937 (гистиоцитарный лейкоз) были получены из американской коллекции типовых культур. Клеточная линия MCF-HER-18 была предоставлена М.-С. Hung (MD Anderson Cancer Center). Клеточные линии меланомы Mel 526, Mel 624, MT 2019 и MT 2333 были предоставлены L. Radvanyi (MD Anderson Cancer Center). Подлинность клеточных линий была подтверждена ДНК-дактилоскопией в MD Anderson Cancer Center в течение 6 месяцев использования в экспериментах.

Рак молочной железы клетки выращивали в среде DMEM с 2,5 мМ 1-глутамина (HyClone) с добавлением 10% FBS (Gemini Bio-Products) и 100 и/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Cellgro). G418 (Lonza) (0,5 мг/мл) добавляли к клеточным культурам MCF-7-HER18 в качестве селективного вещества. RPMI 1640 с 25 мМ HEPES плюс 1-глутамин (HyClone) были использованы вместо DMEM для линейных культур клеток лейкемии. Все клеточные линии культивировали в 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. PBMC от здорового и больного доноров и полиморфно-ядерные нейтрофилы (PMN) были обогащены с помощью стандартного Histopaque 1077 и 1119 (Sigma-Aldrich) градиентного центрифугирования соответственно.

RT-PCR. мРНК выделяли из клеточных линий и образцов, полученных при помощи лазерной захватывающей микродиссекции (LCM) с использованием RNA Stat 60 kit (TelTest). Синтез кДНК проводили с использованием Gene Amp RNA kit (PerkinElmer). Следующие праймеры были использованы:

P3, прямой праймер, 59-GACCCACCATGGCTCAC-39 [SEQ ID NO: 52] и обратный праймер, 59-ATGGGAAGGACAGACAGGAG-39 [SEQ ID NO: 53];

маммаглобин-1, прямой праймер, 59-AGCACTGCTACGCAGGCTCT-39 [SEQ ID NO: 54] и обратный праймер, 59-ATAAGAAAGAGAAGGTGTGG-39 [SEQ ID NO: 55];

актин, прямой праймер, 59-CCAGAGCAAGAGAGCTATCC-39 [SEQ ID NO: 56] и обратный праймер, 59-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-39 [SEQ ID NO: 57];

GAPDH, прямой праймер, 59-TAGACGGGAAGCTCACTGGC-39 [SEQ ID NO: 58] и обратный праймер, 59-AGGTCCACCACCCTGTTGCT-39 [SEQ ID NO: 59].

После денатурации в течение 5 мин при 95°C, образцы амплифицировали в течение 35 циклов с помощью iCycler (Bio-Rad). Образцы разгоняли в 1,5% агарозном геле. Полосы отображали при помощи GelDoc2000 (Bio-Rad) и анализировали при помощи программного обеспечения QuantityOne (Bio-Rad).

Вестерн-блоттинг.

Лизаты целостных клеток (WCL) получали путем суспендирования осадков клеток в лизис-буфере (10 мМ/л HEPES [pH 7,91], 10 мМ/л KCl, 0,1 мМ/л EGTA, 0,1 мМ/л ЭДТА, 1 мМ/л DTT), содержащем ингибиторы протеаз, и последующих циклов замораживания-оттаивания в течение 15 мин. WCL разделяли электрофорезом в гелях с 10% SDS в восстановительных условиях, переносили на поливинилидендифторидную мембрану, блокировали 5% молоком и окрашивали антителами против NE (Santa Cruz Biotechnology), против P3 (NeoMarkers), против тубулина (Sigma-Aldrich) или против GAPDH (Sigma-Aldrich). Хемиллюминесценция фиксировалась пленкой Kodak.

Ag кросс-представление.

Чтобы определить поглощение белка, клетки подвергали импульсу в редуцированной сывороточной среде (0,5% FBS), содержащей 10 мг/мл P3, NE (оба от Athen Research & Technology), EndoGrade OVA (Hyglos), или облученным (7500 сГр) PMN или PBMC в соотношении 1:1 (рак молочной железы:облученные клетки). Клетки затем пермеабелизировали (BD Biosciences) и окрашивали Alexa-488 или 647 непосредственно конъюгированными анти-P3 (клон MCP3-2; Thermo Scientific) или анти-NE (Santa Cruz Biotechnology) и анализировали способом проточной цитометрии. Для определения кросс-представления клетки поверхностно окрашивали флуоресцентно конъюгированным 8F4, как описано ранее (Sergeeva et al., 2011). Наборы Alexa-488 или 647 (Invitrogen) использовали для непосредственного конъюгирования антителами анти-P3, анти-NE, анти-PR1/HLA-A2 (8F4). Окрашивание aqua live/dead (Invitrogen) использовали для оценки жизнеспособности. Для всех экспериментов по проточной цитометрии рассеяние света использовали для установления начального стробирования с последующим окрашиванием aqua live/dead. Для подавления кросс-представления клетки совместно инкубировали с антеградным ингибитором эндоплазматический ретикулум (ER) - Гольджи брэфельдином А (Sigma-Aldrich) или ингибитором протеасом лактацицином (Sigma-Aldrich) (Francois et al., 2009, Kovacsovics-Bankowski and Rock 1995 and Mukai et al., 2009).

Конфокальное отображение для демонстрации внутриклеточной локализации P3 выполняли с использованием конфокального микроскопа Leica Microsystems SP2 SE (Leica) с объективами 310/25 воздух, 363/1.4 масло и проанализировали с помощью программного обеспечения Leica LCS (версия 2.61).

FITC-конъюгированный лизосом-ассоциированный мембранный белок-2 (LAMP-2; eBioscience) был использован для окрашивания лизосом и поздних эндосом (Kuronita et al., 2002). Проточную цитометрию проводили с помощью проточного цитометра Cytomation CyAn (Dako). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star).

Иммуногистохимия.

Криоконсервированные опухолевые ткани молочной железы и меланомы (Origene) фиксировали формалином и затем заливали парафином для иммуногистохимии. Перед окрашиванием срезы тканей депарафинизировали в ксилоле, дегидратировали и гасили для эндогенной пероксидазной активности. Срезы блокировали 10% нормальной сывороткой лошади и затем инкубировали с первичными клоном mAb анти-P3 WGM2 (1:10) (Abcam) или анти-NE (Santa Cruz Biotechnology) в течение 30 мин при комнатной температуре. Слайды меланомы совместно окрашивали антителом против микрофталмия-ассоциированного транскрипционного фактора (MITF) (Thermo Scientific). Слайды затем промывали и инкубировали с вторичными антимышиными IgG-биотин Ab (1:200) (Vector Laboratories), затем с помощью авидин-биотин-пероксидазы (1:100) (Vector Laboratories).

Хромаген 3,39-диаминобензидин (Dako) использовали для визуализации окрашивания. Все слайды подвергали контрастирующему окрашиванию гематоксилином. PMN-окрашивание нормальной ткани миндалина использовали в качестве положительного контроля. Отрицательные контроли окрашивали, как описано выше, после удаления первичных антител.

Пептид-специфические CTL-линии.

PR1-специфические CTL были экспандированы путем стимуляции PBMC от здоровых HLA-A2 доноров с PR1-пептидом *in vitro*, как описано ранее (Molldrem et al., 2000 и Molldrem et al., 1999). Вкратце, T2-клетки промывали бессывороточной средой RPMI 1640 и инкубировали с PR1-пептидом в дозе 20 мг/мл в течение 90 мин при 37°C. Пептид-нагруженные T2-клетки облучали 7500 cГр, отмывали и культивировали со свежeweделенными PBMC в пропорции 1:1 в среде RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки AB человека. Культуры повторно стимулировали пептид-импульсными T2-клетками в дни 7, 14 и 21 и на следующий день добавляли 20 IU/мл rIL-2 человека (BioSource International).

Анализ клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Стандартный анализ цитотоксичности использовали для определения специфического лизиса, как описано ранее (Molldrem et al., 1996 и Molldrem et al., 1997). Вкратце, 1000 клеток-мишеней в 10 мл ( $1,03 \times 10^5$  клеток/мл) окрашивали кальцеином-AM (Invitrogen) в течение 90 мин при 37°C, промывали три раза средой RPMI 1640, а затем совместно инкубировали с 10 мл пептид-специфических CTL при различных соотношениях E:T. После 4 ч инкубации при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в каждую лунку добавляли 5 мл трипанового синего и измеряли флуоресценцию с помощью автоматизированного ридера CytoFluor II (PerSeptive Biosystems). Процент специфической цитотоксичности был рассчитан следующим образом:

$$\left( \frac{\text{флуоресценция}_{\text{мишень+эффектор}}}{\text{флуоресценция}_{\text{среда}}} \right) / \left( \frac{\text{флуоресценция}_{\text{мишень только}}}{\text{флуоресценция}_{\text{среда}}} \right) \times 100.$$

Анализ комплемент-опосредованной цитотоксичности.

Чтобы определить, увеличивает ли кросс-представление восприимчивость рака молочной железы к 8F4, заявители провели анализ комплемент-опосредованной цитотоксичности, как описано ранее (Sergeeva et al., 2011 и Prang et al., 2005). Клетки MDA-MB-231 культивировали в среде, содержащей NE (10 мг/мл) или P3 (10 мг/мл), в течение 24 ч. Клетки инкубировали с кальцеином-AM (Invitrogen), промывали три раза и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640. 1 млн клеток смешивали с увеличивающимися дозами Ab 8F4 (0,624, 1,25, 2,5, 5 и 10 мг/мл) или изотипическим Ab (отрицательный контроль) в конечной концентрации 10 мг/мл и инкубировали 10 мин при 37°C. Затем добавляли стандартный кроличий комплемент (5 мл; Cedarlane Laboratories) и клетки инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Супернатант от гибридомы BB7.2 (источник анти-HLA-A2) и дигитонин (Promega) использовали в качестве положительного контроля. Флуоресценцию измеряли, и специфическую гибель рассчитывали, как описано выше.

Выделение LCM и РНК из опухолевой ткани молочной железы.

LCM проводили с целью выделения клеток рака молочной железы из биопсии ткани опухоли груди с использованием лазерного захватывающего микроскопа Arktutus PixCell с IR-диодным лазером (Life Technologies, Applied Biosystems). Ткани рассекали (толщина 5 мм), помещали на незаряженных стеклянные слайды и фиксировали в 75% этаноле и диэтилпиокарбонатной воде. Гематоксилин использовали для окрашивания ядер после гидратации тканей. Образцы хранили в ксилоле после поэтапной гидратации спиртом до готовности к LCM. Области, используемые для микродиссекции, были определены с использованием H&E окрашивания. Ткань подвергали импульсам лазерного луча с мощностью в диапазоне от 30 до 70 МВт для поддержания диаметра 10 мм. Приблизительно 5000 клеток рака молочной железы были захвачены в колпачки Arktutus Capsure HS LCM (Life Technologies, Applied Biosystems). Тотальную РНК выделяли и очищали с помощью Arktutus PicoPure RNA Isolation Kit (Life Technologies, Applied Biosystems). Целостность и количество РНК определяли при помощи спектрофотометра Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific). Набор для амплификации РНК Arktutus RiboAmp был использован для амплификации РНК с помощью двух раундов амплификации на основе T7. Выход составил 2,5 мг ам-

плифицированной РНК. кДНК синтезировали из 1 мг амплифицированной РНК при помощи Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) в соответствии с инструкцией производителя.

Окрашивание PR1-CTL у пациентов с раком молочной железы.

РВМС пациентов окрашивали следующими люминесцентными Ab: CD8 аллофикоцианин-H7 (BD Biosciences), CD3 PE-Cy7 (BD Biosciences), CD4 спокойный оранжевый (Invitrogen), PE-конъюгированный PR1/HLA-A2-декстрамер (Immudex), и следующими спокойный голубой-конъюгированными линейными антителами: CD14 (BD Biosciences), CD16 (BD Biosciences) и CD19 (BioLegend).

Окрашивание Aqua live/dead (Invitrogen) использовали для исключения мертвых клеток. Образцы фиксировали 4% параформальдегидом. Данные получали на проточном цитометре Canto (BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Частоту PR1-CTL определяли как процент живых клеток, которые были lineage<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и PR1-декстрамер<sup>+</sup>.

Конфокальное изображение тканей пациента.

Срезы криоконсервированных тканей фиксировали холодным ацетоном. Ткани рака молочной железы окрашивали маркером рака молочной железы Alexa-488, конъюгированным с мышинным антицитокератин-7 (CK7) Ab (Abcam) и Alexa-647-конъюгированным 8F4 Ab (Sergeeva et al., 2011). Чтобы подтвердить, что PR1/HLA-A2 экспрессируется клетками рака молочной железы, а не инфильтрующими лейкоцитами, последовательные срезы ткани рака молочной железы также окрашивали Alexa-647-конъюгированным мышинным анти-CD45 Ab (Invitrogen) в качестве маркера лейкоцитов. Срезы ткани миндалина человека (Origene) были использованы в качестве контроля положительного окрашивания для CD45. Для меланомы срезы ткани фиксировали холодным ацетоном, пермеабилizировали 0,5% тритоном X-100 (Sigma-Aldrich) в течение 15 мин и блокировали 5% нормальной козьей сывороткой (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Слайды затем инкубировали с маркером меланомы мышинным анти-MITF (Thermo Scientific) в течение 1 ч, промывали PBS и затем инкубировали с Alexa-488-конъюгированным козьим анти-IgG мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Слайды затем промывали, блокировали 5% нормальной сывороткой мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories) и инкубировали с Alexa-647-конъюгированным 8F4 Ab. Добавляли реагент против обесцвечивания ProLong Gold с DAPI (Invitrogen). Конфокальное отображение выполняли с использованием конфокального микроскопа Leica Microsystems SP2 SE с объективами 310/25 воздух, 363/1.4 масло. Программное обеспечение Leica LCS (версия 2.61) использовали для анализа изображений.

Пример 4. Результаты.

Поглощение NE и P3 солидными опухолями.

Чтобы определить, является ли поглощение NE и P3 повсеместным явлением, изобретатели совместно культивировали нескольких клеточных линий твердых опухолей с 10 мг/мл NE или P3 и затем использовали проточную цитометрию для оценки внутриклеточного поглощения. Авторы изобретения показали, что не все типы опухолей поглощают NE и P3 и, кроме того, степень поглощения изменяется среди различных типов опухолей (фиг. 21). Кроме того, поглощение NE выходит на плато с течением времени и значительно ниже, чем поглощение P3, что указывает на различные механизмы поглощения и предполагает рецептор-опосредованный процесс, который может быть вовлечен в поглощение NE.

P3 отсутствует в раке молочной железы. Авторы изобретения ранее показали, что NE отсутствует в раке молочной железы и поглощается клетками рака молочной железы (Mittendorf et al., 2012), и чтобы дифференцировать поглощение P3 от эндогенной экспрессии, заявители проанализировали клеточные линии рака молочной железы и первичные опухолевые ткани на экспрессию P3 по уровням мРНК и белка. ПЦР показывает, что каждая из линий клеток рака молочной железы MDA-MB-231, MCF-7, MCF-7-HER18 (HER18) и MDAMB-453 не содержала мРНК P3 (фиг. 22A). Аналогично, в клетках рака молочной железы, извлеченных из трех различных опухолей молочной железы (фиг. 22B, табл. 4), также отсутствует мРНК P3. Иммуноблоттинг WCL клеточных линий подтвердил отсутствие белка P3 в клетках рака молочной железы (фиг. 22C). Иммуногистохимическое окрашивание первичного рака молочной железы детектировало белок P3 в ткани молочной железы, но P3 был ограничен воспалительным компонентом в опухоли молочной железы, но не в опухолевых клетках молочной железы (фиг. 22D). Эти данные согласуются с предыдущими сообщениями, демонстрировавшими P3 в раке молочной железы (Desmedt et al., 2006), хотя данные заявителей позволяют предположить, что источником P3 являются воспалительные клетки в опухоли, а не клетки рака молочной железы.

Таблица 4

Патологические особенности опухолевых тканей рака  
молочной железы и меланомы, используемых  
для LCM и конфокальной микроскопии

Пациент	Гистология	ER/PR/HER2 Статус	TNM Стадирование	HLA-A2 Статус
Молочная железа 1	IDC	ER2-/PR2- /HER22-	T1cNXMX	положительный
Молочная железа 2	IDC	ER2-/PR2- /HER2+	T2N1bMX	N/D
Молочная железа 3	IDC/ILC	ER+/HER2+	T2N1aMX	отрицательный
Молочная железа 4	IDC	ER2-/HER22-	T3N0MX	положительный
Меланома 1	Узловая	N/A	T3N2M1c	положительный
Меланома 2	N/D	N/A	T3N2M1b	отрицательный

ER: рецептор эстрогена;

HER2: HER2/neu;

IDC:: инвазивная протоковая карцинома;

ILC: инвазивная дольковая карцинома;

N/D: не определено;

PR: рецептор прогестерона;

TNM: классификация злокачественных опухолей опухоль/узел/метастазы.

P3 поглощается клетками рака молочной железы. Поскольку заявители показали, что P3 не экспрессируется эндогенно на клетках рака молочной железы, они предположили, что P3 может поглощаться клетками рака молочной железы, так как ранее они уже показали для NE (Mittendorf et al., 2012). HLA-A2-положительные клеточные линии MDA-MB-231, MCF-7 и HER18 совместно культивировали с 10 мг P3 1, 4 и 24 ч и затем анализировали с помощью проточной цитометрии на внутриклеточное поглощение P3 (фиг. 23A). Изобретатели обнаружили зависящее от времени увеличение поглощения P3 во всех трех клеточных линиях. Они также продемонстрировали дозозависимое поглощение P3, которое не выходит на плато, что свидетельствует о не рецептор-опосредованном процессе поглощения P3 (фиг. 23B). Для дальнейшего описания поглощения P3, поскольку оно относится к Ag кросс-представлению, которое возникает в различных клеточных компартментах (Cresswell et al., 2005), изобретатели провели лазерную конфокальную микроскопию и показали, что после поглощения P3 локализуется в лизосомах, что показано при помощи совместного окрашивания P3 с LAMP-2 (фиг. 23C). Поглощение в лизосомальные компартменты происходило на ранних временных точках (1-4 ч) и может быть начальной стадией Ag-деградации, поскольку оно обрабатывается для кросс-представления на молекулах HLA класса I (Basha et al., 2008).

Поскольку различные клеточные пути участвуют в поглощении и переработке растворимых и клеточно-ассоциированных белков, для которых можно определить, являются ли они кросс-представленными (Burgdorf et al., 2006), и поскольку нейтрофилы были зарегистрированы в тканях опухолей, включая рак молочной железы (Queen et al., 2005 и Jensen et al., 2009), изобретатели оценили, существует ли разница в поглощении растворимого и клеточно-связанного P3 клетками рака молочной железы. Чтобы проверить это, клетки MDA-MB-231 совместно культивировали в течение 4 ч с растворимым P3 (10 мг/мл) или с облученными PMN или PBMC в пропорции 1:1 (фиг. 24A; данные не приведены). Данные показали, что клетки рака молочной железы могут поглощать как растворимый P3, так и связанный с клетками P3. В самом деле, поглощение связанного с клетками P3 оказывается более эффективным по сравнению с поглощением растворимого белка (средняя интенсивность флуоресценции [MFI]=12,292 против 1,356; p, 0,05), что может быть из-за ассоциации P3 с другими белками, которые могли бы способствовать поглощению.

P3 и NE являются кросс-представленными клетками рака молочной железы. Поскольку изобретатели показали, что NE также поглощается раком молочной железы (Mittendorf et al., 2012), и поскольку PR1 является производным обеих протеаз NE и P3 нейтрофильных азурофильных гранул, заявители исследовали, являются ли NE и P3 кросс-представленными клетками рака молочной железы после поглощения. Клетки HLA-A2+MDA-MB-231 совместно культивировали с растворимой P3 или NE при увеличении временных точек, а затем анализировали на экспрессию PR1/HLA-A2, используя мышинное анти-PR1/HLA-A2 Ab 8F4 (Sergeeva et al., 2011). Эти данные показывают, что клетки рака молочной железы

могут кросс-представлять PR1 как от NE, так и от P3. Значительные кросс-представления PR1 первоначально наблюдали при 24 ч (фиг. 24B) с 2,5- и 3,0-кратным увеличением PR1/HLA-A2 на поверхности клеток рака молочной железы после культивирования с NE и P3 соответственно по сравнению с не подвергнутыми импульсу клетками. На поверхности клеток не было значительного увеличения экспрессии HLA-A2 (данные не представлены).

Кроме того, для исследования внутриклеточных механизмов, вовлеченных в кросс-представление NE и P3, изобретатели изучили, участвуют ли протеасомы и ER/Гольджи в кросс-представлении NE и P3, как было ранее показано для других Ag (Francois et al., 2009, Kovacsovics-Bankowski et al., 1995 и Mukai et al., 2009). Данные, полученные заявителями, показывают, что ER/Гольджи и протеасомы участвуют в кросс-представлении NE и P3, поскольку инкубация клеток с брэфелдином, который ингибирует anterogradный транспорт из ER в Гольджи, и с лактацистином, ингибитором протеасом, в обоих случаях уменьшала экспрессию PR1/HLA-A2 клетками рака молочной железы MDA-MB-231 после совместного культивирования с NE или P3 (фиг. 24C, 24D). Это сходно с предшествующими результатами изобретателей, демонстрирующими участие протеасом и ER/Гольджи в кросс-представлении NE и P3 APC (Alatrash et al., 2012).

Кросс-представление PR1 делает рак молочной железы подверженным PR1-направленной терапии. Поскольку PR1 эффективно выявлял лейкемию с помощью PR1 пептидной вакцины (Rezvani et al., 2008), PR1-CTL (Rezvani et al., 2007 и et al., 2010) и анти-PR1/HLA-A2 Ab (8F4) (Sergeeva et al., 2011), изобретатели исследовали, может ли экспрессия PR1/HLA-A2 на клетках рака молочной железы после кросс-представления сделать эти клетки подверженными убийству при помощи PR1-CTL и Ab 8F4. HLA-A2+ клетки MDA-MB-231 культивировали в среде, содержащей 10 мг/мл NE или P3 в течение 24 ч, и затем инкубировали с распространенными от здорового донора PR1-CTL в течение 4 ч в стандартном кальцеин-АМ анализе цитотоксичности (Molldrem et al., 1996; Jiang et al., 1996) (фиг. 24E). Приведенные данные показывают, что кросс-представление NE и P3 повышало восприимчивость клеток MDA-MB-231 к убийству путем PR1-CTL после импульсов NE или P3, в сравнении с неподвергавшимися импульсу клетками MDA-MB-231. Аналогичным образом, используя Ab 8F4 в анализе комплементзависимой цитотоксичности (фиг. 24F) (Sergeeva et al., 2011), изобретатели наблюдали дозозависимое убийство клеток MDA-MB-231 после кросс-представления NE или P3 по сравнению с неподвергавшимися импульсу клетками. Наибольший уровень убийства был отмечен для самой высокой дозы Ab 8F4 (10 мг/мл).

PR1/HLA-A2 и PR1-CTL обнаруживаются у пациентов с раком молочной железы. Поскольку изобретатели показали, что в культивируемых клеточных линиях рака молочной железы и опухолевых тканях отсутствуют эндогенные NE и P3, и поскольку заявители наблюдали *in vitro* доказательства кросс-представления NE и P3 клетками рака молочной железы и последующую восприимчивость к PR1-направленной терапии, изобретатели исследовали, может ли детектировать PR1-CTL в первоначальных тканях пациентов с раком молочной железы и можно ли проводить детекцию PR1-CTL в периферической крови пациентов с раком молочной железы. Лазерная конфокальная микроскопия двух HLA-A2-положительных тканей рака молочной железы показала 8F4 в обеих опухолевых тканях (фиг. 25A). 8F4-окрашивание отсутствовало в HLA-A2-отрицательной ткани (данные не приведены). Кроме того, чтобы убедиться, что экспрессия PR1/HLA-A2 осуществляется клетками рака молочной железы, а не инфильтрующими лейкоцитами, изобретатели окрашивали последовательные срезы ткани рака молочной железы лейкоцитарным маркером CD45. Изобретатели показали отсутствие CD45-окрашивания в областях ткани молочной железы, которые совместно окрашивались 8F4 и CK7, подтверждая тем самым, что экспрессия PR1/HLA-A2 осуществлялась клетками рака молочной железы, не прилегающими воспалительными клетками (фиг. 25B).

Чтобы определить, можно ли проводить детекцию PR1-CTL у пациентов с раком молочной железы, заявители использовали PR1/HLA-A2 декстример-окрашивание 11 образцов периферической крови пациентов с ранней стадией рака молочной железы (фиг. 25C). Средняя частота PR1-CTL у этих HLA-A2+ пациентов составила 0,05% CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в диапазоне 0,02-0,2%), что несколько выше, чем частота PR1-CTL у здоровых доноров (от 1/15000 до 1/350000 CD8<sup>+</sup> клеток) (Molldrem et al., 1997). Взятые вместе, эти *in vivo* данные позволяют предположить, что сериновые протеиназы NE и P3, присутствующие в микроокружении опухоли, могут поглощаться и кросс-представляться клетками рака молочной железы, что может способствовать адаптивному иммунному ответу в отношении NE- и P3-производному эпитопу PR1.

PR1/HLA-A2 и PR1-CTL у пациентов с меланомой.

Поскольку ткани с меланомой, как было также показано, содержат воспалительные клетки, которые могут быть источником NE и P3 (Jensen et al., 2012), и поскольку меланома, как известно, подвержена иммунотерапии (Dudley et al., 2002 и Schwartzenuber et al., 2011), изобретатели далее исследовали, может ли кросс-представление NE и P3 также детектироваться в меланоме. Чтобы определить, детектируется ли PR1-CTL также в меланоме, изобретатели окрашивали PBMC от пациентов с меланомой при помощи PR1/HLA-A2 декстрамера и детектировали PR1-CTL у всех семи пациентов со средней частотой 0,014% CD8<sup>+</sup> Т-клеток (диапазон, 0,0053-0,019%) (фиг. 25C), подобный тому, что был замечен в крови от здоровых доноров. Изобретатели также обнаружили экспрессию PR1/HLA-A2 в одной HLA-A2+ (мела-

нома 1), но не в HLA-A2<sub>2</sub> (меланома 2) ткани меланомы (фиг. 25D).

Кросс-представление NE и P3 меланомой увеличивает восприимчивость к PR1-CTL. Чтобы определить, может ли меланома экспрессировать NE и P3, изобретатели окрашивали ткани меланомы, полученные от пациентов, на NE и P3 и показали отсутствие NE и P3 (фиг. 26A, 26B). Изобретатели также проанализировали экспрессию NE и P3 в четырех клеточных линиях меланомы MEL526, MEL624, MT2019 и MT2333. Вестерн-блот анализ показывает отсутствие NE и P3 в клеточных линиях меланомы (фиг. 26C). Сходно с раком молочной железы, изобретатели демонстрируют поглощение и кросс-представление NE и P3 клеточной линией HLA-A2+ Mel 526 (фиг. 26D, 26E). Поскольку Ab 8F4 связывается с молекулой HLA-A2 (Sergeeva et al., 2011 и Porgador et al., 1997), которая составляет значительную часть конформационного эпитопа PR1/HLA-A2, клетки Mel 526 демонстрируют окрашивание 8F4 перед совместным культивированием с NE или P3 (данные не показаны). Однако окрашивание 8F4 увеличивается после совместного культивирования с NE или P3, без увеличения HLA-A2 поверхностного окрашивания (данные не приведены), что указывает на увеличение экспрессии PR1/HLA-A2 на клеточной поверхности. Кроме того, кросс-представление NE и P3 повышало восприимчивость клеточной линии HLA-A2+ Mel 526 к убийству PR1-CTL, с наибольшим убийством, отмеченным для наибольшего соотношения E:T (фиг. 26F).

Все композиции и/или способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, могут быть сделаны и выполнены без чрезмерного экспериментирования в свете настоящего описания. Несмотря на то что композиции и способы по настоящему изобретению были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что вариации можно применять к композициям и/или способам или на стадиях, или на последовательности стадий способа, описанного в настоящем документе, не отходя от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, должно быть очевидным, что определенные средства, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены средствами, описанными в настоящем документе, несмотря на то, что те же или аналогичные результаты будут достигнуты. Все такие похожие заменители и модификации, очевидные для специалистов в данной области, считаются находящимися в пределах объема и сущности изобретения, как определено прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

**VIII. Ссылки**

Следующие ссылки в той степени, в какой они обеспечивают типичные процедурные или другие детали, дополняющие те, которые изложены в настоящем документе, включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Патент США 4196265  
Патент США 4472509  
Патент США 4554101  
Патент США 4680338  
Патент США 4684611  
Патент США 4797368  
Патент США 4843092  
Патент США 4879236  
Патент США 4938948  
Патент США 4952500  
Патент США 5021236  
Патент США 5302523  
Патент США 5322783  
Патент США 5384253  
Патент США 5399363  
Патент США 5443826  
Патент США 5464765  
Патент США 5466468  
Патент США 5538877  
Патент США 5538880  
Патент США 5543158  
Патент США 5550318  
Патент США 5563055  
Патент США 5563250  
Патент США 5580859  
Патент США 5589466  
Патент США 5599795  
Патент США 5610042  
Патент США 5641515  
Патент США 5656610  
Патент США 5702932

- Патент США 5736524  
Патент США 5739169  
Патент США 5780448  
Патент США 5789215  
Патент США 5801005  
Патент США 5824311  
Патент США 5830880  
Патент США 5846233  
Патент США 5846945  
Патент США 5856456  
Патент США 5871986  
Патент США 5880270  
Патент США 5945100  
Патент США 5981274  
Патент США 5994136  
Патент США 5994624  
Патент США 6013516  
Alatrash et al., *J. Immunol.*, 35: 309-320, 2012  
Antin, *Blood*, 82:2273-2277, 1993.  
Arend et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 16:27-55, 1998.  
Arend, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5):1-6, 2001.  
Austin-Ward and Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45,  
1998.  
Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati  
(Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986.  
Bajorin et al., *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.  
Bakhshi et al., *Cell*, 41(3):899-906, 1985.  
Basha et al., *Plos One*, 3:e3247, 2008.  
Beidler et al., *J. Immunol.*, 141(11):4053-4060, 1988.  
Besnard et al., *Gut.*, 43(5):634-638, 1998.  
Blomer et al., *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.  
Brouwer et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 98:448-453, 1994.  
Brynskov et al., *N. Engl. J. Med.*, 321(13):845-850, 1989.  
Bukowski et al., *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.  
Burchert et al., *Blood*, 02:659, 2002.  
Burgdorf et al., *J. Immunol.*, 176:6770-6776, 2006.

- Burger and Dayer, *Neurology*, 45(6S-6):S39-43, 1995.
- Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21):7439-7443, 1985.
- Cleary et al., *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Cotten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13):6094-6098, 1992.
- Coupar et al., *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cresswell et al., *Immunol. Rev.*, 207:145-157, 2005.
- Curiel, *Nat. Immun.*, 13(2-3):141-164, 1994.
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- Desmedt et al., *Int. J. Cancer*, 119: 2539-2545, 2006.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.
- Dinareello, *Int. Rev. Immunol.*, 16:457-499, 1998.
- Dionne et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 112(3):435-442, 1998.
- Dudley et al., *Science*, 298: 850-854, 2002.
- Eastgate et al., *Lancet*, 2:706-709, 1988.
- Заявка EP 125023
- Заявка EP 171496
- Заявка EP 173494
- Заявка EP 184187
- Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fellerman et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 93(10):1860-1866, 1998.
- Firestein et al., *Arthritis Rheum.*, 37:644-652, 1994.
- Fraleley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Francois et al., *Blood*, 114: 2632-2638, 2009.
- Franssen et al., *Lancet.*, 347:116, 1996.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Fujikawa et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 54:318-320, 1995.

- Funakoshi *et al.*, *Digestion*, 59(1):73-78, 1998.
- Giralt and Kolb, *Curr. Opin. Oncol.*, 8:96-102, 1996.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Hannum *et al.*, *Nature*, 343:336-340, 1990.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.*, 37(4):347-353, 1998.
- Hoffenberg *et al.*, *J. Pediatr.*, 134(4):447-452, 1999.
- Hollander *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 105:883-885, 1986.
- Hollander, *Scand. J. Gastroenterol.*, 27:721-726, 1992.
- Horwich *et al.* *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Irie *et al.*, *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.
- Jarvis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10(5):459-467, 1998.
- Jarvis, *Pediatr. Ann.*, 31(7):437-446, 2002.
- Jensen *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 27:4709-4717, 2009.
- Jensen *et al.*, *Cancer*, 118: 2476-2485, 2012.
- Jiang *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 93:606-612, 1996.
- Johnson *et al.*, In: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto *et al.* (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
- Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525, 1986.
- Jonsson *et al.*, *Br. J. Rheumatol.*, 32(7):578-581 1993.
- Jonsson *et al.*, *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.
- Jonsson *et al.*, *Trends Immunol.*, 22(12):653-654 , 2001.
- Kaepler *et al.*, *PlanT-cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kahle *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731-734, 1992.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kolb and Holler, *Curr. Opin. Oncol.*, 9:139-145, 1997.
- Kolb *et al.*, *Blood*, 86:2041-2050, 1995.
- Kolb *et al.*, *Bone Marrow Transplant*, 17:449-452, 1996.
- Kotzin, *Cell*, 85:303-306, 1996.

- Kovacsovics-Bankowski and Rock, *Science*, 267: 243-246, 1995.
- Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.
- Kuronita, *J. Cell Sci.*, 115:4117-4131, 2002.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57(1):105-32, 1982.
- Laughlin et al., *J. Virol.*, 60(2):515-524, 1986.
- Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8(10):3988-3996, 1988.
- Leiper et al., *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 12(1):179-199, 1998.
- Lipsky, In: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci et al.(Eds.), 14<sup>th</sup> Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998.
- Lugering et al., *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30(3):338-344, 1998.
- Makowiec et al., *Z. Gastroenterol.*, 36(8):619-624, 1998.
- Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983.
- McAlindon et al., *Gut*, 42(2):214-219, 1998.
- McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62(6):1963-1973, 1988.
- Miller et al., *Am. J. Clin. Oncol.*, 15(3):216-221, 1992.
- Mittendorf et al., *Cancer Res.*, 72:3153-3162, 2012.
- Molldrem et al., *Blood*, 88:2450-2457, 1996.
- Molldrem et al., *Blood*, 90:2529-2534, 1997.
- Molldrem et al., *Cancer Res.*, 59:2675-2681, 1999.
- Molldrem et al., *Nat. Med.*, 6:1018-1023, 2000.
- Molldrem et al., *J. Clin. Invest.*, 111:639-647, 2003.
- Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.
- Mukai, et al., *J. Immunol.*, 183:6561-6568, 2009.
- Murch, *Nutrition*, 14:780-783, 1998.
- Muzyczka, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.
- Naldini et al., *Science*, 272(5259):263-267, 1996.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Ohnishi et al., *Int. Immunol.*, 6:817-830, 1994.
- Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-28, 1993.
- Paskind et al., *Virology*, 67:242-248, 1975.

- Paul, *Immunogenetics*, 37(6):442-448, 1993.
- Pietras et al., *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Porgador et al., *Immunity* 6: 715-726, 1997.
- Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Prang et al., *Br. J. Cancer*, 92:342-349, 2005.
- Prieur et al., *Lancet.*, 2:1240-1242, 1987.
- Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Queen et al., *Cancer Res.*, 65:8896-8904, 2005.
- Reimund et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, 28(2):145-150, 1998.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>th</sup> ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Rezvani et al., *Cytotherapy* 9: 245-251, 2007.
- Rezvani et al., *Blood*, 111:236-242, 2008.
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham:Butterworth, 467-492, 1988.
- Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rogler and Andus, *World J. Surg.*, 22(4):382-389, 1998.
- Rooney et al., *Rheumatol. Int.*, 10:217-219, 1990.
- Rosenberg et al., *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Ruemmele et al., *Gastroenterol.*, 115(4):822-829, 1998.
- Saiki et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, 33(6):616-622, 1998.
- Salomonsson et al., *Scand. J. Immunol.*, 55(4):336-342, 2002.
- Sartor, *Am. J. Gastroenterol.*, 92(12):5S-11S, 1997.
- Savage et al., *Immunity*, 10:485-492, 1999.
- Scheibenbogen et al., *Blood*, 100:2132-2137, 2002.
- Schreiber, *Neth. J. Med.*, 53(6):S24-31, 1998.
- Schwartzentruber, et al., *N. Engl. J. Med.*, 364: 2119-2127, 2011.

- Sergeeva, et al., *Blood*, 117: 4262-4272, 2011.
- Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.
- Soderholm et al., *Gastroenterol.*, 117:65-72, 1999.
- Stack et al., *Lancet*, 349(9051):521-524, 1997.
- Stites, *J. Mol. Biol.*, 235(1):27-32, 1994.
- Sun et al., *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
- Targan et al., *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-1035, 1997.
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.
- Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
- Tsujimoto et al., *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
- van den Berg, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5S-2):7-16, 2001.
- van Dullemen et al., *Gastroenterol.*, 109(1):129-135, 1995.
- VandenDriessche et al., *Blood*, 100(3) 813-822, 2002.
- Wada et al., *Nucleic Acids Res.* 18:2367-2411, 1990.
- Warrington et al., *Arthritis and Rheumatism*, 44:13-20, 2001.
- Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wood et al., *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.
- Xanhou et al., *Arthritis Rheum.*, 44(2):408-418, 2001.
- Zufferey et al., *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875, 1997.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2, которое содержит
  - вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16; и
  - вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19 или 20.
2. Антитело по п.1, которое содержит
  - тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16; и
  - константную область тяжелой цепи, которая представляет собой константную область тяжелой цепи гамма-1 человека; и
  - легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19; и
  - константную область легкой цепи, которая представляет собой константную область легкой цепи каппа человека.
3. Антитело по п.1, которое содержит
  - тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16; и
  - константную область тяжелой цепи, которая представляет собой константную область тяжелой цепи гамма-1 человека; и
  - легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20; и
  - константную область легкой цепи, которая представляет собой константную область легкой цепи каппа человека.
4. Антитело по п.3, в котором
  - константная область тяжелой цепи гамма-1 человека представляет собой константную область в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38; и
  - константная область легкой цепи каппа человека представляет собой константную область в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42.
5. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, которая кодирует вариабельную область

легкой цепи антитела по любому из пп.1-4.

6. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-4.

7. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.5 и/или 6.

8. Клетка-хозяин, содержащая

нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по п.1; и

нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела по п.1.

9. Клетка-хозяин, содержащая

нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела по любому из пп.2-4; и

нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела по любому из пп.2-4.

10. Способ получения гуманизированного антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8 в условиях, поддерживающих экспрессию гуманизированного антитела, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2.

11. Способ получения гуманизированного антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.9 в условиях, поддерживающих экспрессию гуманизированного антитела, которое связывается с VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при связывании с рецептором HLA-A2.

12. Гуманизированное антитело, полученное способом по п.10.

13. Гуманизированное антитело, полученное способом по п.11.

14. Применение антитела по любому из пп.1-4 и 12, 13 для лечения злокачественного новообразования, причем указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы или острый миелобластный лейкоз.

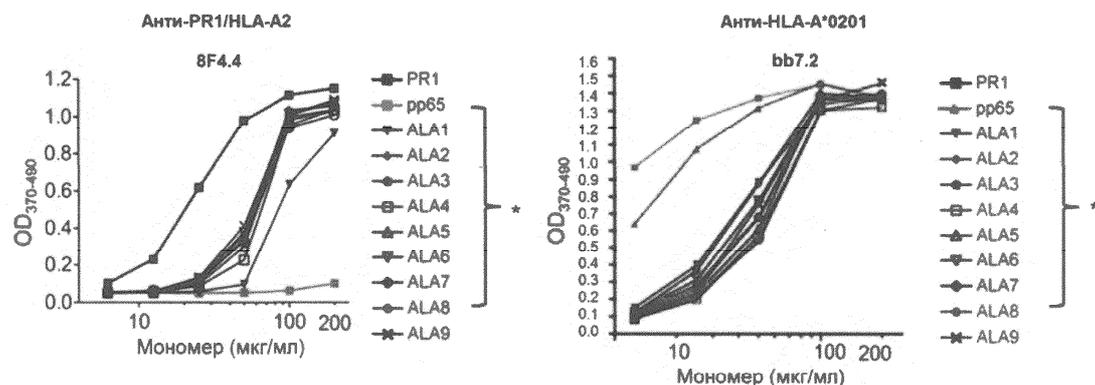
15. Применение по п.14, где указанное злокачественное новообразование является рецидивирующим или метастатическим.

16. Применение антитела по любому из пп.1-4 и 12, 13 для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, причем указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы или острый миелобластный лейкоз.

17. Применение по п.16, где указанное злокачественное новообразование является рецидивирующим или метастатическим.

18. Способ лечения индивида, страдающего злокачественным новообразованием, включающий введение указанному индивиду антитела по любому из пп.1-4 и 12, 13, причем указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы или острый миелобластный лейкоз.

19. Способ по п.18, где указанное злокачественное новообразование является рецидивирующим или метастатическим.



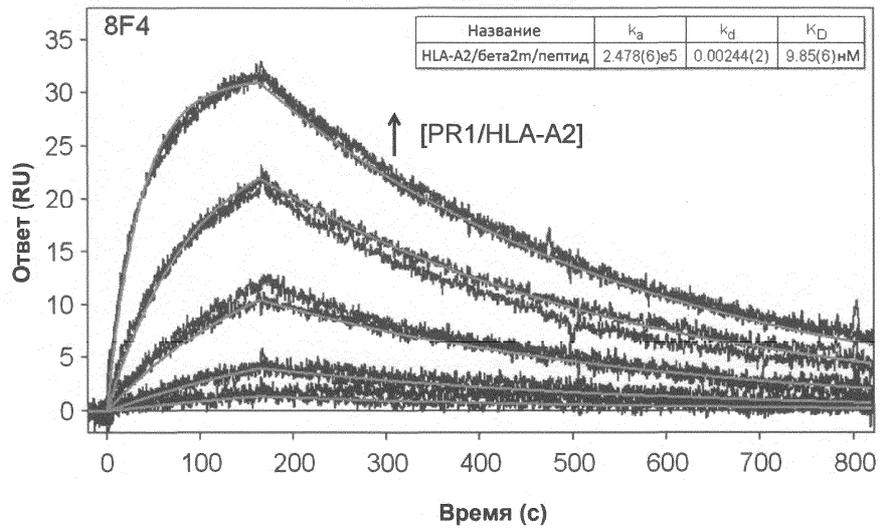
\* Нонамерные пептиды с единственной аминокислотной заменой в линейной последовательности PR1

Последовательность PR1 :

V	L	Q	E	L	N	V	T	V
1	2	3	4	5	6	7	8	9

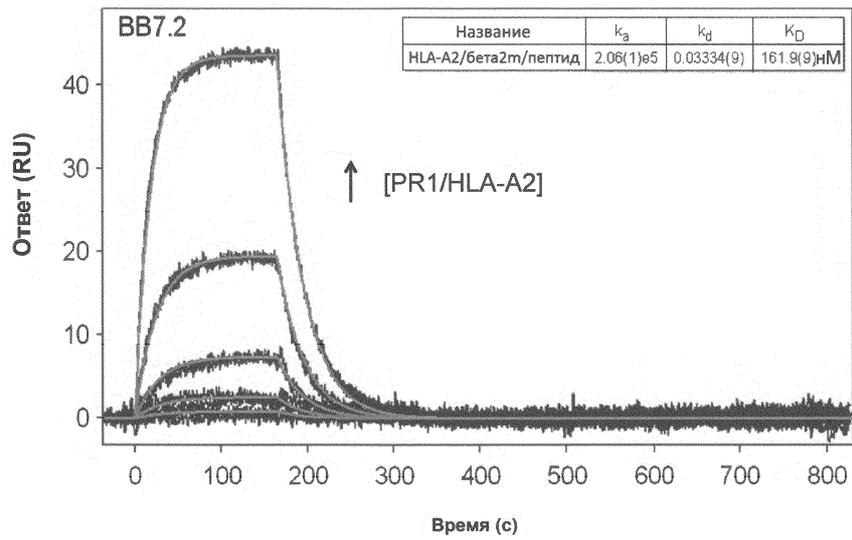
Фиг. 1

## 8F4 анти PR1/HLA-A2



$K_D = 9,9 \text{ нМ}$

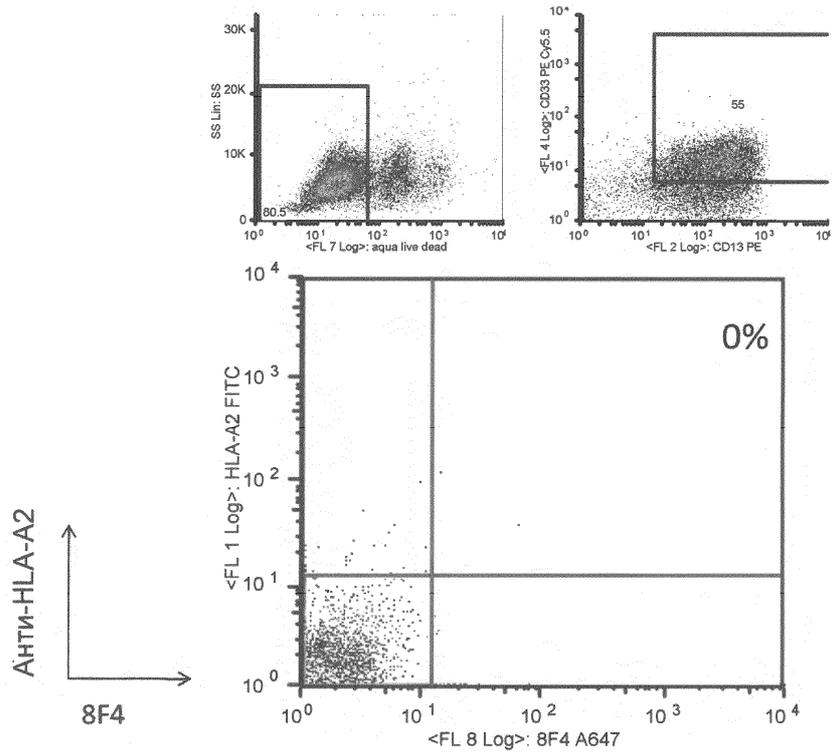
## BV7.2 анти-HLA-A2



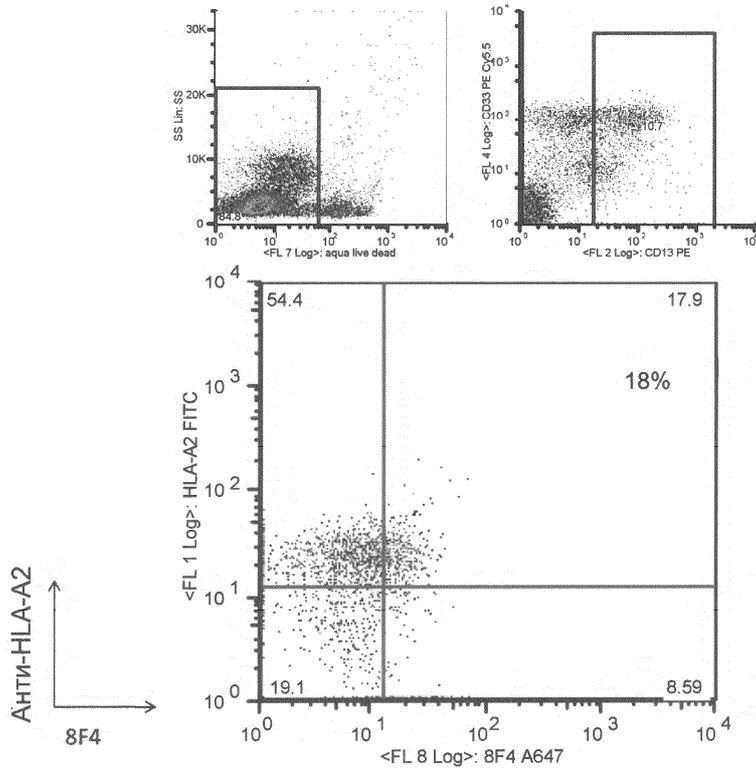
$K_D = 162 \text{ нМ}$

Фиг. 2

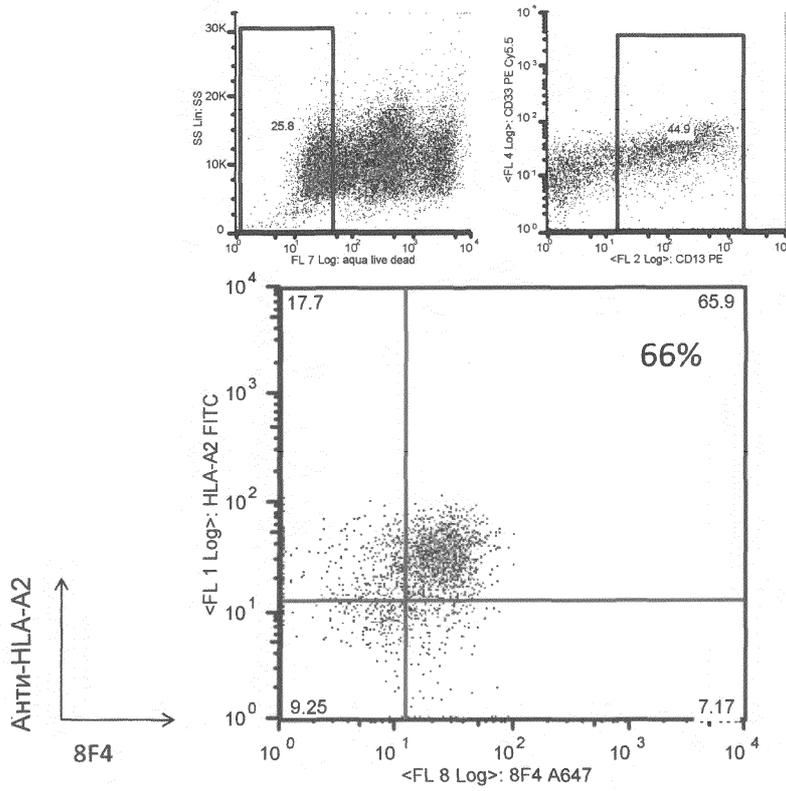
AML-M2 (HLA-A2-)



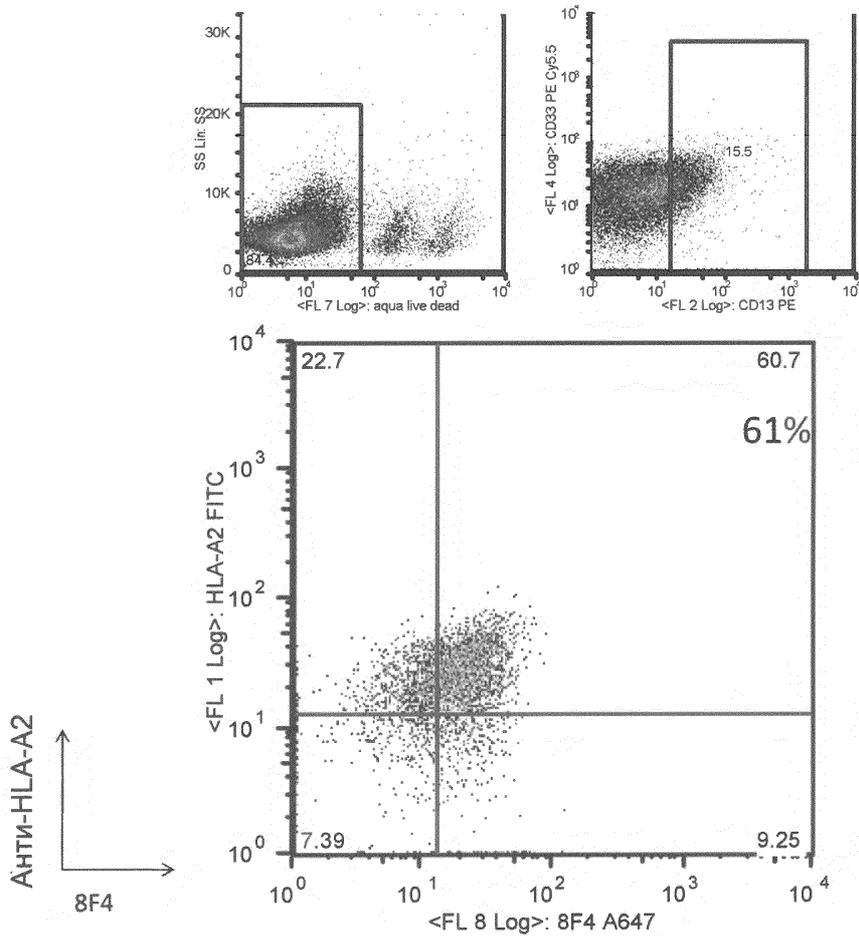
Здоровый донор (HLA-A2+)



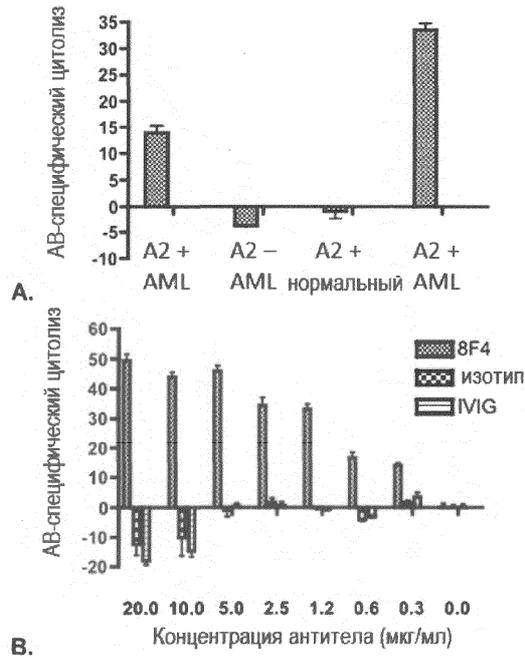
**AML-M5 (HLA-A2+)**



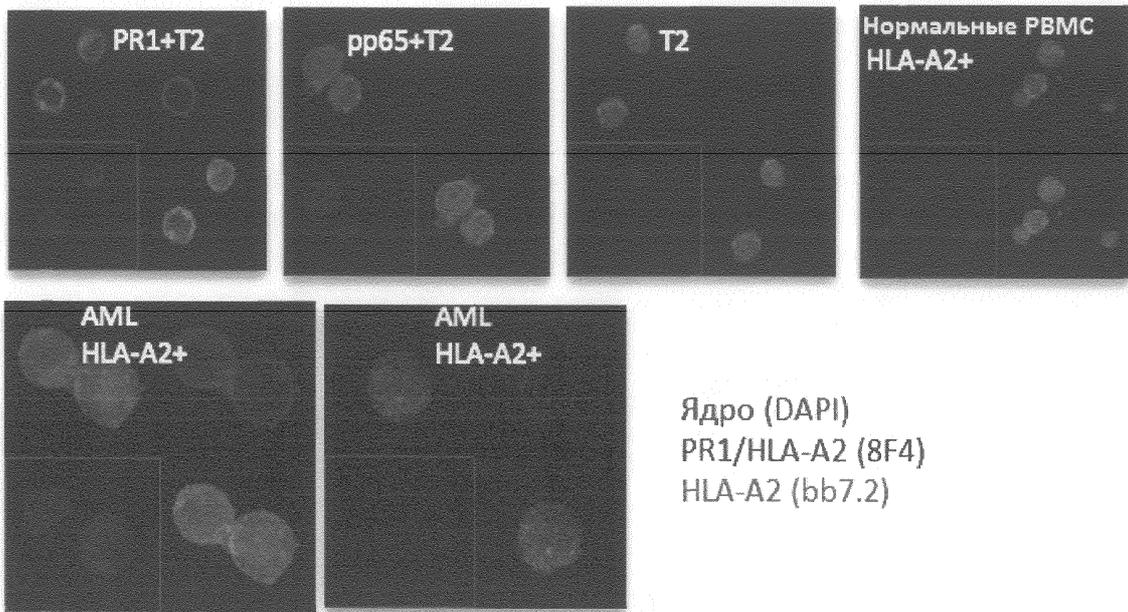
**AML-M1 (HLA-A2+)**



Фиг. 3

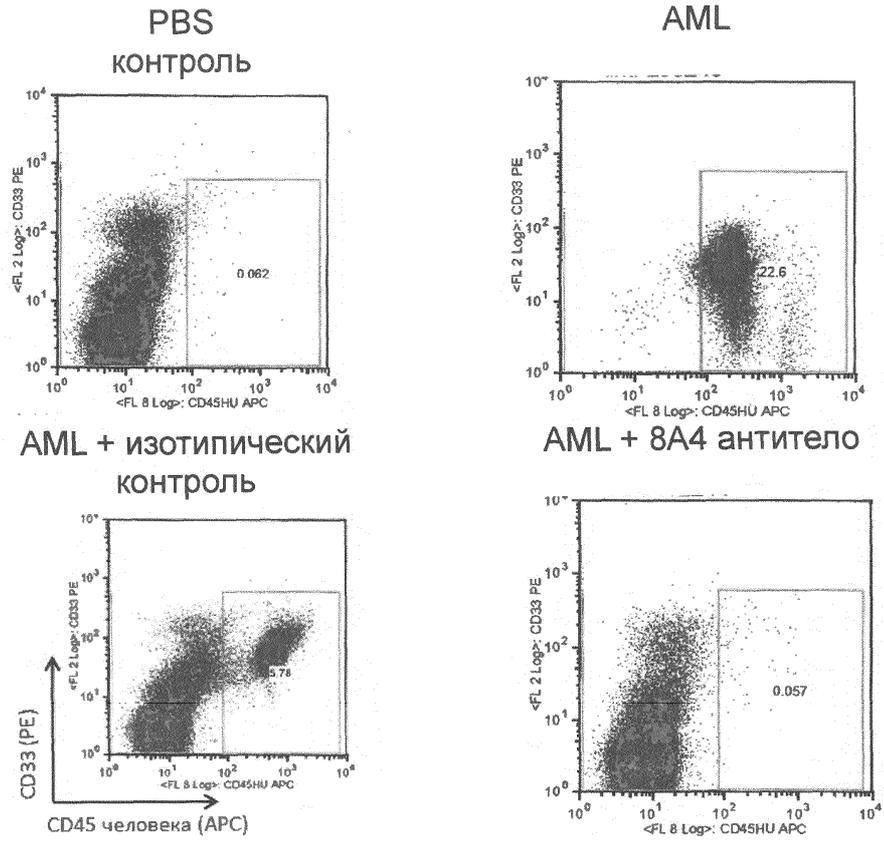


Фиг. 4

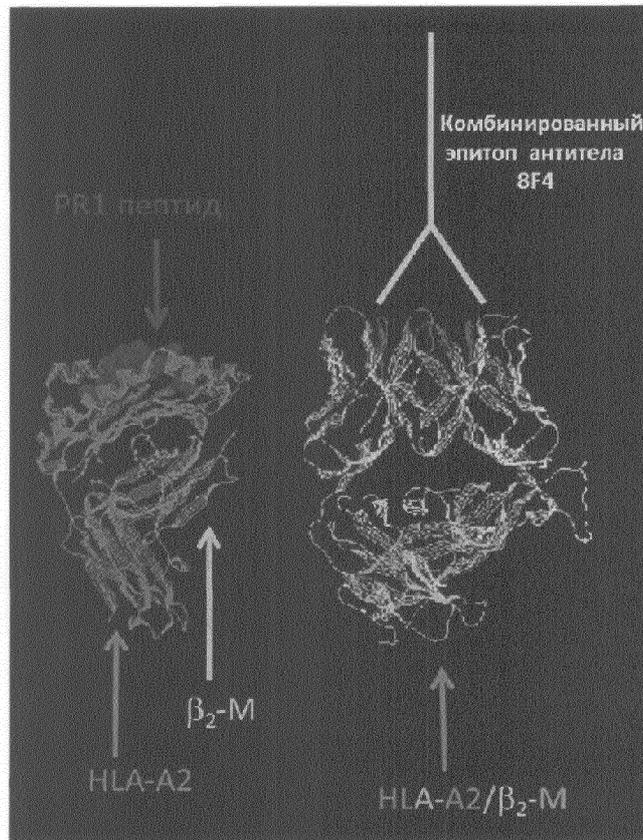


Фиг. 5

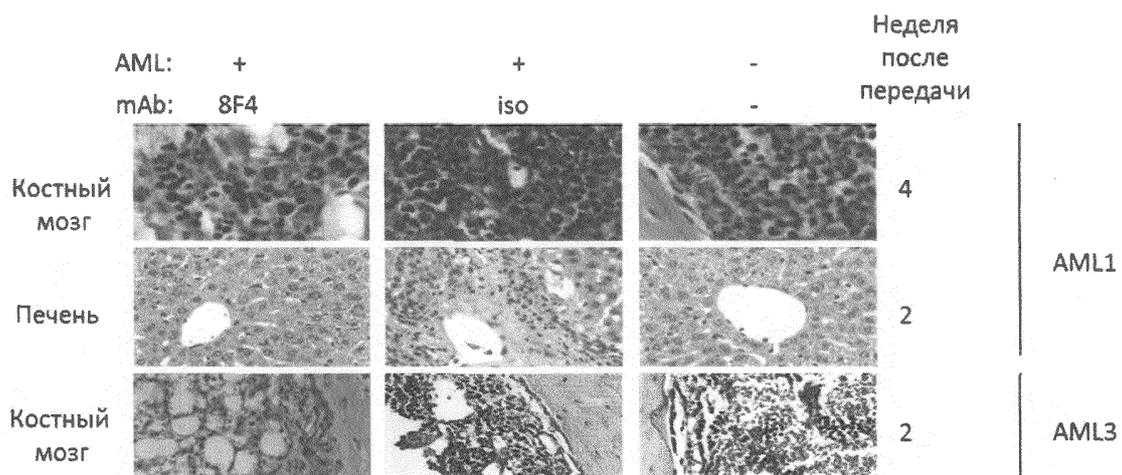
Костный  
мозг  
День 14



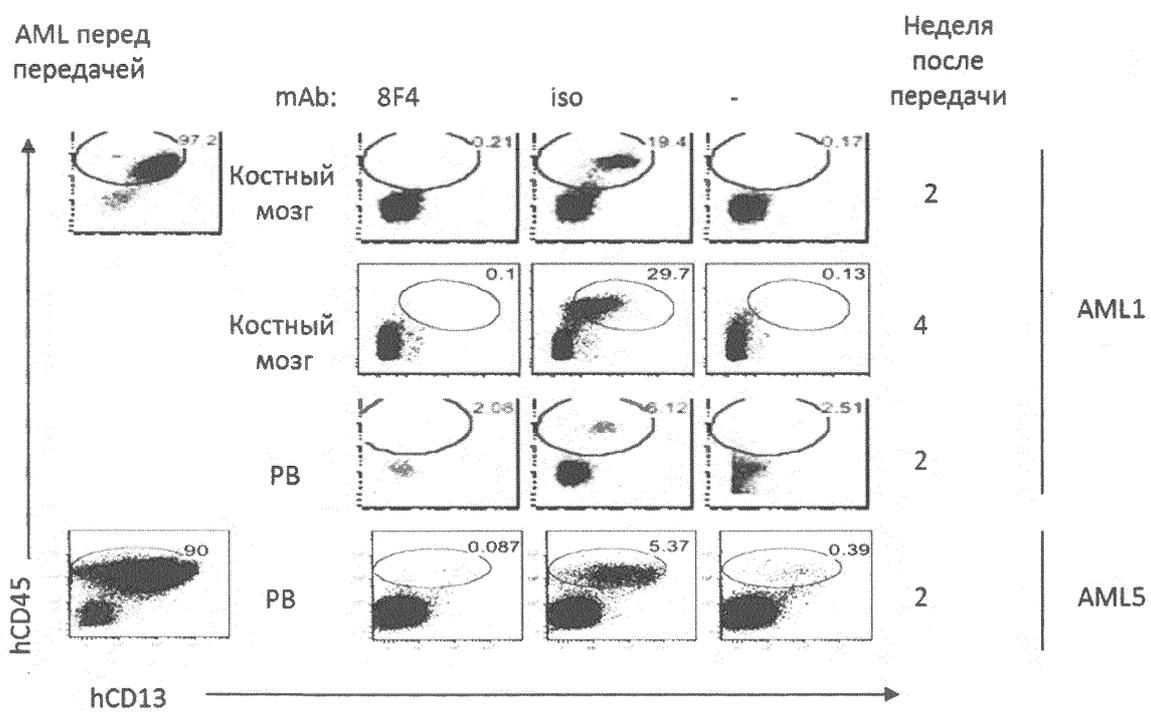
Фиг. 6



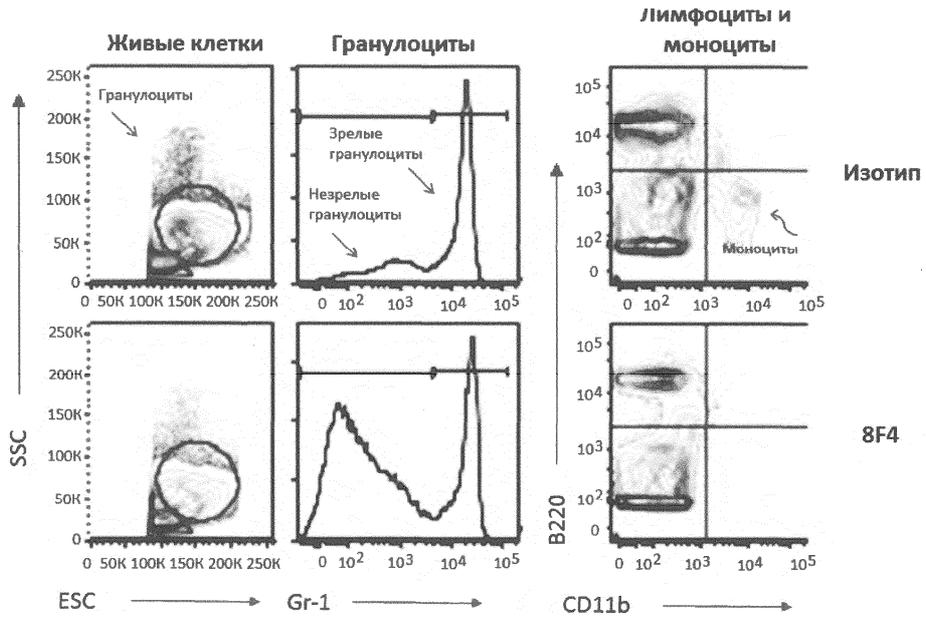
Фиг. 7



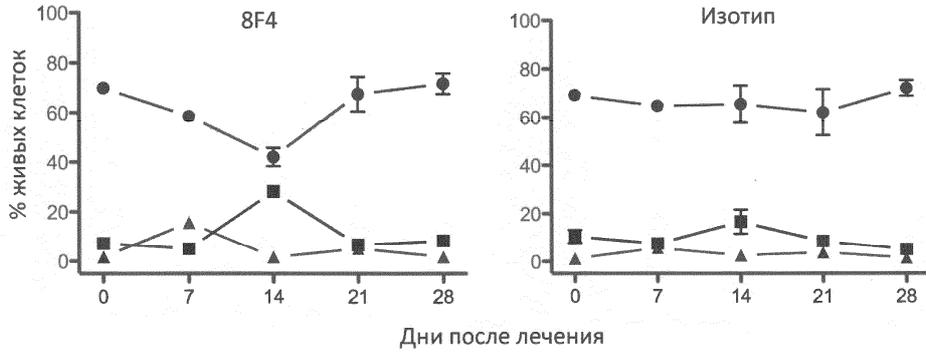
Фиг. 8А



Фиг. 8В

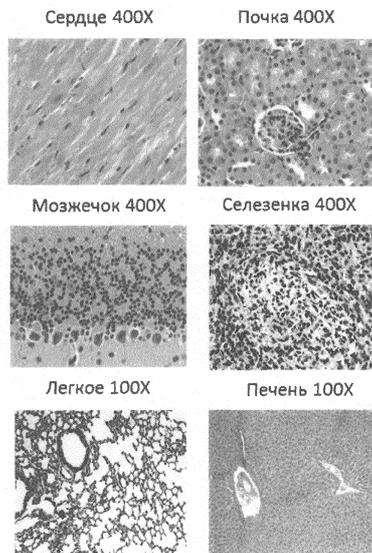


Фиг. 9А

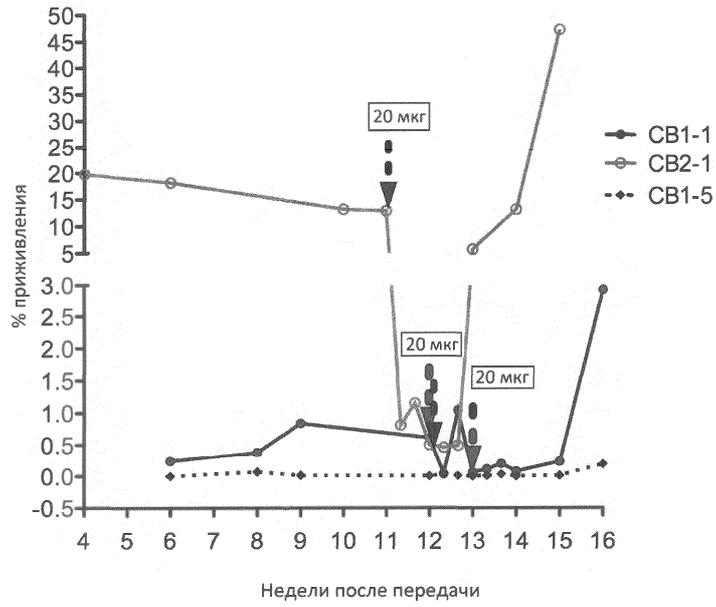


- Зрелые гранулоциты
- ▲ Незрелые гранулоциты
- Макрофаги и моноциты

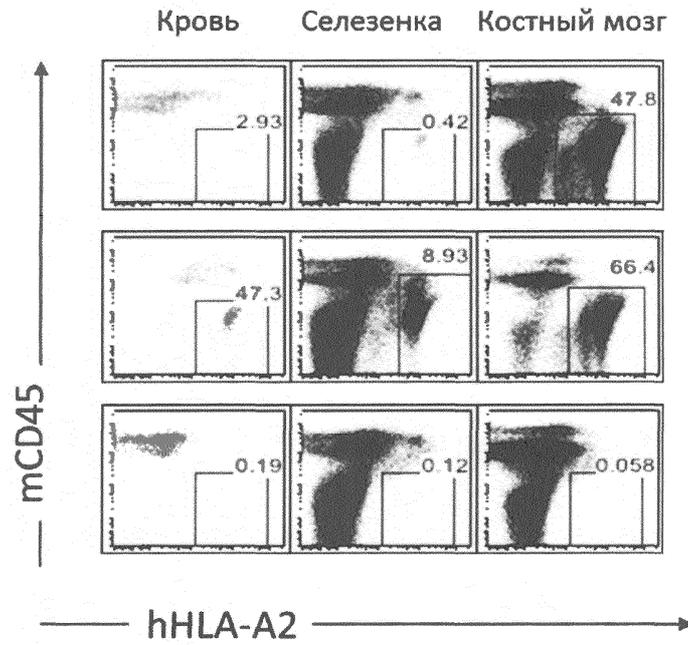
Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 10А



Фиг. 10В



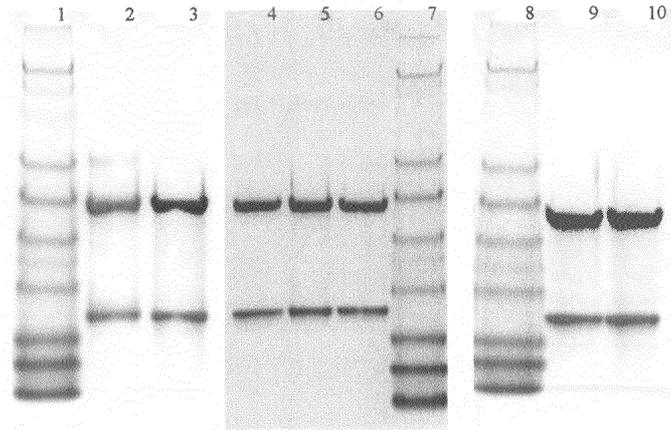
Фиг. 11

	1	2	3	
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
8F4 VH	EVQLVESGG	DLVKPGGSLK	LSCAASGFTF	<u>SGYGM</u> SWVRQ
Hu8F4 VH	EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	<u>SGYGM</u> SWVRQ
U96282 VH	EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	S-----WVRQ
	4	5	6	7
	0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
		a		
8F4 VH	TPDKRLEWVA	<u>TISSGGSY</u> TYYPDSVKGRFTI	SRDNAKNTLY	
Hu8F4 VH	APGKGLEWVA	<u>TISSGGSY</u> TYYPDSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	
U96282 VH	APGKGLEWVA	-----RFTI	SRDNAKNSLY	
	8	9	1	1
	0122223456789	0123456789	00000000123456789	0123
	abc		abcdefg	
8F4 VH	LQMSSLKSEDTAM	YYCARHEGGY	<u>YGSSPAWFVYWGQ</u> GTLV	TLSA
Hu8F4 VH	LQMNSLRAEDTAV	YYCARHEGGY	<u>YGSSPAWFVYWGQ</u> TMV	TVSS
U96282 VH	LQMNSLRAEDTAV	YYCAR-----	-----WGQTMV	TVSS

Фиг. 12

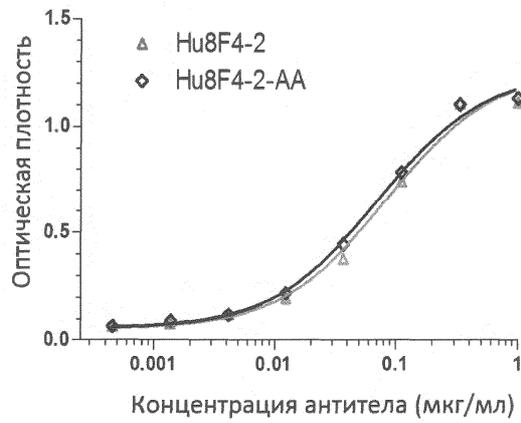
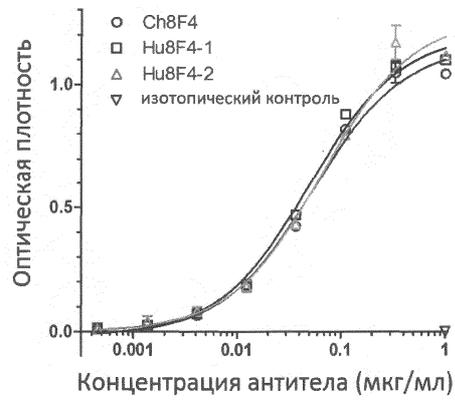
	1	2	3	
	23456789	0123456789	0123456789	0123456789
8F4 VL	IVMTQSHK	FMSTSVGDRV	SITCKASQDV	<u>STAVAWY</u> QQK
Hu8F4 VL1	IQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCKASQDV	<u>STAVAWY</u> QQK
Hu8F4 VL2	IQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCKASQDV	<u>STAVAWY</u> QQK
AY043146 VL	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITC-----	-----WYQQK
	5	6	7	
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
8F4 VL	GQSPKLLIY	<u>STSYRYT</u> GVP	DRFTGSGSGT	VFTFTINSVQ
Hu8F4 VL1	GKAPKLLIY	<u>STSYRYT</u> GVP	SRFSGSGSGT	<u>VFTFTISSLQ</u>
Hu8F4 VL2	GKAPKLLIY	<u>STSYRYT</u> GVP	SRFSGSGSGT	<u>DFTFTISSLQ</u>
AY043146 VL	PGKAPKLLIY	-----GVP	SRFSGSGSGT	<u>DFTFTISSLQ</u>
		1		
		9	0	
	123456789	0123456789	01234567	
8F4 VL	EDLAVYYCQ	<u>QHFITP</u> PPTFG	GGTKLEIK	
Hu8F4 VL1	EDIATYYCQ	<u>QHFITP</u> PPTFG	GGTKVEIK	
Hu8F4 VL2	EDIATYYCQ	<u>QHFITP</u> PPTFG	GGTKVEIK	
AY043146 VL	PEDIATYYC-	-----FG	GGTKVEIK	

Фиг. 13



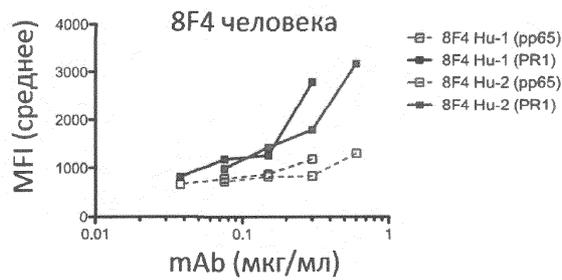
Фиг. 14

Связывание с PR1/HLA-A2

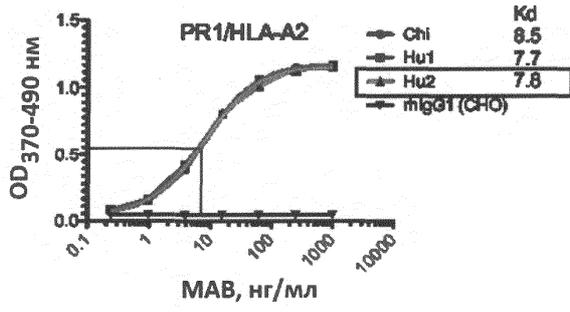


Фиг. 15

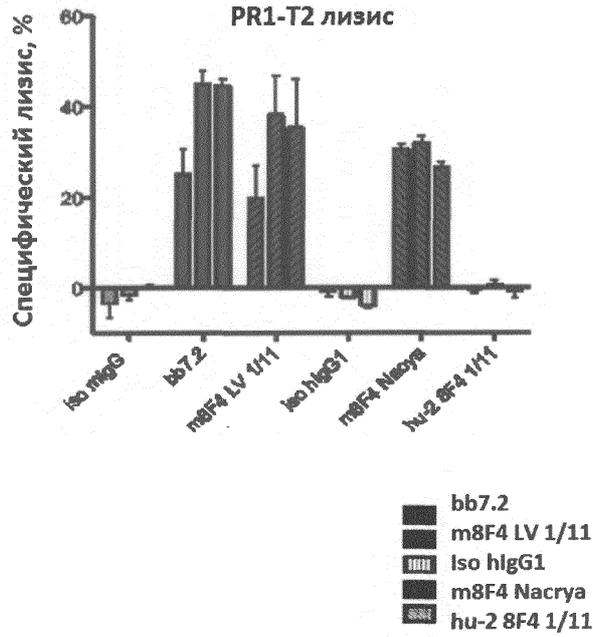
Специфичность, аффинность, CDC-тест  
FASC (T2-клетки)



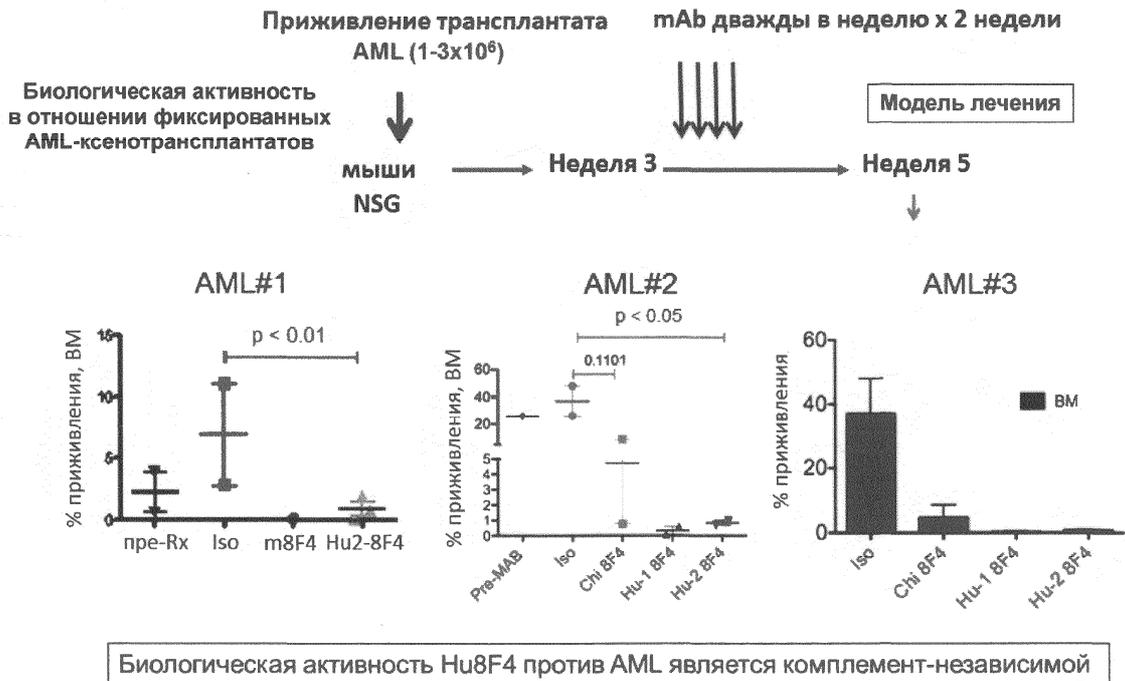
Фиг. 16А



Фиг.16В



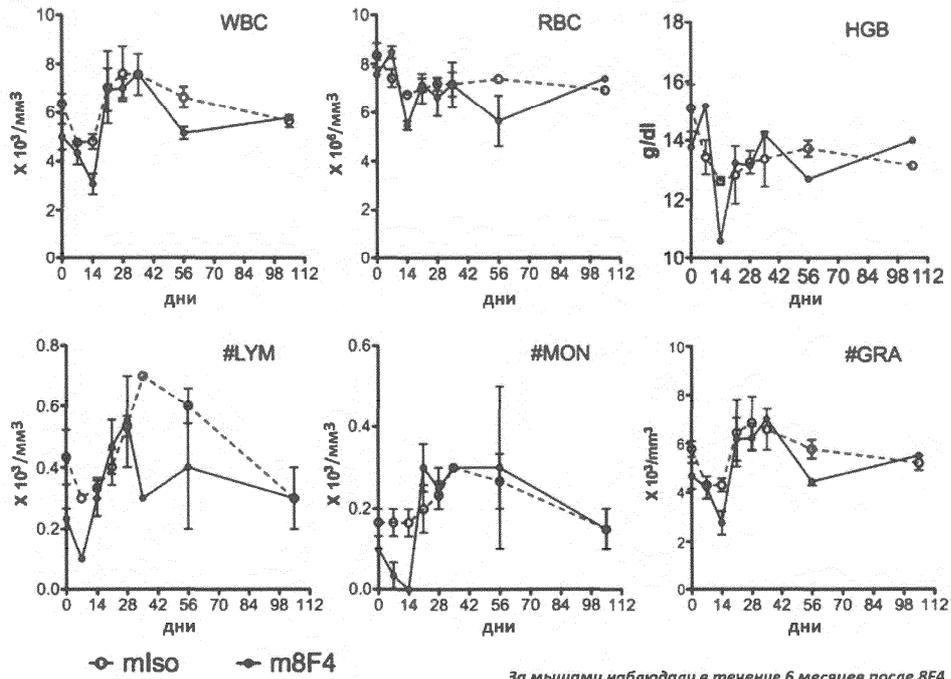
Фиг. 16С



Фиг. 17

mAb: 8F4 vs IgG 10 мг/кг

Мышиная модель: PR1/HLA-A2+ мыши NOD scid

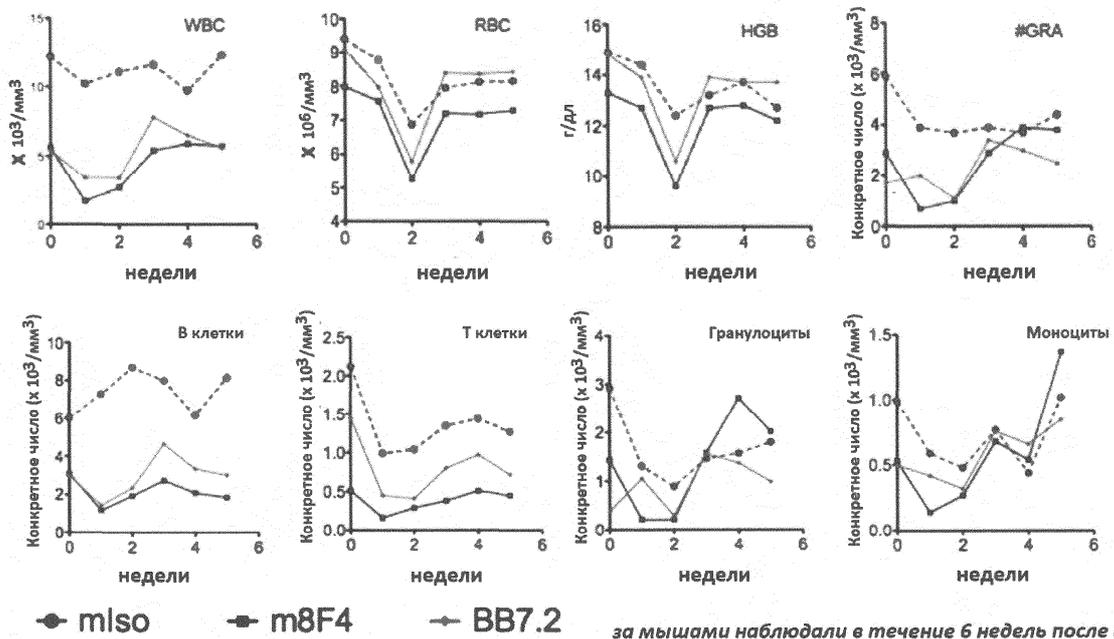


За мышами наблюдали в течение 6 месяцев после 8F4

Фиг. 18

mAb: 8F4 или IgG 10 мг/кг

Мышиная модель: PR1/HLA-A2+ мыши B6

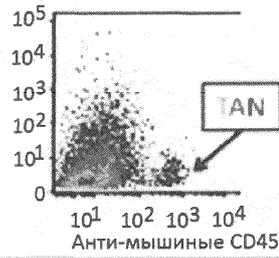
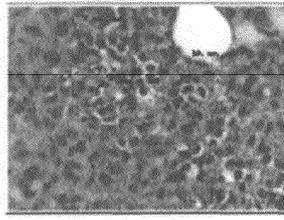


за мышами наблюдали в течение 6 недель после 8F4

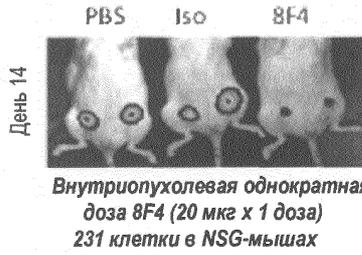
Фиг. 19

8A4 замедляет рост опухоли рака молочной железы и удлиняет продолжительность жизни

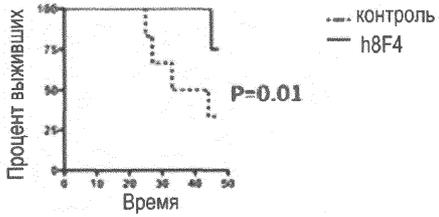
**A. Опухоль-ассоциированные нейтрофилы в 231 BgCA ксенотрансплантанных опухолях**



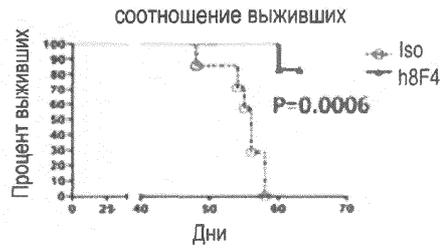
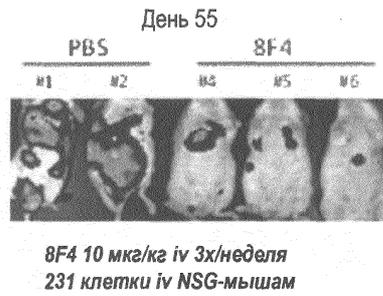
**B. Модель первичной опухоли**



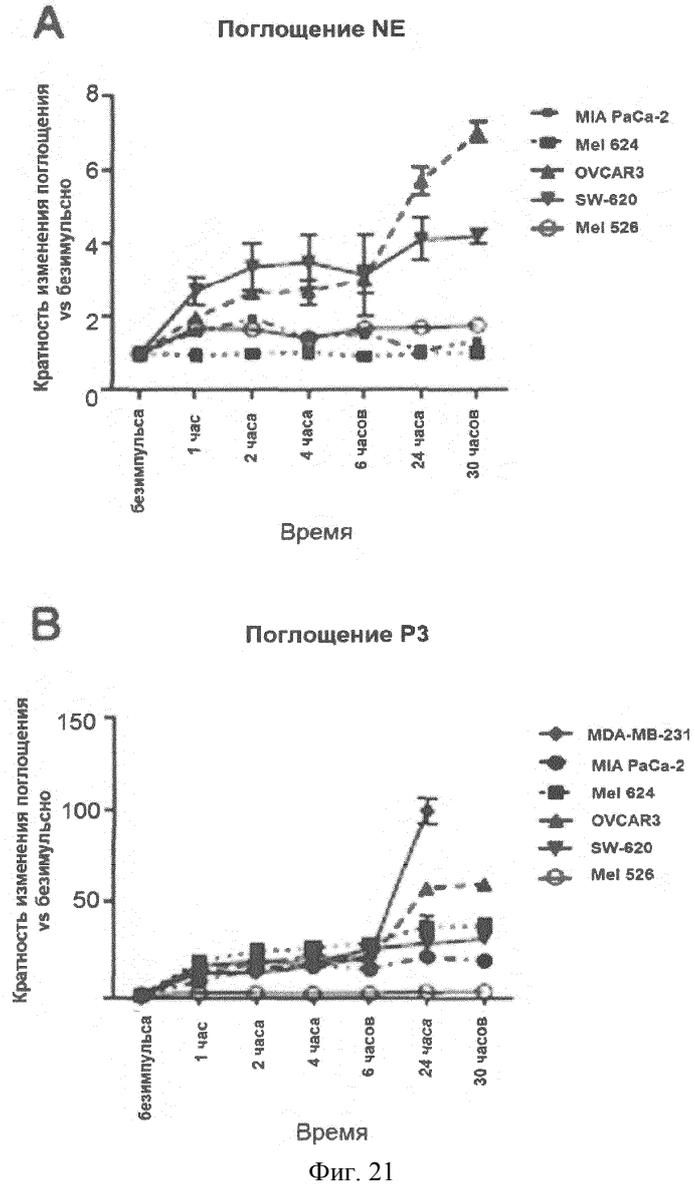
Выжившие 2 групп: соотношение выживших



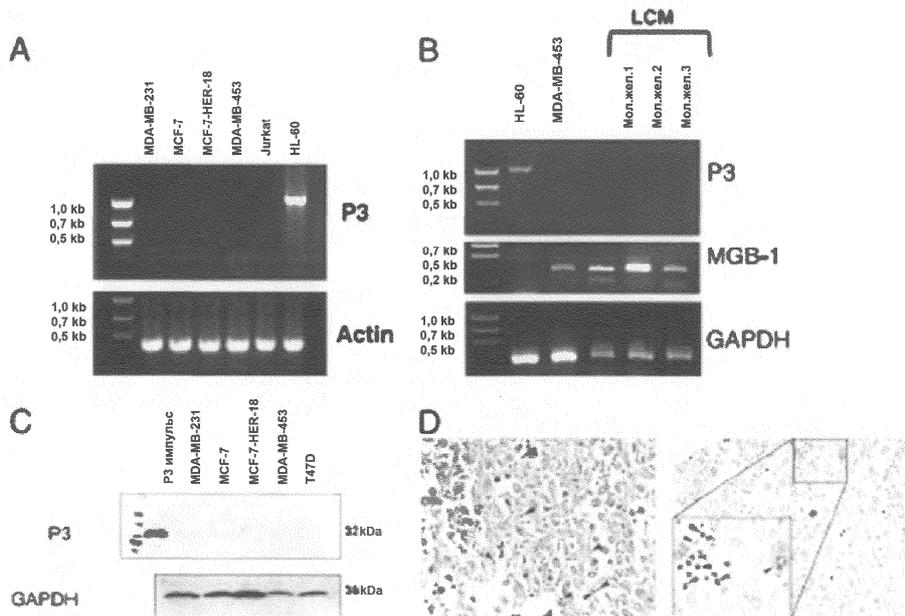
**C. Модель метастазирующей опухоли**



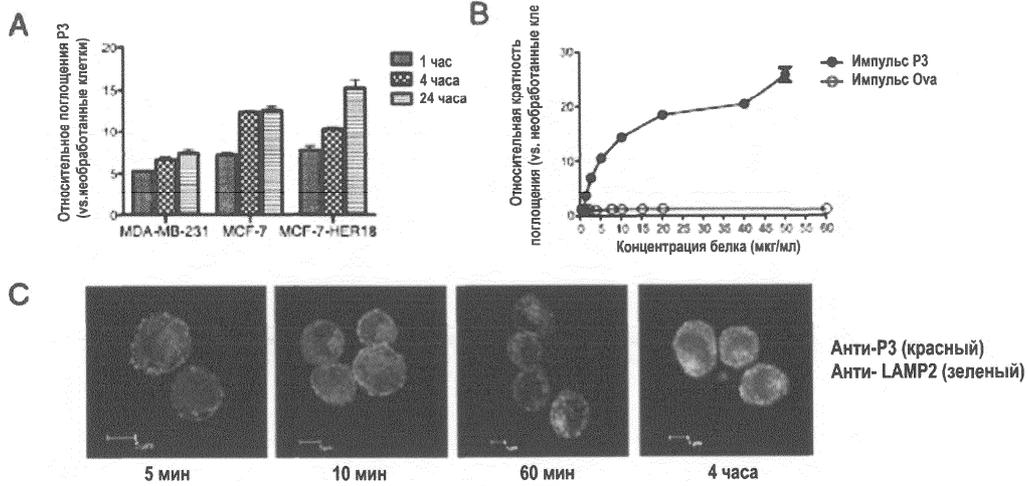
Фиг. 20



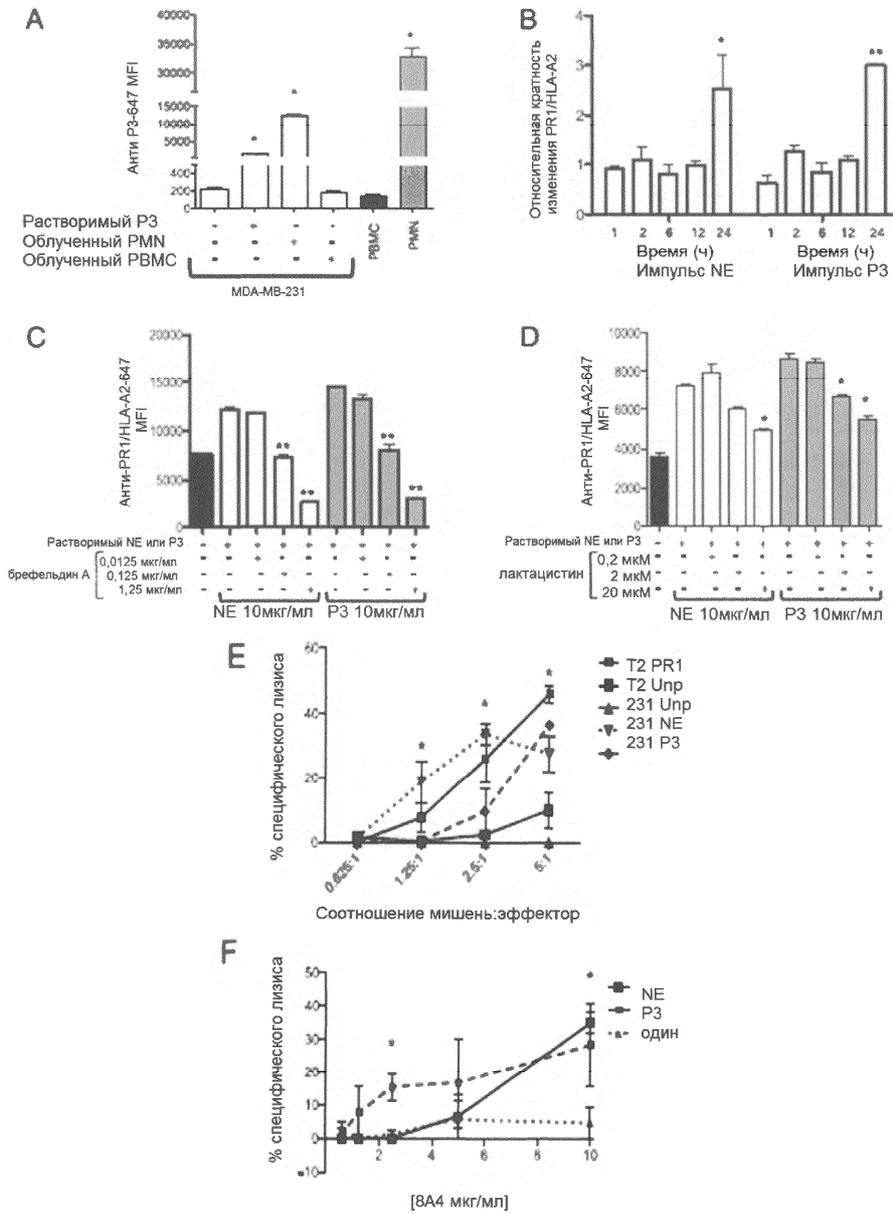
Фиг. 21



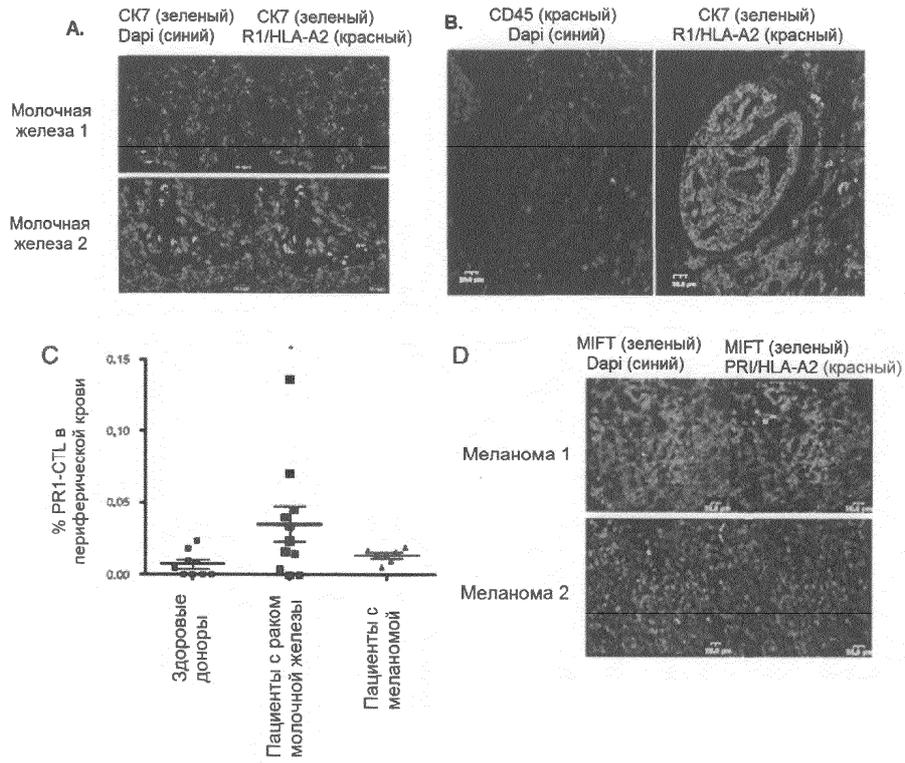
Фиг. 22



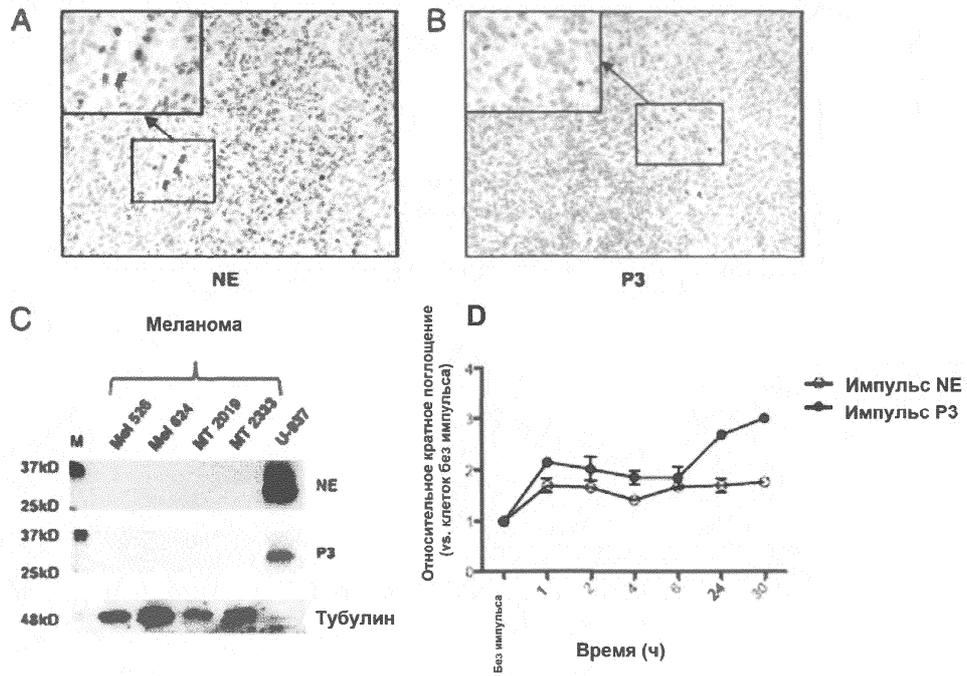
Фиг. 23

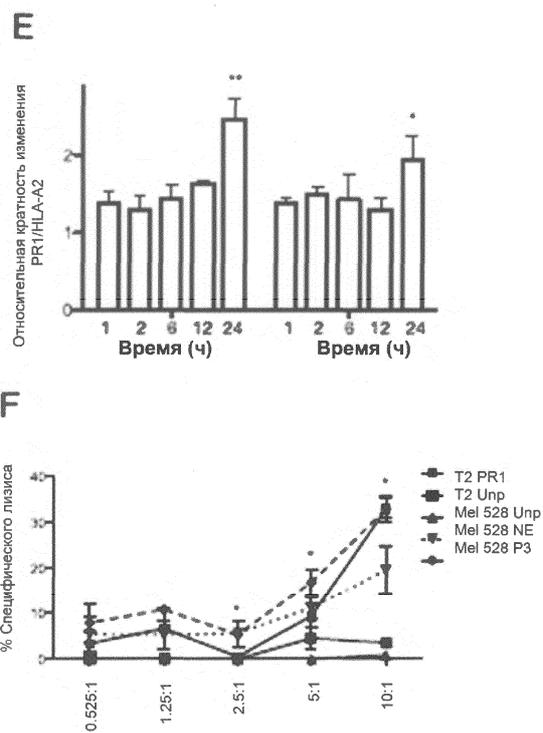


Фиг. 24



Фиг. 25





Фиг. 26

