

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038798**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.21

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

(21) Номер заявки
201790465

(22) Дата подачи заявки
2015.08.26

(54) АНТИ-В7Н3 АНТИТЕЛА И СВЯЗАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/042,457**

(32) **2014.08.27**

(33) **US**

(43) **2017.07.31**

(86) **PCT/US2015/047013**

(87) **WO 2016/033225 2016.03.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
КЭНСЕР СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:
**Чеунг Най-Конг В., Ахмед Махмуддин,
Чжао Ци (US)**

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

(56) **US-A1-20100143245
WO-A2-2011109400**

LEMKE et al. "Costimulatory Protein 4IgB7H3 Drives the Malignant Phenotype of Glioblastoma by Mediating Immune Escape and Invasiveness," Clinical Cancer Research, 11 November 2011 (11.11.2011), Vol 2012, Pgs 105-117 entire document

ONDA et al. "In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma and neuroblastoma " Cancer Research, 15 February 2004(15.02.2004), Vol 64, Pgs 1419-1424 entire document

AHMED et al. "Humanized Affinity-matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Antitumor Activity and Binds to FG Loop of Tumor Antigen B7-H3," Journal of Biological Chemistry, 20 October 2015 (20.10.2015), Vol 290, Pgs 30018-3009 entire document

(57) Изобретение относится к антителу или его антиген-связывающему фрагменту для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, к способу лечения рака с B7H3-позитивными опухолевыми клетками с помощью указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, к способу модуляции иммунной системы с помощью указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, к способу усиления Т-клеточной цитотоксичности у пациента с помощью указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, к ДНК и РНК, кодирующим указанное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, к клетке для экспрессии указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, к способу получения такой клетки.

B1**038798****038798****B1**

Список последовательностей

Настоящее спецификация содержит ссылки на список последовательностей (представленный в электронном виде в виде текстового (расширение.txt) файла с названием "2003080-0937 SL.txt" от 26-го августа 2015 года). Файл.txt был создан 31-го июля 2015 года и имеет размер 129896 байт. Полное содержимое списка последовательностей включено в данное описание путем ссылки. В приведенном ниже описании последовательностей указано название последовательностей из списка последовательностей.

Уровень техники

Опухоли часто создают микросреду, которая подавляет иммунную систему. На удалении этого иммунологического блока сфокусировано множество усилий по разработке эффективных методов лечения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым антителам, которые связываются с B7H3. В некоторых вариантах осуществления такие антитела имеют существенную идентичность по последовательности с 8H9. В некоторых вариантах осуществления предложенные антитела представляют гуманизированные варианты 8H9 со зрелой аффинностью.

В некоторых вариантах осуществления предложенные антитела связываются с эпитопом в B7H3, который распознается 8H9. Помимо всего прочего, настоящее изобретение относится к открытию того, что m8H9 и его гуманизированные варианты связываются с отдельным эпитопом на B7H3, который не распознается некоторыми другими антителами к B7H3. Поэтому, настоящее изобретение относится к полезному набору новых антител таких, которые не являются m8H9, но связываются с тем же эпитопом.

Настоящее изобретение относится к антительному агенту, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3 и включает легкую цепь иммуноглобулина, приведенную в последовательности SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и включает тяжелую цепь иммуноглобулина, приведенную в последовательности SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16.

В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 1, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 1, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 2, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 2, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 3, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 3, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 4, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 4, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 2, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 2, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 3, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 3, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 5, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 5, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 6, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 6, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 7, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 7, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 8, и тяжелая цепь иммуноглобулина приведена в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, имеющее легкие цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 8, и тяжелые цепи иммуноглобулина, приведенные в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления легкая

цепь иммуноглобулина содержит остаток треонина в положении 20 и остаток тирозина в положении 34, причем тяжелая цепь иммуноглобулина содержит остаток треонина в положении 24, остаток глицина в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56 и остаток глицина в положении 102.

Настоящее изобретение относится к мышинному антителу 8H9, в котором легкие цепи иммуноглобулина включают остаток треонина в положении 20 и остаток тирозина в положении 34, и в котором тяжелые цепи иммуноглобулина включают остаток треонина в положении 24, остаток глицина в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56 и остаток глицина в положении 102.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител, раскрытых в настоящем описании, включает один или несколько из остатка треонина в положении 20 и остатка тирозина в положении 34 легкой цепи иммуноглобулина, и остатка треонина в положении 24, остатка глицина в положении 42, остатка аспарагиновой кислоты в положении 56 и остатка глицина в положении 102 тяжелой цепи иммуноглобулина, или включает их гомологичную аминокислотную замену в любом из этих положений.

В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина слита с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител, раскрытых в настоящем описании, конъюгировано с терапевтическим агентом или детектируемым агентом.

В некоторых вариантах осуществления любой из антительных агентов, раскрытых в настоящем описании, включая антитела, конъюгирован с радиоизотопом, лекарственным средством, наночастицей, иммунотоксином или любой другой полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления любой из антительных агентов, раскрытых в настоящем описании, включая антитела, конъюгирован с диагностическим или визуализирующим агентом, или с ними обоими.

В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антительный агент имеет первую и вторую специфичность связывания, причем первая специфичность относится к связыванию с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, а вторая специфичность относится к связыванию с CD3 на Т-клетках или DOTA.

Настоящее изобретение относится к scFv, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3 и включает полипептид, представленный в последовательности SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27.

В некоторых вариантах осуществления полипептид из scFv включает треонин в положении 24, глицин в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56, остаток глицина в положении 102, остаток треонина в положении 153 и остаток тирозина в положении 167.

В некоторых вариантах осуществления scFv включает один или несколько из треонина в положении 24, глицина в положении 42, остатка аспарагиновой кислоты в положении 56, остатка глицина в положении 102, остатка треонина в положении 153 и остатка тирозина в положении 167, или включает их гомологичную аминокислотную замену в любом из этих положений.

В некоторых вариантах осуществления полипептид из scFv слит со вторым полипептидом, представленным в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления scFv конъюгирован с терапевтическим агентом или детектируемым агентом.

В некоторых вариантах осуществления любой из scFv, раскрытых в настоящем описании, является частью химерного рецептора антигена.

Настоящее изобретение относится к антительному агенту, который специфически связывается с эпитопом, представленным в SEQ ID NO: 32 и расположенным в FG-петле V-домена белка 2Ig-B7H3 и V1- и V2-доменов белка 4Ig-B7H3, причем антительный агент не является m8H9.

Настоящее изобретение относится к антительному агенту, который специфически связывается с FG-петлей V-домена белка 2Ig-B7H3 и V1- и V2-доменов белка 4Ig-B7H3 с K_D ниже 2 нМ, причем антительный агент не является m8H9.

В некоторых вариантах осуществления любой из антительных агентов, раскрытых в настоящем описании, подавляет ингибирующее действие B7H3 на пролиферацию и функции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любой из антительных агентов, раскрытых в настоящем описании, подавляет ингибирующее действие B7H3 на активность и функции NK-клеток.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей любое из антительных агентов, scFv или гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого одного или нескольких из антительных агентов, scFv, гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу модуляции иммунной системы, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого одного или не-

скольких антительных агентов, scFv, гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу лечения рака, причем указанный способ включает стадии введения субъекту композиции, включающей анти-B7H3 антительный агент, который связывается с FG-петлей белка B7H3.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой или включает нейробластому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой или включает рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак включает B7H3-положительные опухолевые клетки.

Настоящее изобретение относится к способу усиления опосредованной Т-клетками цитотоксичности у субъекта, причем указанный способ включает стадии введения субъекту композиции, включающей анти-B7H3 антительный агент, который связывается с FG-петлей белка B7H3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент представляет собой или включает антительный агент 8H9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 39, 40, 45, 46, 51 и 52.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 и 54.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 и 56.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 и 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59, 60, 65, 66, 71, 72, 77 и 78.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61, 62, 67, 68, 73, 74, 79 и 80.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 39, 40, 45, 46, 51 и 52; последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 и 54; и последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 и 56.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 и 76; последовательность CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59, 60, 65, 66, 71, 72, 77 и 78; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61, 62, 67, 68, 73, 74, 79 и 80.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент 8H9 включает полипептид, который включает последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 39, 40, 45, 46, 51 и 52; последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 и 54; и последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 и 56; и последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 и 76; последовательность CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59, 60, 65, 66, 71, 72, 77 и 78; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61, 62, 67, 68, 73, 74, 79 и 80.

В некоторых вариантах осуществления любой из антительных агентов, раскрытых в данном описании, включает или состоит из антитела 8H9 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело 8H9 представляет собой или включает m8H9, h8H9 или ham8H9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело 8H9 содержит тяжелую цепь, представленную в одной из SEQ ID NO: 9-16, и легкую цепь, представленную в одной из SEQ ID NO: 1-8.

В некоторых вариантах осуществления любой из антительных агентов, раскрытых в настоящем описании, конкурирует с антителом 8H9 за связывание с B7H3.

Настоящее изобретение относится к ДНК или РНК, кодирующей любой из антительных агентов или их фрагментов, раскрытых в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к клетке, которая экспрессирует любой из антительных агентов

или их фрагментов, раскрытых в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу получения клетки, экспрессирующей антительный агент или его фрагмент, включающему трансфекцию или вирусную трансдукцию клетки с ДНК или РНК, кодирующей любой из антительных агентов, раскрытых в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления вирусная трансдукция клетки происходит в организме пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой NK-клетку.

Настоящее изобретение относится к вакцине, включающей любую из ДНК или РНК, раскрытых в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу вакцинации пациента, включающему введение любой из вакцин, раскрытых в настоящем описании, пациенту, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления пациент является представителем семейства собачьих или кошачьих.

Настоящее изобретение относится к химерным рецепторам антигена, включая любой из антительных агентов или их фрагментов, раскрытых в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления ДНК или РНК кодирует химерный рецептор антигена.

Настоящее изобретение относится к клетке, экспрессирующей любой из химерных рецепторов антигена, раскрытых в настоящем описании (например, Т-клетке или NK-клетке).

Настоящее изобретение относится к способу получения клетки, включающему трансфекцию или вирусную трансдукцию клетки с любой из ДНК или РНК, раскрытых в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу адаптивной клеточной терапии, включающему стадию введения терапевтически эффективного количества любой из клеток, раскрытых в настоящем описании, нуждающемуся в этом пациенту.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, путем целенаправленного действия на пептидный эпитоп, представленный в SEQ ID NO: 32, включающему введение любого из антительных агентов или их фрагментов, раскрытых в настоящем описании, нуждающемуся в этом пациенту.

В некоторых вариантах осуществления пациент выбран из группы, включающей человека, собаку, кошку, шимпанзе, орангутанга, гиббона, макаку, игрунку, свинью, лошадь, панду и слона.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, включающему любую из клеток, раскрытых в настоящем описании, нуждающемуся в этом пациенту.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, включающему введение вируса, включающего ДНК или РНК, кодирующую любой из антительных агентов или их фрагментов, раскрытых в настоящем описании, нуждающемуся в этом пациенту.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента с помощью компартментной радиоиммунотерапии (сRIT), включающему введение любого из антительных агентов или их фрагментов, раскрытых в настоящем описании, нуждающемуся в этом пациенту.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят интрастекально, внутрибрюшинно или с помощью конвекционно усиленной доставки.

Краткое описание чертежей

Включенные в данный документ чертежи, которые состоят из следующих фигур, предназначены исключительно для иллюстративных целей, а не для ограничения изобретения.

На фиг. 1 показана ленточная диаграмма кристаллической структуры ch8H9 Fab. А: боковой вид Fab, показывающий отдельные Ig-домены и определяющую комплементарность область (CDR). В: вид сверху вниз на антигенсвязывающий участок, показывающий ориентацию 6 петель CDR. С: электростатический потенциал поверхности антигенсвязывающего участка, представленный от отрицательно заряженного (красный) до положительно заряженного (синий) в диапазоне от -1 до +1 кТ/е.

Фиг. 2 иллюстрирует предложенную стратегию создания гуманизированных и аффинно-зрелых антител 8H9 или их антигенсвязывающих фрагментов.

На фиг. 3 показана кинетика связывания мышиного 8H9 (m8H9) и химерного мышь/человек 8H9 (ch8H9) IgG-антител с 2Ig-B7H3-Fc, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 4 показаны результаты твердофазного ИФА (ELISA), в котором различные концентрации ch8H9 и гуманизированных вариантов 8H9-IgG (H1L1, H1L2, H2L1 и H2L2) связывались с 4Ig-B7H3.

На фиг. 5 показано обнаружение с помощью ELISA биотинилированного антигена B7H3-mFc с использованием серийно разведенного HRP-стрептавида (А) или ch8H9 IgG (В).

На фиг. 6 показаны данные проточной цитометрии, ассоциированные с созреванием аффинности гуманизированного (hu) 8H9 H3L3 scFv.

На фиг. 7 показано сравнение дрожжевых клеток, представляющих hu8H9 H3L3 scFv (слева), и дрожжевых клеток, полученных из последнего/седьмого раунда сортировки клеток (справа). Дрожжевые клетки окрашивали 0,1 или 1 мкг/мл B7H3-mFc, а затем детектировали конъюгированными с APC козы-

ми антителами против мышиных антител.

На фиг. 8 показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариантов одноцепочечных Fv (scFvs) hu8H9, полученных из седьмого раунда сортировки клеток, как описано.

Данные о последовательностях для сильно связывающих белков были сгруппированы с помощью кластерного анализа. Следующие пять вариантов scFv были отобраны многократно: S7.2, S7.17, S7.22, S7.28 и S7.29. S3.3 является scFv, полученным из третьего раунда сортировки клеток. 8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 87); 8H9S3.3 (SEQ ID NO: 88); 8H9S7.2 (SEQ ID NO: 89); 8H9S7.3 (SEQ ID NO: 90); 8H9S7.4 (SEQ ID NO: 91); 8H9S7.5 (SEQ ID NO: 92); 8H9S7.6 (SEQ ID NO: 93); 8H9S7.7 (SEQ ID NO: 94); 8H9S7.8 (SEQ ID NO: 95); 8H9S7.9 (SEQ ID NO: 96); 8H9S7.17 (SEQ ID NO: 97); 8H9S7.18 (SEQ ID NO: 98); 8H9S7.19 (SEQ ID NO: 99); 8H9S7.20 (SEQ ID NO: 101); 8H9S7.21 (SEQ ID NO: 101); 8H9S7.22 (SEQ ID NO: 102); 8H9S7.27 (SEQ ID NO: 103); 8H9S7.28 (SEQ ID NO: 104); 8H9S7.29 (SEQ ID NO: 105).

На фиг. 9 показаны результаты экспериментов ELISA, в которых варианты hu8H9 scFv связывались с 4Ig-B7H3 (слева) и 2Ig-B7H3 (справа).

На фиг. 10 показаны результаты экспериментов, в которых варианты hu8H9 scFv связывались с клетками нейробластомы M14. Опухолевые клетки окрашивали 1 мкг/мл hu8H9 scFv H3L3 (синий), S3.3 (оранжевый), S7.22 (зеленый) или контролем изотипа антител (красный) и анти-His антителом. Связывание определяли количественно с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 11 показана кинетика связывания IgG-антител ch8H9 и hu8H9 H1L2, H3L3, 3.1 и 5.1 с 4Ig-B7H3-Fc, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 12 показана кинетика связывания IgG-антител ch8H9 и hu8H9 H1L2, H3L3, 3.1 и 5.1 с 2Ig-B7H3-mFc, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 13 показаны результаты экспериментов, в которых IgG-варианты ch8H9 и hu8H9 связывались с клетками нейробластомы M14. Связывание определяли количественно с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 14 показана *in vitro* антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) для конструкций антител 8H9 в отношении клеток B7-H3(+)-нейробластомы LAN-1, с использованием PBMC человека в качестве эффекторных клеток. Цитотоксичность измеряли по высвобождению хрома-51.

На фиг. 15 показано биораспределение ¹³¹I-меченных антителных агентов 8H9, введенных с помощью инъекции бестимусным голым мышам, с привитыми подкожно опухолями нейробластомы LAN-1.

На фиг. 16 показано графическое изображение моделированного связывания между ch8H9 и huB7H3. IRDF (SEQ ID NO: 32) указан стрелкой.

На фиг. 17 показана кинетика связывания анти-B7H3 IgG-антител (ch8H9, M1H42, 6A1) и клона 185504 с 2Ig-B7H3-mFc дикого типа и мутантами 2Ig-B7H3-mFc (R127A и D128A), определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 18 показана кинетика связывания анти-B7H3 IgG-антител hu8H9 (3.1 и 5.1) с 2Ig-B7H3-mFc дикого типа и мутантами 2Ig-B7H3-mFc (R127A и D128A), определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 19 показаны результаты экспериментов, в которых пролиферацию Т-клеток измеряли в присутствии CD3/CD8-активирующих шариков и в присутствии или в отсутствие клеток B7H3-положительной нейробластомы IMR-32.

На фиг. 20 показаны результаты экспериментов, в которых пролиферацию Т-клеток измеряли в присутствии CD3/CD8-активирующих шариков и клеток B7H3-положительной нейробластомы IMR-32, и возрастающих концентраций ch8H9.

На фиг. 21 показаны результаты экспериментов, в которых измерялась опосредованная Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток карциномы шейки матки человека (HeLa). Клетки карциномы были предварительно обработаны биспецифическим антителом Her2xCD3 отдельно или совместно этим антителом и дополнительно m8H9 IgG.

Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO.: 1 (легкая цепь ch8H9) является

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIISGIPSRFSG
SGSGSDFTLISINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 2 (легкая цепь hu8H9 L1) является
 EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIIDYLHWYQQKPGQAPRLIKYASQISGIPARFSG
 SSGSGTEFTLTISVQPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 3 (легкая цепь hu8H9 L2) является
 EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIIDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQISGIPARFSG
 SSGSGTEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 4 (легкая цепь hu8H9 L3) является
 EIVMTQSPATLSVSPGERVSLRASQSIIDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQISGIPARFSG
 SSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 5 (легкая цепь hu8H9 3.1) является
 EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIIDYLWYQQKSHESPRLLIKYASQISGIPARFSG
 SSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 6 (легкая цепь hu8H9 4.1) является
 EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIIDYLHWYQQKSHQAPRLIKYASQISGIPARFSG
 SSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 7 (легкая цепь hu8H9 5.1) является
 EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIIDYLWYQQKSHQAPRLIKYASQISGIPARFSG
 SSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 8 (легкая цепь ch8H9 6.1; ch8H9+6
 мутаций после созревания аффинности) является
 DIVMTQSPATLSVTPGDRVTLRASQSIIDYLWYQQKSHESPRLLIKYASQISGIPSRFSG
 SSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 9 (тяжелая цепь ch8H9) является
 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 10 (тяжелая цепь hu8H9 H1) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 11 (тяжелая цепь hu8H9 H2) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDTSTSTAYMELSSRLTSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 12 (тяжелая цепь hu8H9 H3) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 13 (тяжелая цепь hu8H9 3.1) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
 KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS

SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 14 (тяжелая цепь hu8H9 4.1) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGTTLVTSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 15 (тяжелая цепь hu8H9 5.1) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTTLVTSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 16 (тяжелая цепь ch8H9 6.1; ch8H9+6
мутаций после созревания аффинности) является
QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTTLVTSSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 17 (hu8H9 H3L3 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGTTLVTSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSSIDYLNHWYQQKSHEPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 18 (hu8H9 клон S3.3 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF

KGKATLT TDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARQTTATWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 19 (hu8H9 клон S7.2 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASCKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQG LEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLT TDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARQTTATWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
GGVGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 20 (hu8H9 клон S7.17 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQG LEWVGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLT TDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARQTTSTWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQPI SDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGYSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 21 (hu8H9 клон S7.22 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQG LEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGKATLT TDTSTSTAYMELSSLRPED TAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 22 (hu8H9 клон S7.28 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQG LEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLT TDTSTSTAYMELSSLGSED TAVYFCTRQTTATWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
SGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 23 (hu8H9 клон S7.29 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQG LEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLT TDTSTSTAYLELSSLGSED TAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 24 (hu8H9 3.1 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQG LEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGKATLT TDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 25 (hu8H9 4.1 scFv) является
QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTNYDINWVRQRPQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGRVTMT TDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYFCARQTTATWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGS

GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSSISDYLHWYQQKSHQAPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 26 (hu8H9 5.1 scFv) является

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKTSGYTFITNYDINWVRQRPQGQLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGRVTMTTDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYFCARQTTGTWTFAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSSISDYLHWYQQKSHQAPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 27 (ch8H9 6.1 scFv) является

QVQLQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFITNYDINWVRQRPQGQLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWTFAYWGQGTTLVTVSAGGGSGGGGS
GGGGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVTLSCRASQSSISDYLHWYQQKSHSPRLLIKYASQSSISGIP
SRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKR

SEQ ID NO.: 28 (линкер huOKT3 (анти-CD3) scFv)

является

GGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIG
YINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGT
PVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAP
KRWIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

SEQ ID NO.: 29 (линкер C825 (анти-DOTA) scFv)

является

GGGGSGGGSGGGGSHVKLQESGPGVLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLG
VIWGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGGGT
TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPD
HCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLT
VLG

SEQ ID NO.: 30 (линкер huOKT3 (анти-CD3) scFv)

является

GGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIG
YINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGT
PVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAP
KRWIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

SEQ ID NO.: 31 (линкер C825 (анти -DOTA) scFv)

является

GGGGSGGGSGGGGSHVKLQESGPGVLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLG
VIWGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGGGT
TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPD

HCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLT
VLG

SEQ ID NO.: 32 является IRDF

	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Кабат			
<i>m8h9, ch8H9</i>	RASQSIDYLH	YASQSIDY	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 33	SEQ ID NO.: 35	SEQ ID NO.: 37
<i>Hu8H9 3.1, 5.1</i>	RASQSIDYLY	YASQSIDY	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 34	SEQ ID NO.: 36	SEQ ID NO.: 38
Чотия			
<i>m8h9, ch8H9</i>	SQSIDY	YAS	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 39	SEQ ID NO.: 41	SEQ ID NO.: 43
<i>Hu8H9 3.1, 5.1</i>	SQSIDY	YAS	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 40	SEQ ID NO.: 42	SEQ ID NO.: 44
Хонегер			
<i>m8h9, ch8H9</i>	ASQSIDY	YASQSIDGIPSR	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 45	SEQ ID NO.: 47	SEQ ID NO.: 49
<i>Hu8H9 3.1, 5.1</i>	ASQSIDY	YASQSIDGIPAR	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 46	SEQ ID NO.: 48	SEQ ID NO.: 50
IMGT			
<i>m8h9, ch8H9</i>	QSIDY	YAS	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 51	SEQ ID NO.: 53	SEQ ID NO.: 55
<i>Hu8H9 3.1, 5.1</i>	QSIDY	YAS	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 52	SEQ ID NO.: 54	SEQ ID NO.: 56
	CDRH1	CDRH2	CDRH3
Кабат			
<i>m8h9, ch8H9</i>	NYDIN	WIFPGDGSTQYNEKFKG	QTTATWFAY

	SEQ ID NO.: 57	SEQ ID NO.: 59	SEQ ID NO.: 61
Hu8H9 3.1,	NYDIN	WIFPGDDSTQYNEKFKG	QTTGTWFAY
5.1	SEQ ID NO.: 58	SEQ ID NO.: 60	SEQ ID NO.: 62
Чотия			
m8h9, ch8H9	GYTFTNY	PGDG	TTATWFA
	SEQ ID NO.: 63	SEQ ID NO.: 65	SEQ ID NO.: 67
Hu8H9 3.1,	GYTFTNY	PGDD	TTGTWFA
5.1	SEQ ID NO.: 64	SEQ ID NO.: 66	SEQ ID NO.: 68
Хонегер			
m8h9, ch8H9	ASGYTFTNYD	IFPGDGSTQYNEKFKGKA	QTTATWFA
	SEQ ID NO.: 69	SEQ ID NO.: 71	SEQ ID NO.: 73
Hu8H9 3.1,	TSGYTFTNYD	IFPGDDSTQYNEKFKGRV	QTTGTWFA
5.1	SEQ ID NO.: 70	SEQ ID NO.: 72	SEQ ID NO.: 74
IMGT			
m8h9, ch8H9	GYTFTNYD	IFPGDGST	ARQTTATWFAY
	SEQ ID NO.: 75	SEQ ID NO.: 77	SEQ ID NO.: 79
Hu8H9 3.1,	GYTFTNYD	IFPGDDST	ARQTTGTWFAY
5.1	SEQ ID NO.: 76	SEQ ID NO.: 78	SEQ ID NO.: 80
SEQ ID NO.: 81 является TCAGTTTTGGCCCAGGCGGCC			
SEQ ID NO.: 82 является ACCACTAGTTGGGCCGGCCTG			
SEQ ID NO.: 83 является			
CTTCGCTGTTTTTCAATATTTTCTGTTATTGCTTCAGTTTTGGCCCAGGCGGCC			
SEQ ID NO.: 84 является			
GAGCCGCCACCCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCCACCACTAGTTGGGCCGGCCTG			
SEQ ID NO.: 85 является FVSIRDFG			
SEQ ID NO.: 86 является IQDF			

Определения

В этой заявке, если иное не ясно из контекста: (i) единственное число может означать "по меньшей мере один"; (ii) термин "или" может означать "и/или"; (iii) термины "содержащий" и "включающий", могут пониматься, как охватывающие перечисленные компоненты или стадии, представленные сами по себе или вместе с одним или несколькими дополнительными компонентами или стадиями; и (iv) термины "примерно" и "приблизительно" можно понимать как разрешающие стандартные вариации, понятные специалистам в данной области техники; и (v), если предусмотрены диапазоны, то конечные точки включены.

Введение: используемый в данном описании термин "введение" относится к введению композиции субъекту или в систему. Введение животному (например, человеку) может осуществляться любым подходящим способом. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может быть бронхиаль-

ным (включая бронхиальную инстилляцию), буккальным, энтеральным, интердермальным, внутриартериальным, интрадермальным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, внутрибрюшинным, интратекальным, внутривенным, интравентрикулярным, мукозальным, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, сублингвальным, местным, трахеальным (включая трахеальную инстилляцию), трансдермальным, вагинальным и витреальным. В некоторых вариантах осуществления введение может включать прерывистое введение. В некоторых вариантах осуществления введение может включать непрерывное введение (например, перфузию) по меньшей мере в течение указанного периода времени.

Аффинность: как известно специалистам в данной области техники, "аффинность" является мерой силы, с которой конкретный лиганд связывается со своим партнером. Аффинность может быть измерена различными способами. В некоторых вариантах осуществления аффинность измеряют с помощью количественного анализа. В некоторых таких вариантах осуществления связывания концентрация связывающего партнера может быть постоянной и избыточной относительно концентрации лиганда так, чтобы имитировать физиологические условия. В качестве альтернативы или дополнения, в некоторых вариантах осуществления концентрация связывающего партнера и/или концентрации лиганда может варьировать. В некоторых таких вариантах осуществления аффинность можно сравнить с эталоном при сравнимых условиях (например, концентрации).

Агент: термин "агент", используемый в данном описании, может относиться к соединению или представителю любого химического класса, включая, например, полипептиды, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды, низкомолекулярные соединения, металлы или их комбинации. Как будет ясно из контекста, в некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой или включает клетку или организм, либо их фракцию, экстракт или компонент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой или включает природный продукт в том, что он найден в и/или получен в природе. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой или содержит один или несколько элементов, которые являются рукотворными в том, что они созданы, сконструированы и/или получены руками человека и/или не найдены в природе. В некоторых вариантах осуществления агент может использоваться в выделенном или в чистом виде; в некоторых вариантах осуществления, агент может использоваться неочищенным. В некоторых вариантах осуществления потенциальные агенты представлены в виде коллекций или библиотек, например, которые могут быть подвергнуты скринингу для идентификации или характеристики активных агентов в них. Некоторые конкретные варианты агентов, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают низкомолекулярные соединения, антитела, фрагменты антител, аптамеры, нуклеиновые кислоты (например, кпНК, кшRNAs, ДНК/РНК-гибриды, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы), пептиды, пептидные миметики и т.д. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой или содержит полимер. В некоторых вариантах осуществления агент не является полимером и/или по существу свободен от любого полимера. В некоторых вариантах осуществления агент содержит по меньшей мере одну молекулу полимера. В некоторых вариантах осуществления агент не имеет или по существу свободен от какой-либо полимерной молекулы.

Аминокислота: используемый в данном описании термин "аминокислота" в самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которые могут быть включены в полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет общую структуру $H_2N-C(H)(R)-COOH$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой синтетическую аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой L-аминокислоту. "Стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, обычно встречающихся в природных пептидах. "Нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, кроме стандартных аминокислот, независимо от того, является ли она синтетической или полученной из природного источника. Используемый в данном описании термин "синтетическая аминокислота" охватывает химически модифицированные аминокислоты, включая, но не ограничиваясь ими, соли, производные аминокислот (такие как амиды) и/или замены. Аминокислоты, включая карбокси- и/или аминоконцевые аминокислоты в пептидах, могут быть модифицированы путем метилирования, амидирования, ацетилирования, с использованием защитных групп и/или замещения другими химическими группами, которые могут изменить время полужизни пептидов без отрицательного воздействия на их активность. Аминокислоты могут образовывать дисульфидную связь. Аминокислоты могут содержать одну или несколько посттрансляционных модификаций, таких как связь с одним или несколькими химическими соединениями (например, метильными группами, ацетатными группами, ацетильными группами, фосфатными группами, формильными молекулами, изопреноидными группами, сульфатными группами, полиэтиленгликольными молекулами, липидными молекулами, углеводными молекулами, молекулами биотина и т.д.). Термин "аминокислота" используется взаимозаменяемо с "аминокислотным остатком" и может относиться к свободной аминокислоте и/или к аминокислотному остатку в пептиде. Это будет очевидно из контекста, в котором используется термин, относится ли он к свободной аминокислоте или остатку в пептиде.

Аналог: используемый в данном описании термин "аналог" относится к веществу, которое разделяет один или несколько конкретных структурных признаков, элементов, компонентов или фрагменты с эталонным веществом. Как правило, "аналог" имеет значительное структурное сходство с эталонным веществом, например, имеет общие основную или консенсусную структуру, но также отличается по некоторым определенным характеристикам. В некоторых вариантах осуществления аналог представляет собой вещество, которое может быть создано из эталонного вещества с помощью химических манипуляций с эталонным веществом. В некоторых вариантах осуществления аналог представляет собой вещество, которое может быть создано посредством выполнения процесса синтеза, по существу подобному (например, имеющему общее число стадий) тому, с помощью которого получают эталонное вещество. В некоторых вариантах осуществления аналог представляет собой или может быть создан посредством выполнения процесса синтеза, отличающегося от того, который используется для получения эталонного вещества.

Животное: используемый в данном описании термин "животное" относится к любому члену царства животных. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к людям на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к животным, кроме человека, на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления животное является млекопитающим (например, грызуном, мышью, крысой, кроликом, обезьяной, собакой, кошкой, овцой, крупным рогатым скотом, приматом и/или свиньей). В некоторых вариантах осуществления животные включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может представлять собой трансгенное животное, генно-инженерное животное и/или клон.

Антагонист: используемый в данном описании термин "антагонист" относится к агенту, который i) ингибирует, уменьшает или снижает воздействие другого агента; и/или ii) ингибирует, уменьшает, снижает или задерживает одно или несколько биологических событий. Антагонисты могут представлять собой или включать агенты любого химического класса, включая, например, низкомолекулярные соединения, полипептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, металлы и/или любые другие молекулы, которые демонстрируют соответствующую ингибиторную активность. Антагонист может быть прямым (в этом случае он оказывает свое воздействие непосредственно на свою мишень) или косвенным (в этом случае он оказывает свое влияние другим путем, а не через связывание со своей мишенью, например, путем взаимодействия с регулятором мишени, например, таким образом, что изменяются уровень или активность мишени).

Антитело: используемый в данном описании термин "антитело" относится к полипептиду, который включает элементы канонической иммуноглобулиновой последовательности, являющиеся достаточными для придания специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно специалистам в данной области техники, интактные антитела, продуцируемые в природе, представляют собой тетрамерные агенты весом приблизительно 150 кД, состоящие из двух идентичных полипептидных тяжелых цепей (около 50 кДа каждая) и двух идентичных полипептидных легких цепей (приблизительно 25 кДа каждая), которые связаны друг с другом в такой форме, которую обычно называют "Y-образной" структурой. Каждая тяжелая цепь состоит по меньшей мере из четырех доменов (каждый около 110 аминокислот длиной) аминоконцевого варибельного домена (VH, расположен на концах Y-образной структуры) со следующими за ним тремя константными доменами: CH1, CH2 и карбокси-концевым CH3 (расположенным у основания стебля в Y-образной структуре). Короткая область, известная как "переключатель", соединяет варибельную и константные области тяжелой цепи. "Шарнир" соединяет CH2- и CH3-домены с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелых цепей друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь состоит из двух доменов - аминоконцевого варибельного домена (VL), за которым следует карбоксиконцевой константный домен (CL), отделенных друг от друга с помощью другого "переключателя". Интактные тетрамеры антител состоят из двух димеров тяжелой цепи и легкой цепи, в которых тяжелые и легкие цепи связаны друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелых цепей друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом, и образуется тетрамер. Продуцируемые в природе антитела также являются гликозилированными, как правило, в CH2-домене. Каждый домен в природном антителе имеет структуру, описываемую как "иммуноглобулиновая складка", образуемая двумя бета-листами (например, 3-, 4- или 5-цепочечными листами), упакованными относительно друг друга в сжатую антипараллельную бета-бочку. Каждый варибельный домен содержит три гиперварибельные петли, известные как "области, определяющие комплементарность" (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре достаточно инвариантные "каркасные" области (FR1, FR2, FR3 и FR4). При укладке природных антител FR-области образуют бета-листы, которые обеспечивают структурную основу доменов, а области петель CDR из обеих тяжелых и легких цепей сведены воедино в трехмерном пространстве таким образом, что они создают единый гиперварибельный антигенсвязывающий участок, расположенный на конце Y-структуры. Сравнения аминокислотных последовательностей среди полипептидных цепей антител определили два класса легких цепей (κ и λ), несколько классов тяжелых цепей (например,

μ, γ, α, ε, δ) и несколько подклассов тяжелых цепей (α1, α2, γ1, γ2, γ3 и γ4). Классы антител (IgA [включая IgA1, IgA2], IgD, IgE, IgG [включая IgG1, IgG2, IgG3, IgG4], IgM) определяются исходя из класса используемых последовательностей тяжелой цепи. Fc-область в природных антителах связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, включая, например, эффекторные клетки, которые опосредуют цитотоксичность. Как известно специалистам в данной области, аффинностью и/или другими связывающими свойствами Fc-области в отношении рецепторов Fc можно модулировать путем гликозилирования или других модификаций. В некоторых вариантах осуществления антитела, продуцируемые и/или используемые в соответствии с настоящим изобретением, включают гликозилированные Fc-домены, включая Fc-домены с модифицированным или генно-инженерно сконструированным таким гликозилированием. Для целей настоящего изобретения, в некоторых вариантах осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов, который включает достаточно последовательностей иммуноглобулиновых доменов, найденных в природных антителах, могут называться и/или использоваться в качестве "антитела", независимо от того, продуцируется ли такой полипептид в природе (например, вырабатывается организмом, реагирующим с антигеном) или продуцируется рекомбинантными методами, химическим синтезом или другими искусственными системами или методами. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным; в некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательностей антител являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т.д., как известно в данной области техники. Кроме того, термин "антитело", используемый в данном описании, следует понимать, как обозначающий в соответствующих вариантах (если иное не указано или не ясно из контекста) любые из известных в данной области или разработанных конструкций или форматов для сохранения структурных и функциональных признаков антитела в альтернативном представлении. Например, в некоторых вариантах осуществления термин может относиться к би- или другим полиспецифическим (например, зибоди и т.д.) антителам, низкомолекулярным модульным иммунопрепаратам ("SMIP™"), одноцепочечным антителам (scAb), антителам верблюдовых и/или фрагментам антител. В некоторых вариантах осуществления в антителе может отсутствовать ковалентная модификация (например, присоединение гликана), которая должна была бы присутствовать, если бы антитело продуцировалось в природе. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезную нагрузку [например, детектируемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент, и т.д.]), или другие боковые группы (например, полиэтиленгликоль и т.д.).

Антительный агент: используемый в данном описании термин "антительный агент" относится к агенту, который специфически связывается с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин охватывает любой полипептид с иммуноглобулиновыми структурными элементами, достаточным для обеспечения специфического связывания. Подходящие антительный агенты включают, но не ограничиваются ими, антитела человека, приматизированные антитела, химерные антитела, биспецифические антитела, гуманизированные антитела, конъюгированные антитела (т.е. антитела, конъюгированные или слитые с другими белками, радиометками, цитотоксинами), низкомолекулярные модульные иммунопрепараты ("SMIP™"), одноцепочечные антитела, антитела верблюдовых и фрагменты антител. Используемый в данном описании термин "антительный агент" также включает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, однодоменные антитела (например, акули однодоменные антитела (например, IgNAR или их фрагменты)), полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин охватывает соединенные жесткой связью пептиды. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает один или несколько антителоподобных связывающих пептидомиметиков. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает один или несколько антителоподобных связывающих каркасных белков. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает моноклональные или аднектины. Во многих вариантах осуществления антительный агент представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает один или несколько структурных элементов, которые специалисты в данной области техники распознают как области, определяющие комплементарность (CDR); в некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает по меньшей мере одну CDR (например, по меньшей мере одну CDR тяжелой цепи и/или по меньшей мере одну CDR легкой цепи), которая по существу идентична найденной в эталонном антителе. В некоторых вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что она либо идентична по последовательности, либо содержит 1-5 аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что она имеет по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по последовательности с эталонной CDR. В некоторых

вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что она имеет по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что по меньшей мере одна аминокислота в включенной CDR удалена, добавлена или замещена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая во всем остальном идентична таковой в эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что 1-5 аминокислот в включаемой CDR удалены, добавлены или замещены по сравнению с эталонной CDR, но включаемая CDR имеет аминокислотную последовательность, которая во всем остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что по меньшей мере одна аминокислота в включаемой CDR замещена по сравнению с эталонной CDR, но включаемая CDR имеет аминокислотную последовательность, которая во всем остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включаемая CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что 1-5 аминокислот в включаемой CDR удалены, добавлены или замещены по сравнению с эталонной CDR, но включаемая CDR имеет аминокислотную последовательность, которая во всем остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления антигательный агент представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает структурные элементы, которые специалисты в данной области техники определяют как вариабельный домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антигательный агент представляет собой белок, имеющий связывающий домен, который является гомологичным или высокогомологичным иммуноглобулиновому связывающему домену. Термин антигательный агент включает химерные рецепторы антигена.

Фрагмент антитела: используемый в настоящем описании термин "фрагмент антитела" включает участок интактного антитела, такой как, например, антигенсвязывающая или вариабельная область антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; триантитела; тетрантитела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Например, фрагменты антитела включают выделенные фрагменты; фрагменты "Fv", состоящие из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей; рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепей соединены пептидным линкером ("белки scFv"); и минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область. Во многих вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную последовательность родительского антитела, фрагментом которого он является, чтобы связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело; в некоторых вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сопоставимой с таковой для родительского антитела, и/или конкурирует с родительским антителом за связывание с антигеном. Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают, но не ограничиваясь ими, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, диантитело dsFv, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен любым способом. Например, антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен ферментативно или химически путем фрагментации интактного антитела, и/или он может быть получен рекомбинантно из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В качестве альтернативы или дополнительно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен полностью или частично синтетическим путем. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может, необязательно, содержать одноцепочечный фрагмент антитела. В качестве альтернативы или дополнительно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, посредством дисульфидных связей. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может, необязательно, содержать мульти-молекулярный комплекс.

Функциональный фрагмент антитела, как правило, включает по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот и, более типично, содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

Антигательный полипептид: используемые в данном описании термины "антигательный полипептид" или "антитело" или "антигенсвязывающий фрагмент", которые могут быть использованы взаимозаменяемо, относятся к полипептидам, способным связываться с эпитопом. В некоторых вариантах осуществления антигательный полипептид представляет собой полноразмерное антитело, а в некоторых вариантах осуществления - неполноразмерное, но включающее по меньшей мере один участок связывания (содержащий по меньшей мере один и, предпочтительно, по меньшей мере две последовательности со структурой "вариабельных областей" антитела). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин "антигательный полипептид" включает любой белок, имеющий связывающий домен, который является гомологичным или в значительной степени гомологичным иммуноглобулиновому связывающему домену. В конкретных вариантах осуществления "антигательные полипептиды" включают полипептиды, имеющие связывающий домен, который имеет по меньшей мере 99% идентичности с иммуноглобулиновым связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления "антигательным полипептидом" является любой белок, имеющий связывающий домен, который имеет по меньшей мере 70, 80, 85, 90 или 95% идентичности с иммуноглобулиновым связывающим доменом, например, эталонным иммуноглобу-

линовым связывающим доменом. Включенный "антительный полипептид" может иметь аминокислотную последовательность, идентичную антителу, которое найдено в природе. Антительные полипептиды по настоящему изобретению могут быть получены любыми доступными способами, включая, например, выделение из природного источника или из библиотеки антител, рекомбинантное получение в системе-хозяине или с ее использованием, химического синтеза и т.д. или их комбинации. Антительный полипептид может быть моноклональным или поликлональным. Антительный полипептид может быть членом любого класса иммуноглобулинов, включая любой из классов антител человека: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть членом класса иммуноглобулинов IgG. Используемый в данном описании термин "антительный полипептид" или "характеристический участок антитела" используются взаимозаменяемо и относятся к любому производному антитела, которое обладает способностью связываться с эпитопом, представляющим интерес. В некоторых вариантах осуществления "антительный полипептид" представляет собой фрагмент антитела, который сохраняет по меньшей мере значительную часть специфической связывающей способности полноразмерного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, диантитело dsFv и Fd-фрагменты. В качестве альтернативы или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, посредством дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления антительный полипептид может представлять собой антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антительный полипептид может быть гуманизированным. Гуманизированные антительные полипептиды могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или антительные полипептиды (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина животного. В общем, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR антитела из другого биологического вида (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, обладающего желаемой специфичностью, аффинностью и связывающей способностью.

Антиген: "антиген" представляет собой молекулу или соединение, которые i) вызывают иммунный ответ; и/или (ii) специфически связываются с Т-клеточным рецептором (например, при представлении молекулой МНС) или антителом (например, продуцируемым В-клеткой), например, при воздействии или введении в организм. В некоторых вариантах осуществления антиген вызывает гуморальный ответ в организме (например, включая продукцию антиген-специфических антител); в качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления антиген вызывает клеточный ответ в организме (например, с участием Т-клеток, чьи рецепторы специфически взаимодействуют с антигеном). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конкретный антиген может вызывать иммунный ответ у одного или нескольких представителей биологического вида-мишени (например, мышей, кроликов, приматов, людей), но не у всех членов данного вида. В некоторых вариантах осуществления антиген вызывает иммунный ответ по меньшей мере, приблизительно, у 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% представителей биологического вида-мишени. В некоторых вариантах осуществления антиген связывается с антителом и/или Т-клеточным рецептором и может или не может вызывать определенную физиологическую реакцию в организме. В некоторых вариантах осуществления, например, антиген может связываться с антителом и/или с Т-клеточным рецептором *in vitro*, вне зависимости от того, происходит ли такое взаимодействие *in vivo*. В общем, антиген может представлять собой или включать любое химическое соединение, такое как, например, низкомолекулярное соединение, нуклеиновая кислота, полипептид, углевод, липид, полимер [в некоторых вариантах осуществления, за исключением биополимеров (например, за исключением нуклеотидных или аминокислотных полимеров)] и т.д. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит гликан. Обычным специалистам в данной области техники будет понятно, что, в общем, антиген может быть предоставлен или использован в выделенном или в чистом виде, или же в альтернативном варианте - может быть предоставлен в неочищенном виде (например, вместе с другими веществами, например, в экстракте, таком как клеточный экстракт или другой относительно неочищенный препарат антиген-содержащего источника). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает рекомбинантный антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит полипептид или его участок. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с (например, экспрессируется) инфекционным агентом. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с раком (например, с опухолевыми клетками и/или метастазами).

Антигенсвязывающий фрагмент: термин "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в настоящем описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществляться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент,

содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), который состоит из VH-домена; (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR), например, VH CDR3, содержащую или не содержащую дополнительную последовательность (линкер, каркасную область (каркасные области) и т.д.) и (vii) комбинацию от двух до шести выделенных CDR, содержащую или не содержащую дополнительную последовательность (линкер, каркасную область (каркасные области) и т.д.). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им синтезироваться в виде одной полипептидной цепи, в которой области VL и VH составляют пару с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv), см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты включают слитые белки связывающего домена иммуноглобулина, содержащие (i) полипептид связывающего домена (например, варибельную область тяжелой цепи, варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи, слитую с варибельной областью легкой цепи через линкерный пептид), который слит с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) CH2-константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с шарнирной областью, и (iii) CH3-константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с CH2-константной областью. Шарнирная область может быть модифицирована путем замены одного или нескольких остатков цистеина остатками серина для того, чтобы предотвратить димеризацию. Такие слитые белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно описаны в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают с использованием традиционных методов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на пригодность так же, как и интактные антитела. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты включают двухвалентные (или бивалентные) одноцепочечные варибельные фрагменты (di-scFv, bi-scFv) или, в качестве альтернативы, так называемые диантитела, которые могут быть созданы с помощью стандартных молекулярно-биологических подходов.

Антиген-представляющая клетка: фраза "антиген-представляющая клетка" или "APC", используемая в данном описании, обозначает в данной области клетки, которые процессируют и представляют антигены Т-клеткам. Примеры антиген-представляющих клеток включают дендритные клетки, макрофаги и некоторые активированные эпителиальные клетки.

Антигенная идентичность: используемый в данном описании термин "антигенная идентичность" (AI) относится к процентной фракции аминокислот в представляющем интерес полипептиде или к его участку [например, в НА-полипептиде или в его эпитопе (например, в его иммунодоминантном эпитопе)], которые являются общими с соответствующим эталонным полипептидом (например, родительским НА-полипептидом, который может, например, представлять собой НА пандемического штамма) или его участком. Величина AI, получающаяся в результате сравнения двух любых полипептидов или последовательностей, может быть числом в диапазоне от 0 до 100, причем значение 100 указывает, что два полипептида или их участки, идентичны по последовательности.

Приблизительно: используемые в данном описании каждый из терминов "приблизительно" и "примерно" предназначен для охвата нормальной статистической изменчивости, как будет понятно специалистам в данной области, подходящей к соответствующему контексту. В некоторых вариантах осуществления, каждый из терминов "приблизительно" и "примерно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или меньшего % в любом направлении (больше или меньше, чем) от указанного значения, если иное не указано или иным образом не ясно из контекста (например, когда такое количество будет превышать 100% от возможного значения).

Связаны с: два события или объекта "связаны" друг с другом, как этот термин используется в настоящем описании, если присутствие, уровень и/или форма одного коррелирует с тем же для другого. Например, конкретный объект (например, полипептид) считается связанным с конкретным заболеванием, расстройством или состоянием, если его присутствие, уровень и/или форма коррелируют с заболеваемостью и/или восприимчивостью к заболеванию, расстройству или состоянию (например, в соответствующей популяции). В некоторых вариантах осуществления два или несколько объектов физически "связаны" друг с другом, если они взаимодействуют, прямо или косвенно, так что они находятся и остаются в физической близости относительно друг друга. В некоторых вариантах осуществления два или несколько объектов, которые физически связаны друг с другом, являются ковалентно связанными друг с другом; в некоторых вариантах осуществления, два или несколько объектов, которые физически связаны друг с другом, не являются ковалентно связанными друг с другом, а связаны нековалентно, например, посредством водородных связей, Ван-дер-Ваальсовых сил, гидрофобных взаимодействий, магнетизма и их комбинаций.

Биологически активное: используемая в данном описании фраза "биологически активное" относит-

ся к веществу, которое обладает активностью в биологической системе (например, в клетке (например, выделенной, в культуре, в ткани, в организме), в клеточной культуре, в ткани, в организме и т.д.). Например, вещество, которое при введении в организм, оказывает биологическое воздействие на этот организм, считается биологически активным. Специалистам в данной области техники будет понятно, что часто требуется только участок или фрагмент биологически активного вещества (например, необходим и достаточен) для наличия активности; в таких условиях этот участок или фрагмент считается "биологически активным" участком или фрагментом.

Связывание: следует понимать, что термин "связывание", используемый в настоящем описании, как правило, относится к нековалентной ассоциации между двумя или несколькими объектами или среди них. "Прямое" связывание включает физический контакт между объектами или фрагментами; не прямое связывание включает физическое взаимодействие путем физического контакта с одним или несколькими промежуточными объектами. Связывание между двумя или несколькими объектами, как правило, может быть оценено в любом из множества контекстов - в том числе, где взаимодействующие объекты или фрагменты изучаются выделенными, или в контексте более сложных систем (например, будучи ковалентно или иным образом связанными с объектом-носителем и/или в биологической системе или в клетке).

Связывающий агент: в общем, термин "связывающий агент" используется в настоящем описании для обозначения любого объекта, который связывается с представляющей интерес мишенью, описанной в настоящем документе. Во многих вариантах осуществления связывающим агентом, представляющим интерес, является тот, который специфически связывается с мишенью так, что он может отличить свою мишень от других потенциальных связывающихся партнеров в конкретном контексте взаимодействия. В общем, связывающий агент может представлять собой или включать объект любого химического класса (например, полимерное соединение, неполимерное соединение, низкомолекулярное соединение, полипептид, углевод, липид, нуклеиновую кислоту и т.д.). В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой одно химическое вещество. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой комплекс из двух или нескольких дискретных химических объектов, связанных друг с другом в соответствующих условиях с помощью нековалентных взаимодействий. Например, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в некоторых вариантах осуществления связывающий агент может содержать "общий" связывающий элемент (например, один из биотина/авидина/стрептавидина и/или класс-специфического антитела) и "специфический" связывающий элемент (например, антитела или аптамеры с определенной молекулярной мишенью), который связан с общим связывающим элементом. В некоторых вариантах осуществления такой подход может позволить модульную сборку нескольких связывающих агентов путем связывания различных специфических связывающих элементов с одним общим связывающим элементом. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или включают полипептиды (включая, например, антитела или фрагменты антител). В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или включают низкомолекулярные соединения. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или включают нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой аптамеры. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты являются полимерами; в некоторых вариантах осуществления изобретения связывающие агенты не являются полимерами. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты не являются полимерами за счет того, что они не содержат полимерных остатков. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или содержат углеводы. В некоторых вариантах осуществления, связывающие агенты представляют собой или содержат лектины. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или содержат пептидомиметики. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или содержат каркасные белки. В некоторых вариантах осуществления, связывающие агенты представляют собой или включают мимео-топы. В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты представляют собой или содержат соединенные жесткой связью пептиды. В некоторых вариантах осуществления, связывающие агенты представляют собой или содержат нуклеиновые кислоты, такие как ДНК или РНК.

Характеристический участок: в данном описании термин "характеристический участок" используется в самом широком смысле для обозначения участка вещества, чье присутствие (или отсутствие) коррелирует с наличием (или отсутствием) конкретного признака, атрибута или активности вещества. В некоторых вариантах осуществления, характеристический участок вещества представляет собой участок, который присутствует в веществе и в родственных веществах, которые имеют с ним общие конкретные признак, атрибут или активность, но не в тех, которые не имеют с ним этих общих конкретных признака, атрибута или активности. В некоторых вариантах осуществления, характеристический участок по меньшей мере имеет одну общую функциональную характеристику с интактным веществом. Например, в некоторых вариантах осуществления "характеристическим участком" белка или полипептида является тот, который включает непрерывную последовательность аминокислот или совокупность непрерывных последовательностей аминокислот, которые вместе являются характеристическими для белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый такой непрерывный участок, как правило, содержит

по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 50 или большее число аминокислот. В общем, характеристическим участком вещества (например, белка, антитела и т.д.) является тот, который, в дополнение к идентичности по последовательности и/или структурной идентичности, указанных выше, имеет по меньшей мере одну общую функциональную характеристику с соответствующим интактным веществом. В некоторых вариантах осуществления, характеристический участок может быть биологически активным.

Характеристическая последовательность: "характеристическая последовательность" представляет собой последовательность, которая находится во всех членах семейства полипептидов или нуклеиновых кислот, и, таким образом, может быть использована обычным специалистом в этой области техники для идентификации представителей семейства.

Характеристический элемент последовательности: используемая в данном описании фраза "характеристический элемент последовательности" относится к элементу последовательности, найденному в полимере (например, в полипептиде или нуклеиновой кислоте), который представляет собой характеристический участок этого полимера. В некоторых вариантах осуществления наличие характеристического элемента последовательности коррелирует с наличием или уровнем конкретных активности или свойства полимера. В некоторых вариантах осуществления наличие (или отсутствие) характеристического элемента последовательности идентифицирует конкретный полимер в качестве представителя (или не являющегося представителем) конкретного семейства или группы таких полимеров. Характеристический элемент последовательности, как правило, включает по меньшей мере два мономера (например, аминокислот или нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления характеристический элемент последовательности содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или большее число мономеров (например, непрерывно соединенных мономеров). В некоторых вариантах осуществления характеристический элемент последовательности включает по меньшей мере первый и второй отрезки непрерывно соединенных мономеров, отделенные друг от друга одной или несколькими разделяющими областями, длина которых может варьировать или оставаться постоянной у полимеров, которые имеют этот общий элемент последовательности.

Химерные рецепторы антигенов/адаптивная клеточная терапия: антительные агенты по настоящему изобретению, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), могут быть использованы для получения химерных рецепторов антигенов, получение и применение которых в общем известно в данной области техники. Химерный рецептор антигена (CAR), как правило, представляет собой искусственно созданный гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен scFv, или другой антительный агент, связанный с Т-клеточными сигнальными доменами. Характеристики CAR включают их способность перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток на выбранную мишень независимо от МНС, используя антигенсвязывающие свойства моноклональных антител. Независимое от МНС распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим молекулы CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом, обходя главный механизм опухолевого блокирования иммунной системы. Химерные рецепторы антигенов могут использоваться для терапевтического лечения, включая, например, адаптивную клеточную терапию. Адаптивная клеточная терапия представляет собой терапевтический подход, который, как правило, включает выделение и *ex vivo* размножение и/или манипуляции с клетками иммунной системы, часто Т-клетками, и последующее введение этих клеток пациентам, например, для лечения рака. Введенные клетки могут быть аутологичными или аллогенными. Клетки можно модифицировать для экспрессии химерных рецепторов антигенов любым из известных способов, включая, например, использование РНК- и ДНК-трансфекцию - технологий, которые известны в данной области техники.

Комбинированная терапия: термин "комбинированная терапия", используемый в настоящем описании, относится к тем ситуациям, в которых два или несколько различных фармацевтических или терапевтических агентов вводят по перекрывающимся или последовательным схемам, так что субъект одновременно или последовательно подвергается воздействию обоих агентов. Термин "в комбинации с" не подразумевает, что агенты должны вводиться одновременно и/или присутствовать в одном препарате для совместной доставки, хотя эти способы доставки входят в объем настоящего изобретения. Композиции по изобретению можно вводить одновременно с, до или после одного или нескольких других желаемых терапевтических средств или медицинских процедур. Будет очевидно, что терапевтически активные вещества, используемые в комбинации, могут быть введены вместе в одной композиции или могут вводиться по отдельности в различных композициях. В общем, каждый агент будет вводиться в дозировке и/или по схеме, определенной для этого агента.

Сопоставимые: термин "сопоставимые", используемый в настоящем описании, относится к двум или нескольким агентам, объектам, ситуациям, совокупности условий и т.п., которые могут быть не идентичными друг другу, но которые достаточно близки, чтобы позволить сравнение между ними, так что выводы могут быть обоснованно сделаны на основе наблюдаемых различий или сходства. В некоторых вариантах осуществления сопоставимые совокупности условий, обстоятельств, индивидуумов или популяций характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим числом переменных признаков. Обычным специалистам в данной области будет понятно в контексте, какая степень идентичности требуется в тех или иных обстоятельствах для двух или нескольких таких

агентов, объектов, ситуаций, совокупности условий и т.д., чтобы считать их сопоставимыми. Например, специалистам в данной области техники будет понятно, что совокупность обстоятельств, индивидуумов или популяций сравнимы друг с другом, когда они характеризуются достаточным количеством и типом по существу идентичных признаков, чтобы обосновать разумный вывод о том, что различия в полученных результатах или наблюдаемых явлениях при разных совокупностях обстоятельств или с разными совокупностями индивидуумов или популяций вызваны или указывают на изменение в этих признаках, которые менялись.

Соответствующий чему-либо: используемый в данном описании термин "соответствующий чему-либо" часто используется для обозначения структурного элемента или объекта в агенте, представляющем интерес, который имеет общее положение (например, в трехмерном пространстве или относительно другого элемента или объекта) с таковым, присутствующим в соответствующем эталонном агенте. Например, в некоторых вариантах осуществления этот термин используется для обозначения положения/идентичности остатка в полимере, такого как аминокислотный остаток в полипептиде или нуклеотидный остаток в нуклеиновой кислоте. Специалистам в данной области будет понятно, что, в целях упрощения, остатки в таком полимере часто обозначаются с помощью канонической системы нумерации, основанной на аналогичном эталонном полимере, так что остаток в первом полимере "соответствующий" остатку в положении 190 в эталонном полимере, например, необязательно на самом деле будет 190-м остатком в первом полимере, а скорее соответствует остатку, находящемуся в 190-м положении в эталонном полимере; средние специалисты в данной области техники легко поймут, как определить "соответствующие" аминокислоты, в том числе посредством использования одного или нескольких коммерчески доступных алгоритмов, специально разработанных для сравнения полимерных последовательностей.

Производное: используемый в настоящем описании термин "производное" относится к структурному аналогу эталонного вещества. То есть, "производное" представляет собой вещество, которое имеет значительное структурное сходство с эталонным веществом, например, имея общую базовую или консенсусную структуру, например, но также отличаясь в некоторым определенным образом. В некоторых вариантах осуществления производное представляет собой вещество, которое может быть создано из эталонного вещества путем химической манипуляции. В некоторых вариантах осуществления производное представляет собой вещество, которое может быть создано в результате выполнения процесса синтеза, по существу подобного (например, имеющего множество стадий с) таковым, с помощью которого получают эталонное вещество.

Детекторный элемент/агент: термин "детекторный элемент" или "детекторный агент", используемый в настоящем описании, относится к любому элементу, молекуле, функциональной группе, соединению, фрагменту или объекту, который может быть обнаружен. В некоторых вариантах осуществления детекторный элемент предлагается или используется отдельно. В некоторых вариантах осуществления детекторный элемент предлагается и/или используется в сочетании с (например, будучи соединенным с) другим агентом. Примеры детекторных элементов включают, но не ограничиваются ими: различные лиганды, радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{18}F , ^{19}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{135}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{64}Cu , ^{187}Re , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu , ^{89}Zr и т.д.), флуоресцентные красители (конкретные примеры флуоресцентных красителей см. ниже), хемилюминесцентные агенты (такие как, например, сложные эфиры акридиния, стабилизированные диоксетаны, и т.п.), биолюминесцентные агенты, спектрально-разрешимые нанокристаллы неорганических флуоресцентных полупроводников (например, квантовые точки), наночастицы металлов (например, золота, серебра, меди, платины и т.д.), ионы парамагнитных металлов, ферменты (конкретные примеры ферментов приведены ниже), колориметрические метки (такие как, например, красители, коллоидное золото и т.п.), биотин, диоксигенин, гаптены и белки, для которых имеются антисыворотки или моноклональные антитела.

Определять: многие методики, описанные в настоящем документе, включают стадию "определения". Обычным специалистам в данной области техники при прочтении настоящего описания будет понятно, что такое "определение" может использовать или может быть выполнено путем использования любого из разнообразных методов, доступных специалистам в данной области, включая, например, конкретные методы, которые непосредственно приведены в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления определение включает манипуляции с физическим образцом. В некоторых вариантах осуществления, определение включает изучение и/или манипуляции с данными или информацией, например, с использованием компьютера или другого процессирующего устройства, приспособленного для выполнения соответствующего анализа. В некоторых вариантах осуществления определение включает получение соответствующей информации и/или материалов из источника. В некоторых вариантах осуществления определение включает сравнение одного или нескольких признаков образца или субъекта с сопоставимым эталоном.

Лекарственная форма: используемый в данном описании термин "лекарственная форма" относится к физически дискретной единице действующего агента (например, терапевтического или диагностического агента) для введения субъекту. Каждая единица содержит заданное количество действующего агента. В некоторых вариантах осуществления, такое количество представляет собой стандартную единичную дозу (или ее неделимую долю), подходящую для введения в соответствии со схемой введения,

которая была определена исходя из корреляции с желаемым или полезным результатом при введении соответствующей группе населения (т.е. с терапевтической схемой). Обычным специалистам в данной области будет понятно, что общее количество терапевтической композиции или агента, вводимое конкретному субъекту, определяется одним или несколькими лечащими врачами и может включать введение нескольких лекарственных форм.

Схема лечения: используемый в данном описании термин "схема лечения" относится к количеству стандартных доз (как правило, более чем одной), которые вводят по отдельности субъекту, как правило, через определенные интервалы времени. В некоторых вариантах осуществления данный терапевтический агент имеет рекомендуемую схему лечения, которая может включать одну или несколько доз. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает множество доз, введение которых проводится через равные интервалы; в некоторых вариантах осуществления схема лечения включает множество доз и по меньшей мере два разных интервала, разделяющие введение отдельных доз. В некоторых вариантах осуществления все вводимые дозы в схеме лечения содержат одинаковую стандартную величину дозировки. В некоторых вариантах осуществления вводимые дозы в схеме лечения содержат разную величину. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает первую дозировку с первой величиной, за которой следует одна или несколько дополнительных доз с второй величиной, отличающейся от первой величины. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает первую дозу с первой величиной дозировки, за которой следует одна или несколько дополнительных доз с второй величиной дозировки, совпадающей с первой величиной. В некоторых вариантах осуществления схема лечения коррелирует с желаемым или полезным результатом при введении соответствующей группе населения (т.е. с терапевтической схемой).

Сконструированный: в общем, термин "сконструированный" относится к аспекту манипуляций руками человека. Например, полинуклеотид считается "сконструированным", когда человек манипулирует двумя или несколькими последовательностями, которые не связаны друг с другом в этом порядке в природе, для того, чтобы они были напрямую связаны друг с другом в сконструированном полинуклеотиде. Например, в некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид содержит регуляторную последовательность, которая встречается в природе в функциональной ассоциации с первой кодирующей последовательностью, но не с второй кодирующей последовательностью, и ее соединяют руками человека, так что она становится функционально связанной со второй кодирующей последовательностью. Соответственно, клетка или организм считаются "сконструированными", если с ними были произведены манипуляции, которые изменили их генетическую информацию (например, был введен новый генетический материал, ранее не присутствовавший, например, путем трансформации, скрещивания, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукции или другого механизма; либо ранее присутствовавший генетический материал был удален или изменен, например, путем замены или мутации при введении делеций или путем скрещивания). В обычной практике и для специалистов в данной области по томоство сконструированных полинуклеотидов или клетки, как правило, все еще называют "сконструированным", даже если фактическая манипуляция была проведена на предшествующем элементе.

Эпитоп: используемый в данном описании термин "эпитоп" имеет такое же значение, которое понимается в данной области под этим термином. Специалистам в данной области техники будет понятно, что эпитоп, также известный как антигенная детерминанта, представляет собой молекулярную область антигена, который распознается иммунной системой, конкретно, антителами, В-клетками или Т-клетками. Следует также понимать, что эпитопы могут состоять из сахаров, липидов или аминокислот. Эпитопы белковых антигенов подразделяются на две категории конформационные эпитопы и линейные эпитопы, в зависимости от их структуры и взаимодействия с паратопом (частью антитела, которая распознает эпитоп). Конформационный эпитоп состоит из прерывистых участков аминокислотной последовательности антигена, и эти эпитопы взаимодействуют с паратопом на основе особенностей трехмерной поверхности и формы или третичной структуры антигена. Линейные эпитопы взаимодействуют с паратопом на основе их первичной структуры, и линейный эпитоп образован непрерывной последовательностью аминокислот в антигене.

Экспрессия: используемый в данном описании термин "экспрессия" последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или нескольким из следующих событий: (1) получению матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессингу РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или образования 3'-конца); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

Функциональный: используемый в описании термин "функциональная" биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в такой форме, в которой она обладает свойством и/или активностью, которые ее характеризуют. Биологическая молекула может иметь две функции (то есть являться бифункциональной) или множество функций (то есть являться многофункциональной).

Фрагмент: "фрагмент" материала или элемента, описываемых в настоящем документе, имеет структуру, которая включает дискретный участок целого, но содержит одного или нескольких элементов, имеющих в целом. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент состоит из такого

дискретного участка. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент состоит из или включает характеристический структурный элемент или фрагмент, найденный в целом. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент полимера содержит или состоит из, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или большего числа мономерных звеньев (например, остатков), которые содержатся в целом полимере. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полимера содержит или состоит из по меньшей мере примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или большего процента мономерных звеньев (например, остатков), найденных в целом полимере. Целый материал или элемент может в некоторых вариантах осуществления указываться как "родительский вариант" целого.

Ген: используемый в данном описании термин "ген" имеет такое же значение, которое понимается в данной области под этим термином. Специалистам в данной области техники будет понятно, что термин "ген" может включать регуляторные последовательности гена (например, промоторы, энхансеры и т.д.) и/или интроны. Следует также иметь в виду, что определение гена включает ссылки на нуклеиновые кислоты, которые не кодируют белки, а кодируют функциональные молекулы РНК, такие как тРНК, вызывающие РНК-интерференцию агенты и т.д. Для ясности следует отметить, что используемый в настоящей заявке термин "ген", как правило, относится к участку нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок; термин необязательно может включать регуляторные последовательности, что будет очевидно из контекста обычным специалистам в данной области техники. Это определение не предназначено для исключения применения термина "ген" к кодирующим небелковые соединения единицам экспрессии, а скорее для пояснения того, что в большинстве случаев термин, используемый в этом документе, относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей белок.

Генный продукт или продукт экспрессии: используемый в данном описании термин "генный продукт" или "продукт экспрессии" в общем относится к РНК, транскрибируемой с гена (до и/или после процессинга) или полипептиду (до и/или после модификации), кодируемому РНК, транскрибируемой с гена.

Высокоаффинное связывание: термин "высокоаффинное связывание", используемый в настоящем описании, относится к высокой степени сродства, с которым конкретный лиганд связывается со своим партнером. Аффинность может быть измерена любым доступным способом, включая те, которые известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления связывание считается высокоаффинным, если K_d составляет около 500 мкМ или менее (например, ниже примерно 400 пМ, примерно 300 пМ, примерно 200 пМ, примерно 100 пМ, примерно 90 пМ, примерно 80 пМ, примерно 70 пМ, примерно 60 пМ, примерно 50 пМ, примерно 40 пМ, примерно 30 пМ, примерно 20 пМ, примерно 10 пМ, примерно 5 пМ, примерно 4 пМ, примерно 3 пМ, примерно 2 пМ и т.д.) в анализах связывания. В некоторых вариантах осуществления связывание считается высокоаффинным, если аффинность сильнее (например, K_d ниже) для представляющего интерес полипептида, чем для выбранного эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления связывание считается высокоаффинным, если отношение K_d для представляющего интерес полипептида к K_d для выбранного эталонного полипептида составляет 1:1 или меньше (например, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0,2:1, 0,1:1, 0,05:1, 0,01:1 или меньше). В некоторых вариантах осуществления, связывание считается высокоаффинным, если K_d для представляющего интерес полипептида составляет примерно 100% или меньше (например, примерно 99%, примерно 98%, примерно 97%, примерно 96%, примерно 95%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 80%, примерно 75%, примерно 70%, примерно 65%, примерно 60%, примерно 55%, примерно 50%, примерно 45%, примерно 40%, примерно 35%, примерно 30%, примерно 25%, примерно 20%, примерно 15%, примерно 10%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2%, примерно 1% или меньше) от K_d для выбранного эталонного полипептида.

Гомология: используемый в данном описании термин "гомология" относится к общности между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновых кислот (например, ДНК-молекулами и/или РНК-молекулами) и/или между полипептидными молекулами. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются "гомологичными" друг другу, если их последовательности идентичны по меньшей мере на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99%. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются "гомологичными" друг другу, если их последовательности подобны по меньшей мере, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% (например, содержат остатки с родственными химическими свойствами в соответствующих позициях). Например, как хорошо известно специалистам в данной области техники, некоторые аминокислоты, как правило, классифицируются подобными друг другу, как "гидрофобные" или "гидрофильные" аминокислоты, и/или как имеющие "полярные" или "неполярные" боковые цепи. Замену одной аминокислоты на другую того же типа часто можно рассматривать как "гомологичную" замену. Типичные категории аминокислот приведены ниже:

Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральная	1, 8
Аргинин	Arg	R	полярная	положительная	-4, 5
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральная	-3, 5
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	отрицательная	-3, 5
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральная	2, 5
Глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	отрицательная	-3, 5
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральная	-3, 5
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральная	-0, 4
Гистидин	His	H	полярная	положительная	-3, 2
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральная	4, 5
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральная	3, 8
Лизин	Lys	K	полярная	положительная	-3, 9
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральная	1, 9
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральная	2, 8
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральная	-1, 6
Серин	Ser	S	полярная	нейтральная	-0, 8
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральная	-0, 7
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральная	-0, 9
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральная	-1, 3
Валин	Val	V	неполярная	нейтральная	4, 2
Двойственные аминокислоты			3-буквенный код	1-буквенный код	
Аспарагин или аспарагиновая кислота			Asx	B	
Глутамин или глутаминовая кислота			Glx	Z	
Лейцин или изолейцин			Xle	J	
Неуказанная или неизвестная аминокислота			Xaa	X	

Как будет понятно специалистам в данной области техники, доступны различные алгоритмы, которые позволяют сравнивать последовательности, чтобы определить степень их гомологии, в том числе разрешая разрывы указанной длины в одной последовательности относительно другой при решении, какие остатки "соответствуют" друг другу в различных последовательностях. Вычисление процента гомологии между двумя последовательностями нуклеиновых кислот, например, может быть выполнено путем совмещения двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, для оптимального выравнивания могут быть введены разрывы в одну или в обе первую и вторую нуклеотидные последовательности, а несоответствующие последовательности могут не учитываться при сравнении). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности, выравниваемой для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по существу 100% от длины исходной последовательности. Эти нуклеотиды в соответствующих положениях нуклеотидов затем сравниваются. Когда положение в первой последовательности занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении; когда положение в первой последовательности занято аналогичным нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются подобными в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией числа идентичных

и аналогичных положений, общих для последовательностей, с учетом количества разрывов и длины каждого разрыва, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Репрезентативные алгоритмы и компьютерные программы, полезные для определения процента гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, включают, например, алгоритм Майера и Миллера (CABIOS, 1989, 4: 11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы весов остатков PAM120, штрафа за длину разрыва 12 и штрафа за разрыв 4. Процент гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями может быть альтернативно определен, например, с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG с использованием NWSgapdna.CMP-матрицы.

Человек: в некоторых вариантах осуществления изобретения человеком является эмбрион, плод, младенец, ребенок, подросток, взрослый или пенсионер.

Гидрофильный: используемый в данном описании термин "гидрофильный" и/или "полярный" относится к способности смешиваться с водой или легко растворяться в воде.

Гидрофобный: используемый в данном описании термин "гидрофобный" и/или "неполярный" относится к способности отторгать воду, не смешиваться с водой или к неспособности легко растворяться в воде.

Идентичность: используемый в данном описании термин "идентичность" относится к общности между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновых кислот (например, ДНК-молекулами и/или РНК-молекулами) и/или между полипептидными молекулами. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются "по существу идентичными" друг другу, если их последовательности по меньшей мере на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или на 99% идентичны. Вычисление процента идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, например, может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, могут быть введены разрывы в одну или обе первую и вторую последовательности для оптимального выравнивания, а неидентичные последовательности могут не учитываться для целей сравнения). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности, выравниваемой для сравнения составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по существу 100% от длины эталонной последовательности. Нуклеотиды в соответствующих положениях затем сравниваются. Когда положение в первой последовательности занято тем же остатком (например, нуклеотидным или аминокислотным), что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в данном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом количества разрывов и длины каждого разрыва, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Майера и Миллера (CABIOS, 1989, 4: 11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления сравнения нуклеотидных последовательностей выполнены с помощью программы ALIGN с использованием таблицы весов остатков PAM120, штрафа за длину разрыва 12 и штрафа за разрыв 4. Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть альтернативно определен, например, с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG с использованием NWSgapdna.CMP-матрицы.

Выделенный: используемый в данном описании термин "выделенный" относится к веществу и/или объекту, которые были (1) отделены от по меньшей мере некоторых из компонентов, с которыми они были связаны при исходном получении (в природных и/или в экспериментальных условиях), и/или (2) разработаны, произведены, подготовлены и/или изготовлены рукой человека. Отдельные вещества и/или объекты могут быть отделены от примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более чем примерно 99% других компонентов, с которыми они первоначально были связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные агенты имеют чистоту примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более чем примерно 99%. В контексте настоящего описания вещество является "чистым", если оно является по существу свободным от других компонентов. В некоторых вариантах осуществления, как будет понятно специалистам в данной области техники, вещество все еще может считаться "выделенным" или даже "чистым" после объединения с некоторыми другими компонентами, такими как, например, с одним или несколькими носителями или вспомогательными веществами (например, буфером, растворителем, водой и т.д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывается без учета таких носителей или вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления выделение включает или требует разрушения кова-

лентных связей (например, для выделения полипептидного домена из более длинного полипептида и/или для выделения элемента нуклеотидной последовательности из более длинного олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты).

Маркер: маркер в контексте настоящего описания относится к объекту или элементу, чье присутствие или уровень являются характеристикой определенного состояния или события. В некоторых вариантах осуществления присутствие или уровень конкретного маркера могут являться характеристикой присутствия или стадии заболевания, расстройства или состояния. В качестве лишь одного примера, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин относится к продукту экспрессии гена, который характерен для конкретной опухоли, подкласса опухолей, стадии опухоли и т.п. В качестве альтернативы или в дополнительном варианте, в некоторых вариантах осуществления присутствие или уровень определенного маркера коррелируют с активностью (или уровнем активности) определенного сигнального пути, например, что может являться характеристикой конкретного класса опухолей. Статистическая значимость присутствия или отсутствия маркера может варьировать в зависимости от конкретного маркера. В некоторых вариантах осуществления обнаружение маркера высокоспецифично за счет того, что оно отражает высокую вероятность того, что опухоль принадлежит к конкретному подклассу. Такая специфичность может возникать за счет чувствительности (то есть, можно получить отрицательный результат, даже если опухоль представляет собой опухоль, предположительно экспрессирующую маркер). С другой стороны, маркеры с высокой степенью чувствительности, могут быть менее специфичными, чем маркеры с более низкой чувствительностью. В соответствии с настоящим изобретением полезный маркер не должен позволять отличать опухоли конкретного подкласса с точностью до 100%.

Мутант: используемый в данном описании термин "мутант" относится к объекту, который имеет существенную структурную идентичность с эталонным объектом, но структурно отличается от эталонного объекта по наличию или по уровню одной или нескольких химических групп по сравнению с эталонным объектом. Во многих вариантах осуществления изобретения мутант также функционально отличается от эталонного объекта. В общем, решение о том, является ли конкретный объект действительно "мутантом" эталонного объекта, основывается на его степени структурной идентичности с эталонным объектом. Как будет понятно специалистам в этой области техники, любой биологический или химический эталонный объект имеет определенные характеристические структурные элементы. Мутант, по определению, является отдельным химическим объектом, который имеет общие один или несколько таких характеристических структурных элементов. В качестве лишь нескольких примеров, низкомолекулярное соединение может иметь характеристический основной структурный элемент (например, макроциклическое ядро) и/или одну или несколько характеристических боковых групп, так что мутантом низкомолекулярного соединения является такое соединение, которое имеет с ним общий основной структурный элемент и характеристические боковые группы, но отличается по другим боковым группам и/или по типам присутствующих связей (одиночные относительно двойных, E относительно Z и т.д.) в пределах ядра; причем полипептид может иметь характеристический элемент последовательности, состоящий из множества аминокислот, имеющих определенные позиции относительно друг друга в линейном или трехмерном пространстве и/или способствующих определенной биологической функции; а нуклеиновая кислота может иметь характеристический элемент последовательности, состоящий из множества нуклеотидных остатков, имеющих определенные позиции относительно друг друга в линейном или трехмерном пространстве. Например, мутантный полипептид может отличаться от эталонного полипептида в результате одного или нескольких отличий в аминокислотной последовательности и/или одного или нескольких отличий в химических группах (например, углеводных, липидных и т.д.), ковалентно присоединенных к полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид имеет общую идентичность по последовательности с эталонным полипептидом, которая составляет по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 99%. В качестве альтернативы или в дополнительном варианте, в некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид не имеет по меньшей мере одного характеристического элемента последовательности относительно эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид имеет одну или несколько биологических активностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид имеет общие одну или несколько биологических активностей с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления у мутантного полипептида отсутствует одна или несколько биологических активностей эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид имеет пониженный уровень одной или нескольких биологических активностей по сравнению с эталонным полипептидом.

Нуклеиновая кислота: используемый в данном описании термин "нуклеиновая кислота" в самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которые включены или могут быть включены в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которые включены или могут быть включены в олигонуклеотидную цепь через фосфодиэфирную связь. Как будет ясно из контекста, в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к отдельным остаткам нуклеиновых кислот (например, нуклеотидов и/или нуклеозидов); в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к олигонуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновых кислот. В некоторых вари-

антах осуществления "нуклеиновая кислота" представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких природных остатков нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от нуклеиновой кислоты тем, что в нем не используется фосфодиэфирный каркас. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, представляющие собой, содержащие или состоящие из одной или нескольких "пептидных нуклеиновых кислот", которые известны в данной области, и пептидных связей вместо фосфодиэфирных связей в основной цепи, рассматриваются, как входящие в объем настоящего изобретения. В качестве альтернативы или в дополнительном варианте, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет одну или несколько фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких нуклеозидных аналогов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролпиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C₅-пропинилцитидина, C₅-пропинилуридина, 2-аминоаденозина, C₅-бромуридина, C₅-фторуридина, C₅-йодуридина, C₅-пропинилуридина, C₅-пропинилцитидина, C₅-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-дезааденозина, 7-дезагуанозина, 8-оксааденозина, 8-оксогуанозина, O(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает один или несколько модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению сахарами в природных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают с помощью одного или нескольких способов из: выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе и с помощью химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или большее число остатков в длину.

Пациент: используемый в данном описании термин "пациент" или "субъект" относится к любому организму, которому вводится или может быть введена данная композиция, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических, косметических и/или терапевтических целях. Типичные пациенты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, кроме человека, и/или человек). Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в некоторых вариантах осуществления животное может быть домашним животным (например, сельскохозяйственным животным, животным-компаньоном и т.д.). В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от или является восприимчивым к одному или нескольким расстройствам или состояниям. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет один или несколько симптомов расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления пациенту был поставлен диагноз одного или нескольких расстройств или состояний. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения расстройство или состояние представляет собой или включает рак, или наличие одной или нескольких опухолей. В некоторых вариантах осуществления такой рак или опухоль представляют собой или включают рак предстательной железы или опухоль в предстательной железе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения расстройство или состояние представляют собой метастатический рак.

Пептид: термин "пептид" относится к двум или большему числу аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями. В конкретных вариантах осуществления "пептид" относится к полипептиду, имеющему длину менее примерно 100 аминокислот, менее примерно 50 аминокислот, менее 20 аминокислот или менее 10 аминокислот.

Фармацевтическая композиция: используемый в настоящем описании термин "фармацевтическая композиция" относится к действующему агенту, входящему в препарат вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления действующий агент присутствует в стандартной дозировке, подходящей для введения в терапевтической схеме, которая показывает статистически значимую вероятность достижения заданного терапевтического эффекта при введении соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть специально разработаны для введения в твердой или жидкой форме, включая те,

которые адаптированы для: перорального введения, например, жидкие лекарственные формы для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, таблетки, предназначенные для буккального, сублингвального и системного всасывания, болюсы, порошки, гранулы, пасты для наложения на язык; для парентерального введения, например с помощью подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции, например, в виде стерильного раствора или суспензии, либо состава с замедленным высвобождением; для местного применения, например, в виде крема, мази или пластыря с контролируемым высвобождением или спрея, наносимого на кожу, в полость легких или рта; для интравагинального или интаректального введения, например, в виде пессария, крема или пены; для сублингвального, окулярного, трансдермального введения или введения через слизистую поверхность носа, легких и т.п.

Фармацевтически приемлемый: термин "фармацевтически приемлемый", используемый в данном описании, относится к агентам, которые, по имеющейся в медицине информации подходят для использования в контакте с тканями человека и/или животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергических реакций или другой проблемы или осложнения, соразмерно с приемлемым соотношением польза/риск.

Фармацевтически приемлемый носитель: Используемый в данном описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или заключающий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке требуемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами состава и не должен быть вредным для пациента. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозитория; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; pH-буферные растворы; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Полипептид: термин "полипептид", используемый в настоящем описании, в общем имеет общепринятое в данной области значение полимера по меньшей мере из трех аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления этот термин используется для обозначения конкретных функциональных классов полипептидов. Для каждого такого класса в настоящем описании содержится несколько примеров аминокислотных последовательностей известных полипептидов, являющихся примерами класса; в некоторых вариантах осуществления такие известные полипептиды являются эталонными полипептидами для класса. В таких вариантах осуществления термин "полипептид" относится к любому представителю класса, который показывает значительную степень гомологии или идентичности по последовательности с соответствующим эталонным полипептидом. Во многих вариантах осуществления такой представитель также в значительной степени имеет общую активность с эталонным полипептидом. В качестве альтернативы или в дополнительном варианте, во многих вариантах осуществления такой представитель также имеет общий характеристический элемент последовательности с эталонным полипептидом (и/или с другими полипептидами в классе, в некоторых вариантах осуществления - со всеми полипептидами в классе). Например, в некоторых вариантах осуществления полипептидный представитель имеет общую степень гомологии или идентичности по последовательности с эталонным полипептидом, которая составляет по меньшей мере примерно 30-40% и часто выше примерно 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большего процента, и/или включает по меньшей мере одну область (т.е. консервативную область, которая в некоторых вариантах осуществления может представлять собой или содержать характеристический элемент последовательности), которая имеет очень высокую идентичность по последовательности, часто выше 90% или даже выше 95, 96, 97, 98 или 99%. Такая консервативная область, как правило, включает по меньшей мере 3-4 и часто до 20 или большее число аминокислот; в некоторых вариантах осуществления консервативная область включает по меньшей мере один участок по меньшей мере из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или большего числа непрерывных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полезный полипептид может включать или состоять из фрагмента исходного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, полезный полипептид может содержать или состоять из множества фрагментов, каждый из которых находится в том же исходном полипептиде в другом пространственном расположении по отношению друг к другу, чем в представляющем интерес полипептиде (например, фрагменты, которые напрямую связаны в родительском полипептиде, могут быть пространственно разделены в представляю-

шем интерес полипептиде или наоборот, и/или фрагменты в представляющего интерес полипептиде могут присутствовать в другом порядке, чем в родительском полипептиде), так что полипептид, представляющий интерес, является производным своего родительского полипептида. В некоторых вариантах осуществления, полипептид может содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, или оба типа аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать только природные аминокислоты или только неприродные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать D-аминокислоты, L-аминокислоты, или оба типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать только D-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать только L-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать одну или несколько боковых групп, например, модифицирующих или присоединенных к одной или нескольким боковым цепям аминокислот, и/или на N-конце полипептида, на C-конце полипептида или на обоих концах. В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть циклическим. В некоторых вариантах осуществления полипептид не является циклическим. В некоторых вариантах осуществления полипептид является линейным.

Белок: используемый в данном описании термин "белок" относится к полипептиду (т.е. к цепочке из по меньшей мере двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут включать объекты кроме аминокислот (например, могут представлять собой гликопротеины, протеогликаны и т.д.) и/или могут быть иным образом процессированы или модифицированы. Обычным специалистам в данной области техники будет понятно, что "белок" может представлять собой полноразмерную полипептидную цепь, продуцируемую клеткой (с или без сигнальной последовательности), или может представлять собой ее характеристический участок. Специалистам будет понятно, что белок может иногда включать более одной полипептидной цепи, например, связанных одной или несколькими дисульфидными связями или связанных другими средствами. Полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты или оба типа аминокислот и могут содержать любую из множества модификаций или аналогов аминокислот, известных в данной области. Подходящие модификации включают, например, концевое ацетилирование, амидирование, метилирование и т.д. В некоторых вариантах осуществления, белки могут содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, синтетические аминокислоты и их комбинации. Термин "пептид", как правило, используется для обозначения полипептида, имеющего длину меньше примерно 100 аминокислот, меньше примерно 50 аминокислот, меньше 20 аминокислот или меньше 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, белки представляют собой антитела, фрагменты антител, биологически активные их участки и/или их характеристические участки.

Чистый: в данном описании агент или объект является "чистым", если он по существу свободен от других компонентов. Например, препарат, который содержит более примерно 90% конкретного агента или объекта, как правило, считается чистым препаратом. В некоторых вариантах осуществления агент или объект является чистым по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Эталон: термин "эталон" часто используется в данном документе для описания стандартного или контрольного агента, индивидуума, популяции, образца, последовательности или значения, с которыми сравниваются агент, индивидуум, популяция, образец, последовательность или значение, представляющие интерес. В некоторых вариантах осуществления эталонный агент, индивидуум, популяция, образец, последовательность или значение тестируют и/или определяют по существу одновременно с тестированием или определением агента, индивидуума, популяции, образца, последовательности или значения, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления эталонный агент, индивидуум, популяция, образец, последовательность или значение представляют собой известную информацию, необязательно, представленную на материальном носителе информации. Как правило, как должно быть понятно специалистам в данной области техники, эталонный агент, индивидуум, популяция, образец, последовательность или значение определяются или характеризуются в условиях, сравнимых с теми, которые использовались для определения или характеристики агента, индивидуума, популяции, образца, последовательности или значения, представляющих интерес.

Ответ: в контексте настоящего изобретения ответ на лечение может относиться к любому благоприятному изменению в состоянии субъекта, которое возникает в результате или коррелирует с лечением. Такое изменение может включать стабилизацию состояния (например, предотвращение ухудшения, которое произошло бы при отсутствии лечения), облегчение симптомов состояния и/или улучшение перспектив для лечения состояния, и т.д. Ответ может относиться к ответу субъекта или ответу опухоли. Ответ опухоли или субъекта может быть измерен в соответствии с широким спектром критериев, включая клинические критерии и объективные критерии. Методы оценки ответа включают, но не ограничиваются ими, клиническое обследование, позитронно-эмиссионную томографию, рентгеновскую КТ грудной клетки, МРТ, УЗИ, эндоскопию, лапароскопию, наличие или уровень опухолевых маркеров в образце, полученном от субъекта, цитологию и/или гистологию. Многие из этих методов направлены на определение размера опухоли или иным образом определение общей опухолевой массы. Методы и руко-

водства для оценки эффективности лечения обсуждаются в Therasse et. al., "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors", European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada, J. Natl. Cancer Inst., 2000, 92(3):205-216. Точные критерии ответа могут быть выбраны любым соответствующим образом, при условии, что при сравнении групп опухолей и/или пациентов, группы для сравнения оцениваются на основании тех же или сравнимых критериев для определения степени ответа. Средний специалист в данной области будет в состоянии выбрать соответствующие критерии.

Специфическое связывание: используемые в данном описании термины "специфическое связывание" или "специфические для" или "специфические к" относятся к взаимодействию (обычно нековалентному) между целевым объектом (например, целевым белком или полипептидом) и связывающим агентом (например, антителом, таким как приведенное антитело). Как будет понятно средним специалистам, взаимодействие считается "специфичным", если оно является преимущественным в присутствии альтернативных взаимодействий. Во многих вариантах осуществления взаимодействие, как правило, зависит от присутствия определенного структурного признака молекулы-мишени, такой как антигенная детерминанта или эпитоп, распознаваемого связывающей молекулой. Например, если антитело является специфическим для эпитопа А, то присутствие полипептида, содержащего эпитоп А или присутствие свободного немеченого А в реакционной смеси, содержащей свободный меченый А и антитела к нему, снижает количество меченого А, который связывается с антителом. Следует понимать, что специфичность не должна быть абсолютной. Например, в данной области хорошо известно, что многие антитела вступают в перекрестную реакцию с другими эпитопами в дополнение к тем, которые присутствуют в молекуле-мишени. Такая перекрестная реактивность может быть приемлемой в зависимости от целей, для которых антитело будет использоваться. В конкретных вариантах осуществления, антитело, специфичное к рецепторным тирозинкиназам имеет меньше 10% перекрестной реактивности с рецепторными тирозинкиназами, связанными с протеазными ингибиторами (например, АСТ). Средний специалист в данной области будет в состоянии выбрать антитела, обладающие достаточной степенью специфичности для корректного использования в любом данном варианте применения (например, для обнаружения молекулы-мишени, для терапевтических целей и т.д.).

Специфичность может быть оценена в контексте дополнительных факторов, таких как аффинность связывания молекулы с молекулой-мишенью по сравнению с аффинностью связывающей молекулы в отношении других мишеней (например, конкурентов). Если связывающая молекула проявляет высокую аффинность к молекуле-мишени, которую желательно обнаружить, и низкую аффинность к молекулам, не являющимся мишенями, антитело, вероятно, будет приемлемым реагентом для иммунодиагностических целей. После того, как специфичность связывающей молекулы будет определена в одном или нескольких контекстах, ее можно будет использовать и в других, предпочтительно аналогичных, контекстах без обязательной повторной оценки ее специфичности.

Специфичность: как известно специалистам в данной области техники, "специфичность" является мерой способности конкретного лиганда отличить своего связывающего партнера от других потенциальных партнеров по связыванию.

Субъект: под "субъектом" подразумевается млекопитающее (например, человек, в некоторых вариантах осуществления, включая пренатальные формы человека). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от соответствующего заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект подвержен заболеванию, расстройству или состоянию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет один или несколько симптомов или характеристик заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект не имеет каких-либо симптомов или характеристик заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой кого-то с одним или несколькими признаками, характерными для восприимчивости к заболеванию, расстройству или состоянию или риска их возникновения. Субъект может быть пациентом, что относится к человеку, обращающемуся в медицинское учреждение с целью диагностики или лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления субъектом является физическое лицо, которое получает лечение.

По существу: используемый в данном описании термин "по существу" относится к качественному состоянию проявления полной или почти полной выраженности или степени характеристики или качества, представляющих интерес. Средний специалист в данной области биологии будет понимать, что биологические и химические явления редко, если вообще, доходят до завершения и/или полностью происходят, или достигают или избегают абсолютного результата. Термин "по существу", таким образом, используется в данном описании, чтобы охватить потенциальную незавершенность, присущую многим биологическим и химическим явлениям.

Существенная гомология по последовательности: фраза "существенная гомология" используется в настоящем описании для обозначения сравнения между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями. Как будет понятно специалистам в данной области, две последовательности в общем считаются "по существу гомологичными", если они содержат гомологичные остатки в соответствующих положениях. Гомологичные остатки могут быть идентичными остатками. В качестве альтернативы, го-

мологичными остатками могут быть неидентичные остатки с соответствующими аналогичными структурными и/или функциональными характеристиками. Например, как хорошо известно специалистам в данной области техники, некоторые аминокислоты, как правило, классифицируются как "гидрофобные" или "гидрофильные" аминокислоты, и/или как имеющие "полярные" или "неполярные" боковые цепи. Замену одной аминокислоты на другую того же типа часто можно рассматривать как "гомологичную" замену. Типичные категории аминокислот приведены ниже:

Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральная	1, 8
Аргинин	Arg	R	полярная	положительная	-4, 5
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральная	-3, 5
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	отрицательная	-3, 5
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральная	2, 5
Глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	отрицательная	-3, 5
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральная	-3, 5
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральная	-0, 4
Гистидин	His	H	полярная	положительная	-3, 2
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральная	4, 5
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральная	3, 8
Лизин	Lys	K	полярная	положительная	-3, 9
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральная	1, 9
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральная	2, 8
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральная	-1, 6
Серин	Ser	S	полярная	нейтральная	-0, 8
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральная	-0, 7
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральная	-0, 9
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральная	-1, 3
Валин	Val	V	неполярная	нейтральная	4, 2
Двойственные аминокислоты			3-буквенный код	1-буквенный код	
Аспарагин или аспарагиновая кислота			Asx	B	
Глутамин или глутаминовая кислота			Glx	Z	
Лейцин или изолейцин			Xle	J	
Неуказанная или неизвестная аминокислота			Xaa	X	

Как хорошо известно в данной области техники, аминокислотные или нуклеотидные последовательности могут сравниваться с использованием любого из множества алгоритмов, включая те, которые доступны в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, gapped BLAST и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. В дополнение к идентификации гомологичных последовательностей программы, указанные выше, как правило, обеспечивают определение степени гомологии. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу гомологичными, если по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по

меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большее число их соответствующих остатков являются гомологичными на протяжении значимой цепочки остатков. В некоторых вариантах осуществления значимая цепочка представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления значимая цепочка представляет собой по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375, по меньшей мере 400, по меньшей мере 425, по меньшей мере 450, по меньшей мере 475, по меньшей мере 500 или большее число остатков.

Существенная идентичность: фраза "по существу идентичный" используется в настоящем описании для обозначения сравнения между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями. Как будет понятно специалистам в данной области, две последовательности в общем считаются "по существу идентичными", если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Как хорошо известно в данной области, сравнение аминокислотных или нуклеотидных последовательностей может быть выполнено с использованием любого из множества алгоритмов, включая те, которые доступны в коммерческих компьютерных программах, такие как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, gapped BLAST и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. В дополнение к идентификации идентичных последовательностей, программы, указанные выше, как правило, обеспечивают определение степени идентичности. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу идентичными, если по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большее число их соответствующих остатков являются идентичными на протяжении значимой цепочки остатков. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значимая цепочка представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значимая цепочка составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или большее число остатков.

Существенное структурное сходство: используемый в данном описании термин "существенное структурное сходство" относится к присутствию общих структурных особенностей, таких как присутствие и/или идентичность отдельных аминокислот в конкретных положениях (см. определения "общей гомологии последовательностей" и "общей идентичности последовательностей"). В некоторых вариантах осуществления термин "существенное структурное сходство" относится к присутствию и/или идентичности структурных элементов (например: петель, листов, спиралей, доноров Н-связей, акцепторов Н-связей, характера гликозилирования, солевых мостиков и дисульфидных связей). В некоторых других вариантах осуществления настоящего изобретения термин "существенное структурное сходство" относится к трехмерному расположению и/или ориентации атомов или групп относительно друг друга (например, расстоянию и/или углам между ними у агента, представляющего интерес, и эталонного агента).

Терапевтический агент: используемая в данном описании фраза "терапевтический агент" в целом относится к любому агенту, который вызывает желаемый фармакологический эффект при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления, агент считается терапевтическим агентом, если он демонстрирует статистически значимый эффект у соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соответствующей популяцией может быть популяция модельных организмов. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может быть определена с помощью различных критериев, таких как определенная возрастная группа, пол, генетический фон, предшествующее состояние здоровья и т.д. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой вещество, которое может быть использовано для облегчения, улучшения, снятия, ингибирования, предупреждения, задержки наступления, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления "терапевтический агент" является агентом, который был или обязан быть утвержден государственным органом, прежде чем он сможет продаваться для введения людям. В некоторых вариантах осуществления "терапевтический агент" представляет собой агент, для которого требуется рецепт врача для введения человеку.

Терапевтическая схема: "терапевтическая схема" так, как этот термин используется в настоящем

описании, относится к схеме лечения, применение которой у соответствующей популяции коррелирует с желаемым или полезным терапевтическим результатом.

Терапевтически эффективное количество: используемый в данном описании термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое является достаточным при введении пациенту, страдающему от или восприимчивого к заболеванию, расстройству и/или состоянию, в соответствии с терапевтической схемой лечения, для лечения заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективным количеством является такое, которое уменьшает частоту и/или тяжесть, и/или задерживает наступление одного или нескольких симптомов заболевания, расстройства и/или состояния. Обычным специалистам в данной области техники будет понятно, что термин "терапевтически эффективное количество" фактически не требует успеха лечения у конкретного индивидуума. Напротив, терапевтически эффективным количеством может быть такое количество, которое обеспечивает определенный желаемый фармакологический ответ у значительного числа субъектов при введении пациентам, нуждающимся в таком лечении. Следует понимать, что отдельные субъекты могут, в действительности, быть "невосприимчивыми" к "терапевтически эффективному количеству". В качестве лишь одного примера, невосприимчивый субъект может иметь низкую биологическую доступность, так что клиническая эффективность не достигается. В некоторых вариантах осуществления ссылка на терапевтически эффективное количество может быть ссылкой на величину, измеренную в одной или нескольких определенных тканях (например, тканях, затронутых заболеванием, расстройством или состоянием) или в жидкостях (например, в крови, слюне, сыворотке, поте, слезах, моче и т.д.). Обычным специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может присутствовать в препарате и/или может вводиться в виде разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество может присутствовать в препарате и/или вводиться в виде множества доз, например, как часть схемы лечения.

Лечение: используемый в данном описании термин "лечение" (также "лечить" или "терапия"), в самом широком смысле, относится к любому введению вещества (например, предложенных композиций), которое частично или полностью, улучшает, облегчает, снимает, ингибирует, задерживает наступление, уменьшает тяжесть и/или уменьшает частоту одного или нескольких симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления такое лечение можно осуществлять у субъекта, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или у субъекта, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. В качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления лечение можно осуществлять у субъекта, который имеет один или несколько установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение можно осуществлять у субъекта, который был диагностирован, как страдающий от соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение можно осуществлять у субъекта, который, как известно, имеет один или несколько факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния.

Лечение путем экспрессии антител *in vivo*: лимфоидные и нелимфоидные клетки (например, миелоциты, мезенхимальные стволовые клетки) могут быть генетически сконструированы *ex vivo* или *in vivo* для секреции полноразмерных IgG (Compte et al., *Biomatter* 3, 2013 Noel et al., 1997 *Hum Gene Ther* 8: 1219-1229). Генная терапия IgG с использованием рекомбинантного аденовируса, несущего последовательности ДНК, может позволять достигать высоких уровней IgG в сыворотке, но долговечность была ограничена иммуногенностью вируса (Noel et al., 2002 *Hum Gene Ther* 13:1483-1493; Jooss & Chirmule, 2004 *Gene Ther* 10:955-963). Аденоассоциированные вирусы (гААВ) и особенно селективные серотипы являются менее иммуногенными (Xiao et al., 2012 *Therapeutic Delivery* 3:835-856) и являются проверенными долговечными векторами для генной терапии человека (Nathwani et al., 2011, *N. Engl. J. Med.*, 365:2357-2365, Patel et al., 2014, *International Journal of Hematology* 99: 372-376). Были опубликованы доклинические данные о доказательствах концепции полноразмерных IgG-антител, специфичных для VEGFR-2 (DC101) (Fang et al., 2005 *Nat. Biotech* 23: 584-590), VEGF (Watanabe et al., 2009 *Hum. Gene Ther.*, 20:598-610), HER-2 (Ho et al., 2009 *Cancer Gene Ther.*, 16:184-194; Wang et al., 2010 *Cancer Gene Ther.*, 17, 559-570), Met (Vigna et al., 2008 *Cancer Res.*, 68: 9176-9183) и HIV (Balazs et al., 2012 *Nature* 481:81-84). Аналогичный успех был описан для одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv), направленного против связанного с ангиогенезом ламинина (Arafat et al., 2002 *Gene Ther* 9:256-262; Sanz et al., 2001 *Cancer Immunol. Immunother.*, 50:557-565; Sanz et al., 2003 *EMBO J.* 22: 1508-1517, Sanz et al., 2002 *Gene Ther.*, 9: 1049-1053), и его трехвалентной и шестивалентной форм (Sanchez-Arevalo et al., 2006 *Int. J. Cancer* 119: 455-462), или для scFv против VEGF (Afanasiyeva et al., 2003 *Gene Ther.*, 10: 1850-1859) и его бивалентных производных (миниантител и scFv-Fc), или для анти-HER2 scFv-иммунотоксина (Liu et al., 2009 *Cancer Gene Ther.*, 16: 861-872), или для биспецифических антител к CEACD3 (Blanco et al., 2007 *J. Immunol.*, 171: 1070-1077; Compte et al., 2007 *Cancer Gene Ther.*, 14: 380-388).

Вариант: используемый в данном описании термин "вариант" относится к объекту, который имеет

существенную структурную идентичность с эталонным объектом, но структурно отличается от эталонного объекта по присутствию или уровню одной или нескольких химических групп по сравнению с эталонным объектом. Во многих вариантах осуществления вариант также функционально отличается от эталонного объекта. В общем, решение о том, является ли конкретный объект действительно "вариантом" эталонного объекта, основывается на его степени структурной идентичности с эталонным объектом. Как будет понятно специалистам в этой области техники, любой биологический или химический эталонный объект имеет определенные характеристические структурные элементы. Вариант, по определению, является отдельным химическим объектом, который имеет общие один или несколько таких характеристических структурных элементов. В качестве лишь нескольких примеров, низкомолекулярное соединение может иметь характеристический основной структурный элемент (например, макроциклическое ядро) и/или одну или несколько характеристических боковых групп, так что вариантом низкомолекулярного соединения является такое соединение, которое имеет с ним общий основной структурный элемент и характеристические боковые группы, но отличается по другим боковым группам и/или по типам присутствующих связей (одиночные относительно двойных, E относительно Z и т.д.) в пределах ядра; причем полипептид может иметь характеристический элемент последовательности, состоящий из множества аминокислот, имеющих определенные позиции относительно друг друга в линейном или трехмерном пространстве и/или способствующих определенной биологической функции; а нуклеиновая кислота может иметь характеристический элемент последовательности, состоящий из множества нуклеотидных остатков, имеющих определенные позиции относительно друг друга в линейном или трехмерном пространстве. Например, вариантный полипептид может отличаться от эталонного полипептида в результате одного или нескольких отличий в аминокислотной последовательности и/или одного или нескольких отличий в химических группах (например, углеводных, липидных и т.д.), ковалентно присоединенных к полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид имеет общую идентичность по последовательности с эталонным полипептидом, которая составляет по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 99%. В качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид не имеет по меньшей мере одного характеристического элемента последовательности относительно эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид имеет одну или несколько биологических активностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения вариантный полипептид имеет общие одну или несколько биологических активностей с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления у вариантного полипептида отсутствует одна или несколько биологических активностей эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид имеет пониженный уровень одной или нескольких биологических активностей по сравнению с эталонным полипептидом. Во многих вариантах осуществления, представляющий интерес полипептид, считается "вариантом" родительского или эталонного полипептида, если представляющий интерес полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая идентична родительской, за исключением небольшого числа изменений последовательности в определенных положениях. Как правило, менее 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2% остатков в варианте являются замещенными по сравнению с родительской последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замещенный остаток по сравнению с родительской последовательностью. Часто вариант имеет очень небольшое количество (например, менее 5, 4, 3, 2, или 1) замещенных функциональных остатков (то есть, остатков, которые участвуют в той или иной биологической активности). Кроме того, вариант, как правило, имеет не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 добавлений или делеций и часто не имеет добавлений или делеций по сравнению с родительской последовательностью. Кроме того, любые добавления или делеций, как правило, короче примерно 25, примерно 20, примерно 19, примерно 18, примерно 17, примерно 16, примерно 15, примерно 14, примерно 13, примерно 10, примерно 9, примерно 8, примерно 7, примерно 6 и обычно имеют менее примерно 5, примерно 4, примерно 3 или примерно 2 остатков. В некоторых вариантах осуществления родительских или эталонный полипептид найден в природе. Как будет понятно специалистам в данной области техники, в природе обычно можно найти множество вариантов конкретного представляющего интерес полипептида, в частности, когда представляющий интерес полипептид является полипептидом из инфекционного агента.

Вектор: используемый в данном описании термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления векторы способны к экстрахромосомной репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны, в клетке-хозяине, такой как эукариотическая и/или прокариотическая клетка. Векторы, способные регулировать экспрессию функционально связанных генов, называются в данном описании "экспрессионными векторами".

Дикий тип: используемый в данном описании термин "дикий тип" имеет свое понимаемое в данной области значение, которое относится к объекту, имеющему структуру и/или активность, которая встречается в природе в "нормальном" (в отличие от мутантного, болезненного, измененного и т.д.) состоянии или контексте. Обычным специалистам в данной области будет понятно, что гены и полипептиды дикого типа часто существуют в нескольких различных формах (например, аллелях).

Подробное описание некоторых вариантов осуществления Устранение иммуносупрессии

Устранение отрицательных регуляторных путей, которые ингибируют иммунные клетки, быстро становится важным в лечении рака. Одним из самых ранних успешных примеров такого терапевтического подхода является утверждение в марте 2001 года Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами (FDA) ипилимумаба для лечения меланомы. Ипилимумаб является моноклональным антителом (MAb), мишенью которого является CTLA-4, ключевой отрицательный регулятор, обнаруженный на активированных Т-клетках. CTLA-4 связывается с членами семейства B7 молекул доступа, которые экспрессируются дендритными клетками (DC) и другими антигенпредставляющими клетками (APC). Связывание CTLA-4 с этими молекулами доступа эффективно ингибирует дальнейшую активацию и размножение Т-клеток, тем самым блокируя развитие иммунного ответа с участием таких клеток (Mellman et al., 2011 *Nature* 480:480-489). За счет направленного действия на CTLA-4 ипилимумаб блокирует это ингибирование, разрешая активацию и размножение Т-клеток, включая, в частности, те, которые разрушают раковые клетки.

Другие подходы, которые применялись для лечения рака путем устранения иммунного торможения, включают направленное действие на Т-клеточный ко-рецептор программируемой смерти-1 (PD-1) и его лиганды B7-H1/PD-L1 и B7-DC/PD-L2, которые являются частью биохимического пути, поддерживающего иммунодепрессивное микроокружение опухоли (Topalian et al., 2012 *Curr. Opin. Immunol.*, 24:207-212). В частности, фаза I/II клинических испытаний с использованием анти-PD-1 (Topalian et al., 2012 *N. Engl. J. Med.* 366:2443-2454) или анти-PD-L1 (Brahmer et al., 2012 *N. Engl. J. Med.*, 366: 2455-2465) антител продемонстрировала регрессию опухоли или стабилизацию на меланоме, немелкоклеточном раке легкого, раке почки и раке яичников.

Также были разработаны другие подходы для устранения иммунного торможения, осуществляемого естественными киллерными клетками (NK). Например, Ig-подобные рецепторы киллерных клеток человека (KIR) представляют собой гликопротеины, которые экспрессируются на поверхностях NK-клеток и связываются с подтипами I типа главного комплекса гистосовместимости (MHC)/человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) на потенциальных клетках-мишенях. Это связывание ингибирует цитотоксичность NK-клеток. В клинических испытаниях было показано, что моноклональные антитела против KIR блокируют такое ингибирование, уменьшая подавление активности NK. (Romagne et al., 2009, *Blood* 114: 2667-2677).

Аналогично, лейкоцитарные Ig-подобные рецепторы (LIR, также известные как Ig-подобные транскрипты, ILT) также экспрессируются на поверхности NK-клеток (а также некоторых Т- и В-лимфоцитов и некоторых макрофагов, тучных клеток и дендритных клеток) и также связываются с подтипами класса I MHC/HLA, что приводит к ингибированию активности LIR-экспрессирующих эффекторных клеток. В некоторых исследованиях сообщалось об успешности стимуляции цитотоксичности эффекторных клеток путем блокирования взаимодействия между LIR и молекулами класса I MHC/HLA (Godal et al., 2010, *Biol. Blood Marrow Transplant* 16:612-621).

Кроме того, был реализован целый ряд подходов, которые направлены на отмену связанной с опухолью иммуносупрессии путем направленного действия на связанные с опухолью антигены. Например, были изучены блокирующие MAb (например, анти-CD47) и было установлено, что они эффективны для стимуляции макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток при лейкемии/лимфоме и в моделях солидных опухолей как *in vitro*, так и *in vivo* (Zhao et al., 2011, *Proc. Nat. Sci. USA* 108:18342-18247, Majeti et al., 2009, *Cell* 138: 286-299; Chao et al., 2011, *Cancer Res.*, 71:1374-1384; Chao et al., 2010, *Sci. Transl. Med.* 2:63ra94; Chao et al., 2010, *Cell* 142:699-713; Willingham et al., 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:6662-6667).

Другие опухолевые антигены-мишени, представляющие особый интерес, включают ганглиозид GD2, который в высокой степени экспрессируется на опухолях, полученных из нейроэктодермы и на саркомах, но его экспрессия ограничена на нормальных клетках. Показано, что направленное действие на GD2 способствует активации NK-клеток посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) (Tarek et al., 2012, *J. Clin. Invest.* 122: 3260-3270).

B7H3 человека (также известный как CD276) является членом надсемейства B7/CD28 иммуноглобулинов, который обеспечивает важные ко-стимулирующие сигналы, регулирующие функцию Т-клеток в контексте опухолевого надзора, а также инфекционных и аутоиммунных заболеваний (Wilcox et al., 2012, *Eur. J. Haematol.* 88:465-475).

B7H3 широко экспрессируется на многих типах солидных опухолей, включая рак предстательной железы (Roth et al., 2007, *Cancer Res.*, 67:7893-900; Zang et al., 2007, *Proc., Nat., Acad. Sci., USA* 104:19458-19463), почечно-клеточный рак, карциному уротелиальных клеток (Crispen et al., 2008, *Cancer Res.*, 14: 5150-157, Boorjian et al., *Clin. Cancer Res.*, 14: 4800-4808), рак яичников (Zang et al., 2010, *Mod. Pathol.*, 23: 1104-1112), глиобластоме (Lemke et al., 2012, *Cancer Res.*, 18: 105-117), остеосаркому (Wang et al., 2013, *PLoS One* 8: e70689), нейробластоме (Gregorio et al., 2008, *Histopathology* 53: 73-80), диффузную внутреннюю понтийскую глиому (DIPG) (Zhou et al., 2013, *J. Neurooncol.*, 111: 257-264), мезотелиому (Calabro et al., 2011, *J. Cell Physiol.*, 226: 2595-600) и рак поджелудочной железы (Yamato et al., 2009, *Br.*

J. Cancer 101: 1709-1716).

B7H3 первоначально был идентифицирован как трансмембранный белок I типа, который, подобно всем другим членам семейства B7, имеет внеклеточную область, содержащую только один V-подобный и один C-подобный Ig-домен (эта форма B7H3 была названа 2Ig-B7H3) (Charoval et al., 2001, Nat. Immunol., 2, 2 69-274). Затем была идентифицирована вторая форма B7H3 человека (huB7H3) (названная 4Ig-B7H3), которая содержит дублирование V-подобного и C-подобного Ig-домена в tandem (Steinberger et al., 2004, J. Immunol., 172: 2352-2359; Sun et al., 2002, J. Immunol., 168: 6294-6297).

B7H3 считается ингибирующим как для NK-клеток, так и для Т-клеток. Идея ингибирующей роли B7H3 подтверждается сообщениями о том, что как форма 2Ig, так и 4Ig, B7H3 человека могут ингибировать пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов (Steinberger et al., 2004, J. Immunol., 172: 2352-2359, Sun et al., 2002 J. Immunol., 168: 6294-6297). Исследования на B7H3-дефицитных мышах позволили предположить, что B7H3 преимущественно подавляет TH1- (в отличие от TH2-) опосредованные иммунные ответы (Suh et al., 2003, Nat. Immunol., 4: 899-906). А другие исследования показали, что форма 4Ig-B7H3 может ингибировать NK-опосредованный лизис клеток нейробластомы, взаимодействуя с предполагаемым ингибирующим рецептором на поверхности NK-клеток (Castriconi et al., 2004, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 101: 12640-12645). В более поздних исследованиях с участием пациентов с раком предстательной железы уровень экспрессии B7H3 в опухолевой ткани во время операции высоко коррелировал со степенью метастазирования опухоли, с повышенным риском клинического рецидива рака и со смертью вследствие онкологического заболевания (Roth et al., 2007, Cancer Res., 67: 7893-7900; Zang et al., 2007, Proc. Science, Sci., USA 104: 19458-19463). Аналогично, высокий уровень экспрессии B7H3 в опухолевой ткани коррелирует с низкой выживаемостью пациентов при карциноме почечных клеток с прозрачными клетками, карциноме уротелиальных клеток (Crispen et al., 2008, Cancer Res., 14: 5150-5157; Boorjian et al., 2008, Clin Cancer Res., 14: 4800-4808), раке яичников (Zang et al., 2010, Mod. Pathol., 23: 1104-1112), глиобластоме (Lemke et al., Clin. Cancer Res., 18: 105-117) остеосаркоме (Wang et al., 2013, PLoS One 8: e70689), раке поджелудочной железы (Yamato et al., 2009, Br. J. Cancer 101: 1709-1716) и нейробластоме (Gregorio et al. 2008, Histopathology 53: 73-80).

На основании данных кристаллической структуры для мышинного B7H3 (muB7H3) было предложено, что B7H3 ингибирует пролиферацию Т-клеток, по меньшей мере частично, через FG-петлю своего IgV-домена (Vigdorovich et al., 2013, Structure 21: 707-717).

С другой стороны, B7H3 может также обладать свойствами стимуляции Т-клеток в зависимости от рецепторов, с которыми он взаимодействует (Hofmeyer et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 10277-10278). Например, в нескольких ранних публикациях указывалось, что человеческий 2Ig-B7H3 способствует активации Т-клеток и продукции IFN- γ путем связывания с предполагаемым рецептором на активированных Т-клетках (Charoval et al., 2001, Nat. Immunol., 2, 269-274). Более того, исследования с использованием некоторых моделей мышинных опухолей дали данные, свидетельствующие о том, что противоопухолевая реакция иммунной системы усиливается при экспрессии B7H3 (Sun et al., 2003, Gene Ther., 10: 1728-1734). А исследования на человеке позволили предположить, что присутствие B7H3 коррелирует с повышенной выживаемостью при раке желудка (Wu et al., 2006, World J. Gastroenterol., 12: 457-459) и поджелудочной железы (Loos et al., 2009, BMC Cancer 9: 463).

Было показано, что мышинное антитело, известное как m8H9, которое связывается с B7H3, направленно действует на опухоли головного мозга, детские саркомы и нейробластомы и в меньшей степени - аденокарциномы (Modak et al., 2001, Cancer Res., 61: 4048-4054; Xu et al., 2009, Cancer Res., 69: 6275-6281). Среди первичных опухолей головного мозга 15 из 17 протестированных глиобластом, 3 из 4 протестированных смешанных глиом, 4 из 11 протестированных олигодендроглиом, 6 из 8 протестированных астроцитом, 2 из 2 протестированных менингиом, 3 из 3 протестированных шванном, 2 из 2 протестированных медуллобластом, 1 из 1 протестированной нейрофибромы, 1 из 2 протестированных нейронгенных опухолей, 2 из 3 протестированных эпендиом и 1 из 1 протестированной пинеобластомы показали связывание с 8H9. Среди сарком, 21 из 21 протестированных примитивных нейроэктодермальных опухолей/Юинга, 28 из 29 протестированных рабдомиосарком, 28 из 29 протестированных остеосарком, 35 из 37 протестированных десмопластических мелко-круглоклеточных опухолей, 2 из 3 протестированных синовиальных сарком, 4 из 4 протестированных лейомиосарком, 1 из 1 злокачественной фиброзной гистиоцитомы и 2 из 2 протестированных недифференцированных сарком показали положительный результат на связывание 8H9. 87 из 90 протестированных нейробластом, 12 из 16 протестированных меланом, 3 из 4 протестированных гепатобластом, 7 из 8 протестированных опухолей Вильмса, 3 из 3 протестированных рабдоидных опухолей и 12 из 27 протестированных аденокарцином также дали положительный результат. Напротив, m8H9 не связывалось с нормальными тканями человека, включая костный мозг, ободочную кишку, желудок, сердце, легкие, мышцы, щитовидную железу, яички, поджелудочную железу и мозг человека (лобная доля, мозжечок, моста и спинной мозг) (Modak et al., 2001 Cancer Res 61: 4048-4054).

Антительные агенты 8H9

Как было отмечено выше, антитела 8H9 специфически связываются с B7H3. В отличие от других протестированных анти-B7H3 антител, только 8H9 могут быть использованы для связывания FG-петли

В7Н3 и блокирования иммунноингибирующей функции В7Н3.

Иммуногистохимические исследования продемонстрировали, что m8H9 реагирует со многими солидными опухолями человека, включая эмбриональные опухоли и карциномы (Modak et al., 2001, *Cancer Res.*, 61: 4048-4054). Для m8H9 было показано поглощение опухолями как для саркомы, так и для опухолей головного мозга в моделях ксенотрансплантата (Modak et al., 2005, *Cancer Biother, Radiopharm* 20: 534-546; Luther et al., 2008, *Neurosurgery* 63: 1166-1174; обсуждение на стр. 1174), а когда антитело конъюгировано с фактором из яда кобры, оно индуцирует эффективный комплемент-опосредованный лизис опухоли (Juhl et al., 1997, *Immunobiology* 197: 444-459). Кроме того, показано, что одноцепочечная Fv-форма (scFv) m8H9 способна селективно доставлять мощный иммунотоксин в саркому и глиому в доклинической модельной системе (Onda et al., *Cancer Res.*, 64: 1419-1424, Luther et al., 2010, *Mol. Cancer Ther.*, 9: 1039-1046).

В качестве части химерного антигенного рецептора (CAR) scFv-форма m8H9 способна направлять NK-клетки на уничтожение В7Н3(+)-положительных опухолевых клеток (Cheung et al., 2003, *Hybrid Hybridomics* 22: 209-218). Более того, некоторые ранние фазы клинических испытаний на человеке показали, что радиоиммунотерапия с ¹³¹I-меченным 8H9 продлевает выживаемость пациентов с высоким риском развития метастатического рака центральной нервной системы (Kramer et al., 2007, *American Association for Cancer Research LB-4* (Презентация), Kramer et al., 2008, Презентация на ISPNO 2008).

В настоящее время проводятся несколько клинических испытаний фазы 1 по радиоиммунотерапии на основе m8H9 лептоменингеальных метастазов (Kramer et al., 2010 *J Neurooncol* 97: 409-418) и диффузной внутренней понтитической глиомы (DIPG) (NCT01502917) (Zhou Et al., 2013, *J. Neurooncol*, 111: 257-264).

Согласно информации авторов единственным другим анти-В7Н3-антителом, подлежащим клиническому испытанию, является MGA271, гуманизированное IgG1-MAb (NCT01391143) (Loo et al., 2012, *Cancer Res.*, 18: 3834-3845, 2012).

Радиоактивно меченное антитело m8H9 в настоящее время проходит клинические испытания терапии десмопластических мелко-круглоклеточных опухолей и других солидных опухолей, затрагивающих брюшину (протокол NCI, ID 09-090 NCT01099644). Мышиное антитело

Мышиное 8H9 (m8H9) представляет собой IgG1-моноклональное антитело (MAb), мишенью которого является В7Н3.

Гуманизированные и аффинно-зрелые антитела

Хотя m8H9 является перспективным в качестве терапевтического агента для лечения рака у людей, он имеет мышиное происхождение. Использование человеческих антител является предпочтительным в этом контексте, среди прочего потому, что оно снижает вероятность иммунных реакций против вводимого антитела.

Изобретение обеспечивает некоторые последовательности гуманизированных антител и также некоторые последовательности аффинно-зрелых антител, обнаруженные в антителах, которые связываются с В7Н3 и, в частности, с его FG-петлей. Например, в качестве частного примера в настоящем описании приведены антитела (например, полноразмерные антитела, их фрагменты, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или другие форматы антител, описанные в данном документе или известные в данной области техники), которые включают полипептиды, содержащие элементы последовательностей, описанные в настоящем документе.

В частности, настоящее изобретение относится к антительному агенту, который специфично связывается с белком 2Ig-В7Н3 и включает иммуноглобулиновую легкую цепь, указанную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 (приведены ниже), или ее значимый эпитопсвязывающий участок, и/или включает иммуноглобулиновую тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16 (приведены ниже), или ее значимый эпитопсвязывающий участок.

SEQ ID NO.: 1 (легкая цепь ch8H9)

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSG
SGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 2 (легкая цепь hu8H9 L1)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSIDYLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIPARFSG
SGSGTEFTLTISVQPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 3 (легкая цепь hu8H9 L2)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSIDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPARFSG
SGSGTEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 4 (легкая цепь hu8H9 L3)

EIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSIDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPARFSG
SGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 5 (легкая цепь hu8H9 3.1)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSIDYLYWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPARFSG
SGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 6 (легкая цепь hu8H9 4.1)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSIDYLHWYQQKSHQAPRLLIKYASQSIGIPARFSG
SGSGSEFTLTISSLPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 7 (легкая цепь hu8H9 5.1)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSIDYLYWYQQKSHQAPRLLIKYASQSIGIPARFSG
SGSGSEFTLTISSLPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY

ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 8 (легкая цепь ch8H9 6.1; ch8H9+6 мутаций после созревания аффинности)

DIVMTQSPATLSVTPGDRVTLSCRASQSSISDYLYWYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPSRFSG
SGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.: 9 (тяжелая цепь ch8H9)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTATWFAYWGQGTTLVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 10 (тяжелая цепь hu8H9 H1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYFCARQTATWFAYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 11 (тяжелая цепь hu8H9 H2)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYMELSRITSEDTAVYFCARQTATWFAYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 12 (тяжелая цепь hu8H9 H3)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYFCARQTATWFAYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPFVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 13 (тяжелая цепь hu8H9 3.1)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPFVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 14 (тяжелая цепь hu8H9 4.1)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
KGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPFVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 15 (тяжелая цепь hu8H9 5.1)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKCTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPFVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.: 16 (тяжелая цепь ch8H9 6.1; ch8H9+6

мутаций после созревания аффинности)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
KGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPFVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления предложенный антителный агент представляет собой или содержит антитело, которое является членом класса антител, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, или его фрагментом.

Предложенные антителные агенты, включая антитела и/или их характеристические участки, или нуклеиновые кислоты, кодирующие их, могут быть получены любым доступным способом. Технологии получения антител (например, моноклональных антител и/или поликлональных антител) хорошо известны в данной области техники. Следует принять во внимание, что для производства антисывороток может быть использован широкий спектр видов животных, включая кролика, мышь, крысу, хомяка, морскую свинку или козу. Выбор животного может быть осуществлен, исходя из легкости манипуляций, затрат

или желаемого количество сыворотки, что должно быть известно специалисту в данной области техники. Следует учитывать, что антителы также могут быть получены трансгенно путем создания млекопитающего или растения, которое является трансгенным по последовательностям тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, представляющих интерес. При продукции трансгенов в млекопитающих, антитела могут быть получены и выделены из молока коз, коров или других млекопитающих. См., например, патенты США №№ 5827690, 5756687, 5750172 и 5741957 (включены в настоящее описание путем ссылки во всей полноте).

Предложенные антитела (включая антитела и/или характеристические участки) могут быть получены, например, с использованием системы клеток-хозяев, сконструированной для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по изобретению. В альтернативном варианте или дополнительно, предложенные антитела могут быть частично или полностью получены химическим синтезом (например, с использованием автоматизированного пептидного синтезатора).

Технологии изготовления и использования поликлональных и моноклональных антител описаны, например, в Harlow et al., *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I*. Cold Spring Harbor Laboratory (Dec. 1, 1998).

Технологии изготовления модифицированных антителных агентов, таких как антитела и фрагменты антител (например, химерные антитела, реконструированные антитела, гуманизированные антитела или их фрагменты, например, Fab'-, Fab-, F(ab')₂-фрагменты); или биосинтетические антитела (например, одиноцепочечные антитела, однодоменные антитела (DAB), Fv, одиноцепочечные Fv (scFv) и т.п.), которые известны в данной области и могут быть найдены, например, в Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives*, Springer Verlag (15-е декабря 2000 г.; 1-е издание).

Примеры источников для препаратов антителных агентов, пригодные для данного изобретения, включают, но не ограничиваются ими, кондиционированную культуральную среду, полученную после культивирования рекомбинантной клеточной линии, которая экспрессирует белок, представляющий интерес, или из клеточного экстракта, например, антителопродуцирующих клеток, бактерий, грибковых клеток, клеток насекомых, трансгенных растений или растительных клеток, трансгенных животных или клеток животных, или из сыворотки крови животных, асцитной жидкости, супернатантов гибридом или миелом. Подходящие бактериальные клетки включают, но не ограничиваются ими, клетки *Escherichia coli*. Примеры подходящих штаммов *E. coli* включают: HB101, DH5a, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 и любой штамм *E. coli*, который не расщепляет чужеродную ДНК. Подходящие грибковые клетки-хозяева, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и клетки *Aspergillus*. Подходящие клетки насекомых включают, но не ограничиваются ими, клетки S2 Schneider, клетки D. Mel-2, SF9, SF21, High-5TM, MimicTM-SF9, клетки MG1 и KC1. Подходящие иллюстративные рекомбинантные клеточные линии включают, но не ограничиваются ими, линию миеломы мышей BALB/C, ретинобласты человека (PER.C6), клетки почки обезьяны, линию клеток почки эмбриона человека (293), клетки почки детеныша хомячка (BHK), клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки Сертоли мыши, клетки почки собаки, клетки печени серой крысы, клетки легких человека, клетки печени человека, клетки опухоли молочной железы мыши, клетки TRI, клетки MRC 5, клетки FS4 и линию гепатомы человека (Hep G2).

Антителные агенты, представляющие интерес, можно проэкспрессировать с использованием любого подходящего вектора. Множество векторов (например, вирусные векторы) известны в данной области техники; клетки, в которые были введены такие векторы (или потомство таких клеток) могут быть выращены, как известно в данной области (например, с использованием непрерывных или подпитываемых культуральных систем). В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть модифицированы методами генной инженерии; технологии генетической инженерии клеток, чтобы экспрессировать сконструированные полипептиды (например, полипептиды антителных агентов, описанные в настоящем документе) хорошо известны в данной области техники. См., например, Ausabel et al., eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York).

В некоторых вариантах осуществления предложенные антителные агенты могут быть очищены, если желательно, с помощью фильтрования, центрифугирования и/или различных хроматографических технологий, таких как ВЭЖХ или аффинная хроматография. В некоторых вариантах осуществления фрагменты предложенных антителных агентов получают с помощью способов, которые включают расщепление с использованием ферментов, таких как пепсин или папаин, и/или путем расщепления дисульфидных связей при химическом восстановлении.

В общем случае, как описано в данном документе, предложенные антителные агенты могут представлять собой или включать, например, поликлональное антитело; моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; модифицированное антитело, такое как химерное антитело, реконструированное антитело, гуманизированное антитело или его фрагмент (например, Fab', Fab, F(ab')₂); или биосинтетическое антитело, например, одиноцепочечное антитело, однодоменное антитело (DAB), Fv, одиноцепочечный Fv (scFv) и т.п.

Таблица 1

№ антитела	Легкая цепь	Тяжелая цепь
1	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 9
2	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 10
3	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 11
4	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 12
5	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 13
6	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 14
7	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 15
8	SEQ ID NO.: 1	SEQ ID NO.: 16
9	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 9
10	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 10
11	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 11
12	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 12
13	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 13
14	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 14
15	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 15
16	SEQ ID NO.: 2	SEQ ID NO.: 16
17	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 9
18	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 10
19	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 11
20	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 12
21	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 13
22	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 14
23	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 15
24	SEQ ID NO.: 3	SEQ ID NO.: 16
25	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 9
26	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 10
27	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 11
28	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 12
29	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 13
30	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 14
31	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 15
32	SEQ ID NO.: 4	SEQ ID NO.: 16
33	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 9
34	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 10
35	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 11
36	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 12
37	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 13
38	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 14
39	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 15
40	SEQ ID NO.: 5	SEQ ID NO.: 16
41	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 9
42	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 10

43	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 11
44	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 12
45	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 13
46	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 14
47	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 15
48	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 16
49	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 9
50	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 10
51	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 11
52	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 12
53	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 13
54	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 14
55	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 15
56	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 16
57	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 9
58	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 10
59	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 11
60	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 12
61	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 13
62	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 14
63	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 15
64	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 16

Конкретные примеры вариантов осуществления - специфические аминокислотные остатки

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент включает легкую цепь иммуноглобулина, включающую остаток треонина в положении 20 и остаток тирозина в положении 34, и/или тяжелую цепь иммуноглобулина, включающую остаток треонина в положении 24, остаток глицина в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56 и остаток глицина в положении 102.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент несет гомологичную аминокислотную замену в отношении треонина в положении 20 легкой цепи, тирозина в положении 34 легкой цепи, треонина в положении 24 тяжелой цепи, глицина в положении 42 тяжелой цепи, аспарагиновой кислоты в положении 56 тяжелой цепи и глицина в положении 102 тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент включает легкую цепь иммуноглобулина, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, включающую остаток треонина в положении 20 и остаток тирозина в положении 34, и/или включает тяжелую цепь иммуноглобулина, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16, включающую остаток треонина в положении 24, остаток глицина в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56 и остаток глицина в положении 102.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент представляет собой мышиное антитело 8Н9, в котором легкая цепь иммуноглобулина включает остаток треонина в положении 20 и остаток тирозина в положении 34, и в котором тяжелая цепь иммуноглобулина включает остаток треонина в положении 24, остаток глицина в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56 и остаток глицина в положении 102.

Среди прочего, в настоящем изобретении продемонстрировано, что присутствие этих аминокислотных остатков в антительном агенте 8Н9 повышает аффинность связывания антительного агента к В7Н3 относительно наблюдаемой для m8Н9. То есть введение этих остатков в m8Н9 повышает его аффинность связывания с В7Н3, и в частности, с FG-петлей его V-домена.

Специалистам в данной области техники должны быть известны разнообразные технологии, общепризнанные в данной области, для выполнения такого введения или для иного получения, обеспечения или изготовления полипептидов, содержащих такие последовательности. Примеры технологий, используемых для этого, предусмотрены, например, в Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Конкретные примеры вариантов осуществления - специфическая аффинность

Настоящее изобретение предлагает первое доказательство того, что антительные агенты, включаю-

щие антительные агенты 8H9, направленные на FG-петлю B7H3, могут быть использованы для блокирования функции иммуноторможения B7H3.

Настоящее изобретение относится к антительным агентам, специфически связывающимся с эпитопом, представленным в SEQ ID NO: 32 (приведена ниже), расположенным в FG-петле V-домена белка 2Ig-B7H3 и в доменах V1 и V2 белка 4Ig-B7H3, причем антительные агенты специфически связываются с этим же эпитопом с константой диссоциации (K_D) менее 2 нМ. Как раскрыто в примерах в данном описании, описанные гуманизированные и аффинно-зрелые антитела и связывающие фрагменты 8H9 имеют эти характеристики. В некоторых вариантах осуществления эти антительные агенты не являются m8H9.

Эпитоп IRDF имеет межвидовую консервативность и найден, например, у человека, собаки, шимпанзе, орангутанга, гиббона, макаки, игрунки, свиньи, лошади, панды и слона. Настоящее изобретение относится к антительным агентам, специфически связывающимся с эпитопом, указанным в SEQ ID NO: 32, который присутствует у человека и животных, включая собаку, шимпанзе, орангутанга, гиббона, макаку, игрунку, свинью, лошадь, панду и слона.

SEQ ID NO: 32 представляет собой IRDF.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительные агенты связываются с FG-петлей в V-домене белка 2Ig-B7H3 и в доменах V1 и V2 белка 4Ig-B7H3 с K_D (нМ) ниже 100 нМ, ниже 80 нМ, ниже 50 нМ, ниже 30 нМ, ниже 10 нМ, ниже 5 нМ и ниже 2 нМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительные агенты подавляют ингибирующее действие B7H3 на пролиферацию и функции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительные агенты подавляют ингибирующее действие B7H3 на пролиферацию и функции Т-клеток и/или повышают опосредованную Т-клетками цитотоксичность.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент, описанный в настоящем документе, подавляет ингибирующее действие B7H3 на активность и/или функции НК-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент, описанный в настоящем документе, подавляет ингибирующее действие B7H3 на активность и/или функции НК-клеток, и/или повышает активность и/или функции НК-клеток.

Методы анализа для определения таких эффектов широко известны в данной области техники. Некоторые иллюстративные, но не ограничивающие, методы анализа представлены в приведенных в данном описании примерах.

В некоторых вариантах осуществления антительные агенты включают и/или представляют собой антитела, фрагменты антител и/или scFv.

Конкретные примеры вариантов осуществления - специфичные CDR

Как известно в данной области, антитела человека и мыши, как правило, состоят из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, каждая из которых содержит переменные области и константные области. Варибельная область легкой цепи, как правило, состоит из 3 CDR (определяющих комплементарность областей), указанных в настоящем описании как CDRL1, CDRL2 и CDRL3, фланкированных каркасными областями. Варибельная область тяжелой цепи, как правило, состоит из 3 CDR, указанных в настоящем описании как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, фланкированных каркасными областями (см., например, William E. Paul, *Fundamental Immunology* (7th ed.), Lippincott Williams & Wilkins 2013).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включает легкую цепь иммуноглобулина, содержащую CDRL1, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 39, 40, 45, 46, 51 и 52 (описанных ниже), или ее соответствующий эпитопсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, scFv и/или его соответствующий эпитопсвязывающий участок.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включает легкую цепь иммуноглобулина, содержащую CDRL2, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 и 54 (описанных ниже), или ее соответствующий эпитопсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, scFv и/или его соответствующий эпитопсвязывающий участок.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включает легкую цепь иммуноглобулина, содержащую CDRL3, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 и 56 (описанных ниже), или ее соответствующий эпитопсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления антительный агент представляет собой антитело, scFv и/или его соответствующий эпитопсвязывающий участок.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антительный агент, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включает тяжелую цепь иммуноглобулина,

содержащую CDRH1, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 и 76 (описанных ниже), или ее соответствующий эпитопсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления антителный агент представляет собой антитело, scFv и/или его соответствующий эпитопсвязывающий участок.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антителный агент, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включает тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую CDRH2, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59, 60, 65, 66, 71, 72, 77 и 78 (описанных ниже), или ее соответствующий эпитопсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления антителный агент представляет собой антитело, scFv и/или его соответствующий эпитопсвязывающий участок.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антителный агент, который специфически связывается с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включает тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую CDRH3, приведенную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61, 62, 67, 68, 73, 74, 79 и 80 (описанных ниже), или ее соответствующий эпитопсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления антителный агент представляет собой антитело, scFv и/или его соответствующий эпитопсвязывающий участок.

В настоящем изобретении предусмотрены антителные агенты, включающие CDR, представленные ниже, в любой возможной комбинации. Например, но не в качестве ограничения, данное изобретение включает антителные агенты, включающие CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые представляют собой SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 62, соответственно.

Изготовление антител, имеющих желаемые CDR и/или каркасные области в общем известно в данной области и описано, например, в Strohl & Strohl, Therapeutic Antibody Engineering, Woodhead Publishing Limited 2012.

	CDRL1	CDRL2	CDRL3
	Кабат		
m8h9, ch8H9	RASQSIDYLH	YASQSIG	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 33	SEQ ID NO.: 35	SEQ ID NO.: 37
Hu8H9 3.1, 5.1	RASQSIDYLY	YASQSIG	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 34	SEQ ID NO.: 36	SEQ ID NO.: 38
	Чотия		
m8h9, ch8H9	SQSIDY	YAS	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 39	SEQ ID NO.: 41	SEQ ID NO.: 43
Hu8H9 3.1, 5.1	SQSIDY	YAS	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 40	SEQ ID NO.: 42	SEQ ID NO.: 44
	Хонеггер		
m8h9, ch8H9	ASQSIDY	YASQSIGIPSR	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 45	SEQ ID NO.: 47	SEQ ID NO.: 49

Hu8H9 3.1, 5.1	ASQSISDY	YASQSISGIPAR	GHSFPL
	SEQ ID NO.: 46	SEQ ID NO.: 48	SEQ ID NO.: 50
IMGT			
m8h9, ch8H9	QSISDY	YAS	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 51	SEQ ID NO.: 53	SEQ ID NO.: 55
Hu8H9 3.1, 5.1	QSISDY	YAS	QNGHSFPLT
	SEQ ID NO.: 52	SEQ ID NO.: 54	SEQ ID NO.: 56
	CDRH1	CDRH2	CDRH3
Кабат			
m8h9, ch8H9	NYDIN	WIFPGDGSTQYNEK	QTTATWFAY
	SEQ ID NO.: 57	FKG	SEQ ID NO.: 61
		SEQ ID NO.: 59	
Hu8H9 3.1, 5.1	NYDIN	WIFPGDDSTQYNEK	QTTGTWFAY
	SEQ ID NO.: 58	FKG	SEQ ID NO.: 62
		SEQ ID NO.: 60	
Чотия			
m8h9, ch8H9	GYTFTNY	PGDG	TTATWFA
	SEQ ID NO.: 63	SEQ ID NO.: 65	SEQ ID NO.: 67
Hu8H9 3.1, 5.1	GYTFTNY	PGDD	TTGTWFA
	SEQ ID NO.: 64	SEQ ID NO.: 66	SEQ ID NO.: 68
Хонеггер			
m8h9, ch8H9	ASGYTFTNYD	IFPGDGSTQYNEKF	QTTATWFA
	SEQ ID NO.: 69	KGKA	SEQ ID NO.: 73
		SEQ ID NO.: 71	
Hu8H9 3.1, 5.1	TSGYTFTNYD	IFPGDDSTQYNEKF	QTTGTWFA
	SEQ ID NO.: 70	KGRV	SEQ ID NO.: 74
		SEQ ID NO.: 72	
IMGT			
m8h9, ch8H9	GYTFTNYD	IFPGDGST	ARQTTATWFAY
	SEQ ID NO.: 75	SEQ ID NO.: 77	SEQ ID NO.: 79
Hu8H9 3.1, 5.1	GYTFTNYD	IFPGDDST	ARQTTGTWFAY
	SEQ ID NO.: 76	SEQ ID NO.: 78	SEQ ID NO.: 80

Форматы антительных агентов

Специалистам в этой области техники при прочтении настоящего описания будет понятно, что предложенные последовательности антител или их эпитопсвязывающие участки, могут быть успешно введены в любой из разнообразных форматов, на основе иммуноглобулинов, или других полипептидных форматов; поэтому, варианты осуществления настоящего изобретения включают различные полипептиды и полипептидные форматы, включающие элементы последовательности или их эпитопсвязывающие участки, описанные в настоящем документе. Включенными в такие предлагаемые полипептиды и полипептидные форматы являются те, которые специфически связываются с B7H3 и, в частности, с его FG-петлей. В некоторых конкретных вариантах осуществления предложенные полипептиды и/или полипептидные форматы конкурируют с m8H9 за связывание с B7H3, например, с его FG-петлей.

Одноцепочечные Fv (scFv)

Одноцепочечные Fvs (scFvs) хорошо известны и используются в данной области техники. Одноцепочечный Fv представляет собой слитый белок из переменных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулинов, часто связанных коротким линкерным пептидом (см., например, Benny K. C. Lo (ed.), *Antibody Engineering - Methods and Protocols*, Humana Press 2004, и приведенные там ссылки).

Настоящее изобретение также относится к одноцепочечным Fv (scFvs), специфически связывающимся с белком B7H3 и включающим полипептид, приведенный в последовательности SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 (описанных ниже). Полипептиды, приведенные в SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27, более подробно описаны в настоящем документе в примерах.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид scFv конъюгирован с терапевтическим агентом или детектируемым агентом, либо содержит треонин в положении 24, глицин в положении 42, остаток аспарагиновой кислоты в положении 56, остаток глицина в положении 102, оста-

ток треонина в положении 153 и остаток тирозина в положении 167. 6 конкретных аминокислотных остатков в этих 6 конкретных положениях описаны в примерах.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эти аминокислотные остатки замещены гомологичной аминокислотой (т.е. имеющей аналогичные характеристики).

Как известно специалистам в данной области, создание scFv и их модификации в соответствии с настоящим изобретением являются обычным в данной области (см., например, Benny K. C. Lo (ed.), *Antibody Engineering - Methods and Protocols*, Humana Press 2004, и приведенные там ссылки).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид scFv слит со вторым полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полипептид scFv, приведенный в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27, слит со вторым полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29 (приведены ниже), чтобы создать биспецифичный tandemный scFv. SEQ ID NO: 28 включает последовательность линкерного пептида и пептидную последовательность scFv, связывающего huOkt3 (анти-CD3), который является частью комплекса Т-клеточного рецептора. Аналогичным образом, SEQ ID NO: 29 включает последовательность линкерного пептида и пептидную последовательность scFv-фрагмента анти-DOTA антитела C825.

Применение биспецифических tandemных scFv хорошо известно и принято в данной области и совпадает с применением биспецифических антител, которые описаны в данном документе в других местах. Как известно специалистам в данной области, создание scFv и их модификация, включая, но не ограничиваясь этим, изготовление биспецифических tandemных scFv в соответствии с настоящим изобретением является обычным в данной области (см., например, Benny K. C. Lo (ed.), *Antibody Engineering - Methods and Protocols*, Humana Press 2004, и приведенные там ссылки).

В некоторых вариантах осуществления scFv, включающий полипептид, приведенный в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27, слит на своем С-конце с N-концом полипептида, приведенного в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29. в некоторых вариантах осуществления scFv, включающий полипептид, приведенный в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27, слит на своем С-конце с N-концом полипептида, приведенного в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

SEQ ID NO.: 17 (hu8H9 H3L3 scFv) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTATWFAIWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSIDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
 ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 18 (hu8H9 клон S3.3 scFv) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTATWFAIWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
 ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 19 (hu8H9 клон S7.2 scFv) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASCKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTATWFAIWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
 GGVGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
 ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 20 (hu8H9 клон S7.17 scFv) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWVWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTSTWFAIWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQPIDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
 ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGYSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 21 (hu8H9 клон S7.22 scFv) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQYNEKF
 KGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRPEDTAVYFCARQTTGTWFAIWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
 ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 22 (hu8H9 клон S7.28 scFv) является
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKF
 KGKATLTDDTSTSTAYMELSSLGSEDTAVYFCTRQTTATWFAIWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGS
 SGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIGDYLYWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
 ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 23 (hu8H9 клон S7.29 scFv) является

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFSTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYLELSSLSGSEDTAVYFCARQTTGTWTFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSHSPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 24 (hu8H9 3.1 scFv) является

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFSTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKF
KGKATLTDTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYFCARQTTGTWTFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSHSPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 25 (hu8H9 4.1 scFv) является

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKASGYTFSTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKF
KGRVTMTDTSTSTVYMELSSLSRSEDTAVYFCARQTTATWTFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSHQAPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 26 (hu8H9 5.1 scFv) является

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKTSGYTFSTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKF
KGRVTMTDTSTSTVYMELSSLSRSEDTAVYFCARQTTGTWTFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSHQAPRLLIKYASQSSISGIP
ARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKR

SEQ ID NO.: 27 (ch8H9 6.1 scFv) является

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFSTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKF
KGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWTFAYWGQGLTVTVSAGGGSGGGGS
GGGGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSHSPRLLIKYASQSSISGIP
SRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKR

SEQ ID NO.: 28 (линкер huOKT3 (анти-CD3) scFv)

является

GGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIG
YINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGT
PVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTGKAP
KRWIYDTSKLGAVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQWSSNPFTFGQGTKLQITR

SEQ ID NO.: 29 (линкер C825 (анти-DOTA) scFv)

является

GGGGSGGGSGGGGSHVKLQESGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLG
VIWGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNLSQAEDTAMYYCARRGSYPNYFDAWGCGT
TVTSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCSSTGAVTASNYANWVQEKPD
HCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLT
VLG

Биспецифические антитела

Биспецифические антитела широко известны и используются в данной области техники. Биспецифические антитела представляют собой искусственные белки, включающие фрагменты из двух или большего числа различных антител и, поэтому, они связываются с двумя или большим числом различных типов антигенов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифические антитела включают две различных тяжелых и две различных легких цепи.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифический антителный агент, например, биспецифическое антитело, имеет две специфичности, одной из которых является связывание с B7H3, а другой из которых является связывание CD3 на Т-клетках или с DOTA.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанная в настоящем документе легкая цепь иммуноглобулина слита с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 (описанных ниже). SEQ ID NO: 30 включает последовательность линкерного пептида и пептидную последовательность scFv, связывающего huOKT3 (анти-CD3), который является частью комплекса Т-

клеточного рецептора. Аналогично, SEQ ID NO: 31 включает последовательность линкерного пептида и пептидную последовательность scFv-фрагмента анти-DOTA антитела C825. Возникающие в результате слитые белки "легкая цепь-scFv" затем объединяются с любой из тяжелых цепей, описанных в настоящем документе.

SEQ ID NO.: 30 (линкер huOKT3 (анти-CD3) scFv)

является

GGGSGGGSGGGSGGVQLVQSGGGVQPGRLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIG
YINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGT
PVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAP
KRWIYDTSKSLASGVPSRFSGGSGGTDYFTFTISSLQFEDIATYYCQWSSNPFTEFGQGTQLQITR

SEQ ID NO.: 31 (линкер C825 (анти -DOTA) scFv)

является

GGGSGGGSGGGSGGSHVKLQESGPGVLQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLG
VIWGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDEAMYYCARRGSYPNYFDWGCCT
TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSAVVIQESALTPPGETVTLTCSSTGAVTASNYANWVQEKPD
HCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLT
VLG

Слияние легких цепей иммуноглобулина с SEQ ID NO: 30 или с SEQ ID NO: 31 и последующее объединение с тяжелой цепью иммуноглобулина создает биспецифические антитела, связывающихся с различными типами антигенов. Понятно, что создание слитых антител является стандартным в данной области и обычно проводится с использованием широко известных и используемых молекулярно-биологических методов. Биспецифические антитела могут быть использованы, например, для связывания опухолевых клеток и иммунных клеток друг с другом (один из связываемых антигенов находится на опухолевой клетке, а другой антиген находится на иммунной клетке).

Конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления антительный агент, описанный в настоящем документе, связан с полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, полезная нагрузка представляет собой или включает терапевтический агент; в некоторых вариантах осуществления, полезная нагрузка представляет собой или включает детектируемый агент.

Терапевтические агенты

Терапевтические агенты могут представлять собой или включать любой класс химических соединений, включая, например, но не ограничиваясь этим, белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные органические соединения, небополимеры, металлы, ионы, радиоизотопы, и т.д. В некоторых вариантах осуществления терапевтические агенты для использования в соответствии с настоящим изобретением могут иметь биологическую активность, имеющую отношение к лечению одного или нескольких симптомов или причин рака. В некоторых вариантах осуществления терапевтические агенты для использования в соответствии с настоящим изобретением могут иметь биологическую активность, имеющую отношение к модуляции иммунной системы и/или усилению Т-клеточно опосредованной цитотоксичности и/или подавлению ингибирующего эффекта В7Н3 на пролиферацию и функции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтические агенты для использования в соответствии с настоящим изобретением имеют один или несколько других видов активности.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгируемый терапевтический агент представляет собой радиоактивный изотоп, конъюгат лекарственного средства, наночастицу, иммунотоксин или любую другую терапевтическую полезную нагрузку.

Детектируемые агенты

Детектируемый агент включает любой фрагмент, который может быть обнаружен с использованием метода анализа, например, благодаря своим специфическим функциональным свойствам и/или химическим характеристикам. Не ограничивающие примеры таких агентов включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, люминесцентные молекулы, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы или лиганды, такие как биотин.

Многие детектируемые агенты известны в данной области техники, как и системы для их прикрепления к антителам (см., например, патенты США №№ 5021236, 4938948 и 4472509, каждый из которых включен в данное описание путем ссылки).

Примеры таких детектируемых агентов включают, среди прочего, парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы, ЯМР-детектируемые вещества, рентгеновские визуализирующие агенты.

Например, в некоторых вариантах осуществления парамагнитный ион представляет собой один или несколько из хрома (III), марганца (II), железа (III), железа (II), кобальта (II), никеля (II), меди (II), не-

одима (III), самария (III), иттербия (III), гадолиния (III), ванадия (II), тербия (III), диспрозия (III), гольмия (III), эрбия (III), лантана (III), золота (III), свинца (II) и/или висмута (III).

Радиоактивный изотоп может представлять собой один или несколько из актиния-225, астатина-211, висмута-212, углерода-14, хрома-51, хлора-36, кобальта-57, кобальта-58, меди-67, европия-152, галлия-67, водорода-3, йода-123, йода-124, йода-125, йода-131, индия-111, железа-59, свинца-212, лютеция-177, фосфора-32, радия-223, радия-224, рения-186, рения-188, селена-75, серы-35, технеция-99m, тория-227, иттрия-90 и циркония-89. Радиоактивно меченные антителы могут быть получены в соответствии с хорошо известными технологиями в данной области техники. Например, моноклональные антитела могут быть йодированы путем контакта с йодидом натрия и/или калия и химическим окисляющим агентом, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окисляющим агентом, таким как лактопероксидаза. Предложенные антителы могут быть помечены технецием-99m с помощью процесса обмена лигандов, например, путем восстановления пертехната раствором олова, хелатирования восстановленного технеция на колонке с Сефадексом и нанесения антитела на эту колонку. В некоторых вариантах осуществления предложенные антителы помечены с использованием методов прямого мечения, например, путем инкубирования пертехната, восстанавливающего агента, такого как SNCl_2 , буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия, и антитела. Промежуточными функциональными группами, которые часто используются для связывания радиоизотопов, которые существуют в виде ионов металлов с антителом, являются диэтиленetriаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), или 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA) или п-аминобензил-DOTA (DOTA-Bn). Радиоактивные изотопы могут быть обнаружены, например, с помощью дозиметрии.

Флуоресцентная метка может представлять собой или может включать, среди других, один или несколько из 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, флуоресцеина изотиоцианата, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, родамина зеленого, родамина красного, ренографина, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамина и/или Texas Red.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгируемый детектируемый агент представляет собой диагностический или визуализирующий агент. Получение конъюгатов

В данной области известны несколько технологий для соединения или конъюгации антителного агента с терапевтическим или детектируемым агентом. Некоторые технологии присоединения включают использование металл-хелатного комплекса, например, включающего органический хелатирующий агент, такой как ангидрид диэтиленetriаминопентауксусной кислоты (DTPA), этиленetriаминтетрауксусная кислота, N-хлор-п-толуолсульфонамид, и/или тетрахлор-3а-6а-дифенилгликурин-3, присоединены к антителу (патенты США №№ 4472509 и 4938948, каждый из которых включен в настоящее описание путем ссылки). Предложенные антителы также могут взаимодействовать с ферментом в присутствии связывающего агента, такого как глутаровый альдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцентными маркерами, например, получают в присутствии этих связывающих агентов или путем реакции с изотиоцианатом.

Идентификация и/или характеристика полезных анти-V7H3 антителных агентов

Настоящее изобретение предлагает первое доказательство того, что антителы, включающие антителы 8H9, направленные на FG-петлю V7H3, могут быть использованы для того, чтобы блокировать функцию иммуноторможения V7H3. Таким образом, настоящее изобретение демонстрирует целесообразность идентификации и/или характеристики антителных агентов с такой активностью. Настоящее изобретение также предлагает различные системы для выполнения такой идентификации и/или характеристики. В некоторых вариантах осуществления, например, связывание оценивается напрямую. В некоторых вариантах осуществления оценивается действие на пролиферацию, активацию и/или функцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления оценивается иммуномодуляция. В некоторых вариантах осуществления оценивается ингибирование и/или блокада прохождения иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления оценивается гибель опухолевых клеток, направленное действие на опухолевые клетки и/или уничтожение эффекторными клетками. В некоторых вариантах осуществления оценивается конкуренция с антителом 8H9, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления оценивается терапевтическая эффективность по сравнению с антителом 8H9, описанным в настоящем документе.

Композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей антителный агент, scFv, или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в данном изобретении, могут быть предоставлены в стерильной инъекционной форме (например, форме, которая пригодна для подкожных инъекций или внутривенных инфузий). Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представлены в жидкой лекарственной форме, пригодной для инъекций. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представлены в виде порошков (например, лиофилизиро-

ванных и/или стерилизованных), необязательно в вакууме, которые восстанавливаются водным растворителем (например, водой, буфером, соевым раствором и т.п.) перед инъекцией. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции разбавляют и/или восстанавливают в воде, растворе хлорида натрия, растворе ацетата натрия, растворе бензилового спирта, фосфатно-буферном соевом растворе и т.п. В некоторых вариантах осуществления порошок следует осторожно смешивать с водным растворителем (например, не встряхивать).

Фармацевтические композиции, предусмотренные как часть настоящего изобретения, не ограничиваются фармацевтическими композициями, которые являются инъекционными, но включают все виды фармацевтических композиций, широко известных и используемых в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат один или несколько консервантов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции не содержат консерванта. Вспомогательные вещества в контексте настоящего изобретения могут представлять собой или содержать растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, дисперсии или суспензионные вспомогательные средства, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и т.п., которые подходят для конкретной желательной лекарственной формы. В справочнике Ремингтона *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) раскрыты различные вспомогательные вещества, используемые в приготовлении фармацевтических композиций, и известные способы их получения. За исключением случаев, когда какая-либо обычная вспомогательная среда несовместима с веществом или его производным, например, вследствие возникновения какого-либо нежелательного биологического эффекта или иного отрицательного взаимодействия с любым другим компонентом (другими компонентами) фармацевтической композиции, ее применение предусмотрено в пределах объема настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предложены в форме, которая может быть охлаждена и/или заморожена. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предложены в форме, которая не может быть охлаждена и/или заморожена. В некоторых вариантах осуществления восстановленные растворы и/или жидкие лекарственные формы могут храниться в течение определенного периода времени после восстановления (например, в течение 2 часов, 12 часов, 24 часов, 2 дней, 5 дней, 7 дней, 10 дней, 2 недель, месяца, двух месяцев или большего времени).

Жидкие лекарственные формы и/или восстановленные растворы могут содержать твердые частицы и/или быть обесцвеченными до введения. В некоторых вариантах осуществления раствор не следует использовать, если он является обесцвеченным или мутным, и/или если твердые частицы остаются после фильтрации.

Составы фармацевтических композиций, описанные в данном документе, могут быть получены любым способом, известным или в дальнейшем разработанным в области фармакологии. В некоторых вариантах осуществления такие способы получения включают стадию ассоциации действующего ингредиента с одним или несколькими вспомогательными веществами и/или одним или несколькими другими дополнительными ингредиентами, а затем, если это необходимо и/или желательно, формование и/или упаковку продукта в желаемый одно- или многодозовый контейнер.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена, упакована и/или продана навалом, в виде стандартной дозы и/или в виде множества отдельных стандартных доз. Используемый в описании термин "стандартная доза" представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заданное количество действующего ингредиента. Количество действующего ингредиента, как правило, равно дозе, которая будет вводиться субъекту, и/или целесообразной доле полной дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

Относительное количество действующего ингредиента, фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества и/или каких-либо дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может изменяться в зависимости от личности, размера и/или состояния субъекта, подвергаемого лечению, и/или в зависимости от способа, с помощью которого композиция должна быть введена. В качестве примера, композиция может содержать от 0,1% до 100% (вес/вес) действующего ингредиента.

Варианты применения

Лечение рака и снятие иммуносупрессии

Настоящее изобретение также относится к способам лечения рака путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антительного агента, scFv или гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Может ли введение антительного агента способствовать лечению рака, может быть определено с помощью известных методик, включая те, которые описаны в данном документе в примерах.

Настоящее изобретение также относится к способам модулирования иммунной системы и/или усиления Т-клеточно опосредованной цитотоксичности и/или подавления ингибирующего эффекта B7H3 на

пролиферацию и функции Т-клеток у пациента путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антительного агента, scFv или гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Может ли введение антительного агента модулировать иммунную систему и/или усиливать Т-клеточно опосредованную цитотоксичность, может быть определено с помощью известных методик, включая те, которые описаны в данном документе в примерах.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам модулирования иммунной системы и/или усиления NK-клеточно опосредованных функций и/или подавления ингибирующего эффекта B7H3 на активность и/или функции NK-клеток у субъекта, например, путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антительного агента, scFv или гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Может ли введение антительного агента модулировать иммунную систему и/или усиливать активность и/или функции естественных киллеров, может быть определено с помощью известных методик, включая те, которые описаны в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, точное количество вводимого препарата может изменяться от субъекта к субъекту в зависимости от одного или нескольких факторов, которые хорошо известны в области медицины. Такие факторы могут включать, например, один или несколько из: биологического вида, возраста, общего состояния субъекта, тяжести инфекции, конкретной композиции, способа ее введения, вида действия, подлежащего лечению расстройства и тяжести заболевания; активности конкретного используемого антительного агента; конкретной вводимой фармацевтической композиции; периода полураспада композиции после введения; возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола и диеты субъекта; времени введения, пути введения и скорости экскреции конкретного используемого соединения; продолжительности лечения; препаратов, используемых в комбинации или совместно с конкретным используемым соединением, и т.п. Фармацевтические композиции могут быть изготовлены в виде стандартной дозированной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование композиций по настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом с медицинской точки зрения.

В некоторых вариантах осуществления точное количество вводимого препарата может представлять собой такое количество антительного агента, описанного в настоящем документе, которое позволяет достичь одного или нескольких модулирующих эффектов, описанных в настоящем документе, которые, по меньшей мере в некоторых вариантах осуществления включают модулирование вызываемых B7H3 подавления, ингибирования или блокады активности и/или функции Т-клеток и/или NK-клеток.

Антительные агенты по настоящему изобретению и их фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с любым подходящим способом и схемой лечения. В некоторых вариантах осуществления способом или схемой являются те, которые коррелируют с положительным терапевтическим эффектом. В некоторых вариантах способом или схемой являются те, которые были одобрены FDA и/или ЕР.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены любым путем, как будет понятно специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят перорально (PO), внутривенно (IV), внутримышечно (IM), внутриартериально, интрамедуллярно, интратекально, подкожно (SQ), интравентрикулярно, трансдермально, интердермально, внутрикожно, ректально (PR), вагинально, внутрибрюшинно (IP), внутрижелудочно (IG), местно (например, с использованием порошков, мазей, кремов, гелей, лосьонов и/или капель), через слизистую оболочку, интраназально, трансбуккально, энтерально, витреально, сублингвально; с помощью интратрахеальной инстилляцией, бронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией; в виде перорального спрея, назального спрея и/или аэрозоля, и/или через катетер в воротной вене.

В некоторых вариантах осуществления антительные агенты по настоящему изобретению и/или их фармацевтические композиции могут быть введены внутривенно, например, с помощью внутривенной инфузии. В конкретных вариантах осуществления антительные агенты по настоящему изобретению и/или их фармацевтические композиции могут быть введены с помощью внутримышечной инъекции. В конкретных вариантах осуществления антительные агенты по настоящему изобретению и/или их фармацевтические композиции могут быть введены с помощью подкожной инъекции. В конкретных вариантах осуществления антительные агенты по настоящему изобретению и/или их фармацевтические композиции могут быть введены с помощью катетера в воротной вене. Однако настоящее изобретение охватывает доставку антительных агентов по настоящему изобретению и/или их фармацевтических композиций любым подходящим способом с учетом вероятных достижений в области доставки лекарственных средств.

В некоторых вариантах осуществления антительные агенты по настоящему изобретению и/или их фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для доставки от примерно 0,001 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до примерно 25 мг/кг массы тела субъекта в сутки, чтобы получить желаемый терапевтический эффект. Же-

лаемая доза может вводиться более трех раз в день, три раза в день, два раза в день, один раз в день, через день, каждый третий день, каждую неделю, каждые две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, каждые два месяца, каждые шесть месяцев или каждые двенадцать месяцев.

Комбинированная терапия

Средним специалистам в данной области будет понятно, что антительные агенты по настоящему изобретению и/или их фармацевтические композиции могут быть использованы в комбинированной терапии.

Конкретное сочетание методов лечения (например, терапевтических средств или процедур), используемое в комбинированной схеме, будет учитывать совместимость желаемых терапевтических средств и/или процедур и желаемого терапевтического эффекта, который будет достигаться. Следует также учитывать, что фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинированной терапии (например, в комбинированной терапии антителами), то есть фармацевтические композиции могут вводиться одновременно с, до или после одного или нескольких других желательных терапевтических процедур.

Терапевтически эффективные количества антительных агентов по настоящему изобретению могут быть объединены (в предложенной фармацевтической композиции) с по меньшей мере одним другим действующим ингредиентом. В некоторых вариантах осуществления другой действующий ингредиент представляет собой противораковое средство, моноклональное антитело, поликлональное антитело, ингибиторы РНК-полимеразы, ингибиторы протеаз, ингибиторы геликаз, иммуномодуляторы, антисмысловые соединения, короткие интерферирующие РНК, короткие шпилечные РНК, микро-РНК, РНК-аптамеры, рибозимы и их комбинации. Для конкретного сочетания терапевтических методов, используемых в комбинированной схеме, как правило, учитывают совместимость желаемых терапевтических средств и/или процедур и желаемого терапевтического эффекта, который будет достигаться. Следует также иметь в виду, что используемые методы лечения могут обеспечивать желаемый эффект в отношении одного заболевания, или они могут обеспечивать разные эффекты.

Следует понимать, что используемые методы лечения могут обеспечивать желаемый эффект в отношении одной цели, или они могут обеспечивать разные эффекты (например, контролировать какие-либо побочные эффекты). Изобретение включает доставку фармацевтических композиций в комбинации с агентами, которые могут улучшить их биологическую доступность, уменьшить и/или изменять их метаболизм, тормозить их выведение и/или изменять их распределение в организме.

В некоторых вариантах осуществления агенты, используемые в комбинации, будут использоваться на уровне, который не превышает уровень, на котором они используются в индивидуальном порядке. В некоторых вариантах осуществления уровни, используемые в комбинации, будут ниже, чем те, которые используются при индивидуальном применении.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия может включать введение множества антительных агентов, направленных на один эпитоп (например, на один конформационный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия может включать множество антительных агентов, которые распознают различные эпитопы, например, чтобы одновременно вмешиваться в несколько механизмов в процессе онкогенеза.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая перестановка или комбинация антительных агентов по настоящему изобретению может быть объединена с любым другим антительным агентом, чтобы получить композиции и/или комбинированные терапевтические схемы, включающие множество различных антительных агентов.

Нуклеиновые кислоты

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам (которые включают ДНК и РНК, например), которые кодируют антительный агент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, комплементарным нуклеиновым кислотам, которые кодируют антительный агент, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые гибридизуются с нуклеиновыми кислотами, кодирующими антительный агент. Такие нуклеиновые кислоты могут быть использованы, например, в качестве праймеров или в качестве зондов. В качестве лишь нескольких примеров, такие нуклеиновые кислоты могут быть использованы в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР), в качестве зондов для гибридизации (включая гибридизацию *in situ*) и/или в качестве праймеров для реакции обратной транскрипции-ПЦР (RT-PCR).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК или РНК, и могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут включать один или несколько неприродных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты включают только природные нуклеотиды.

Создание и манипуляции с нуклеиновыми кислотами, кодирующими антительные агенты, в частности, антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты, известны в данной области и описаны, например, но

не ограничиваются этим, в Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, могут быть клонированы в любые из многих экспрессирующих векторов и систем, известных в данной области, а затем трансфицированы в клетки, выбранные для экспрессии нуклеиновой кислоты в тканевой культуре, с использованием технологий, широко известных в данной области. Не ограничивающими примерами клеток в пределах объема настоящего изобретения для этих целей являются клетки иммунной системы в целом и, в частности, Т-клетки и другие антиген-представляющие клетки. См., например, Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение, но их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Все патентные и непатентные ссылки, приведенные в настоящем описании, включены в настоящее описание путем ссылки во всей полноте.

Примеры

Результаты.

Кристаллизация ch8H9.

Кристаллическая структура Fab-фрагмента ch8H9 была определена методом молекулярного замещения с использованием PDB-данных (3D85) и уточнена до разрешения 2,5 Å. Статистика сбора и уточнения данных приведена в табл. 2 (статистические данные для оболочки с самым высоким разрешением приведены в скобках). Окончательная модель была депонирована в Protein Data Bank (код доступа 5CMA).

Структура ch8H9 Fab, имеющая иммуноглобулиновые домены, общие для всех структур Fab, а также шесть петель CDR (H1, H2, H3, L1, L2 и L3), которые формируют сайт распознавания антигена, имели четко определенные электронные плотности (см. фиг. 1). Электростатический потенциал поверхности антигенсвязывающего участка был рассчитан с использованием DelPhi (фиг. 1C; Rocchia, W. et al., 2002, *J. Comput. Chem.* 23:128-137). Центр участка связывания имеет большую площадь положительно заряженной поверхности, где преобладают петли L3 и H3. Два кармана отрицательно заряженной поверхности (в области петель H2 и L1) обрамляют центральную область, указывая, что антиген, узнаваемый 8H9, имеет смешанное распределение поверхностного заряда.

Таблица 2

Длина волны (Å)	0,9795
Диапазон разрешения (Å)	29–2,495 (2,584–2,495)
Пространственная группа	C 2 2 2 ₁
Элементарная ячейка (Å)	64,576, 207,422, 85,491
Элементарная ячейка (°)	90, 90, 90
Уникальные отражения	20043 (1957)
Завершенность (%)	98,03 (97,12)
Среднее I/сигма (I)	10,18 (2,30)
В-фактор Вильсона	55,01
R-фактор	0,2080 (0,3037)
Свободный R-фактор	0,2606 (0,3421)
Число неводородных атомов	3303
макромолекулы	3254
вода	49
Белковые остатки	426
RMS (связи)	0,003
RMS (углы)	0,87
Рамачандран разрешенные (%)	94,0
Рамачандран напряженные (%)	4,6
Рамачандран запрещенные (%)	1,4
Средний В-фактор	69,70
макромолекулы	69,90
растворитель	58,50

Гуманизация m8H9.

CDR тяжелой и легкой цепей m8H9 были пересажены в каркас IgG1 на основе их гомологии с последовательностями зародышевой линии человека IGHV1-46 для тяжелой цепи и IGKV-7 для легкой цепи. Были созданы две версии (H1 и H2) гуманизированной тяжелой цепи, с H1, содержащей больше матричных последовательностей человека. Также были созданы две версии, L1 (SEQ ID NO: 2) и L2 (SEQ ID NO: 3), гуманизированной легкой цепи, с L1, содержащей больше матричных последовательностей человека. Затем четыре версии гуманизированного антитела 8H9 IgG1 были клонированы, проэкспрессированы и очищены (H1L1 [SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 2], H1L2 [SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3], H2L1 [SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 2] и H2L2 [SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 3]), наряду с химерным (ch) 8H9 IgG1.

На фиг. 3 и в табл. 3 ниже показаны связывающие свойства m8H9 и ch8H9 в отношении B7H3, определенные с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Оба антитела имели очень схожие кинетики связывания (K_D 0,28 нМ и 0,74 нМ, соответственно).

На фиг. 4 и табл. 4 ниже показаны связывающие свойства четырех гуманизированных 8H9 (hu8H9) IgG1. Вариант H1L1 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 2), который содержит наибольший процент последовательностей человека, связывался с B7H3 слабее (K_D 112 нМ), чем три других варианта, которые однако также имели только субоптимальную связывающую способность (K_D 34,8-38,6 нМ).

Таблица 3

Кинетика связывания m8H9 и ch8H9 с 2Ig-B7H3-mFc, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Конструкция	K_{on} ($c^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
m8H9	$3,674 \times 10^4$	$1,033 \times 10^{-5}$	0,28
ch8H9	$4,738 \times 10^4$	$3,506 \times 10^{-5}$	0,74

Таблица 4

Кинетика связывания вариантов hu8H9 с 4Ig-B7H3, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Антитело	4Ig-B7H3		
	k_{on}	k_{off}	K_D (нМ)
hu8H9-H1L1 IgG1	$2,61 \times 10^4$	$1,86 \times 10^{-3}$	111,8
hu8H9-H1L2 IgG1	$3,64 \times 10^4$	$1,27 \times 10^{-3}$	34,8
hu8H9-H2L1 IgG1	$4,08 \times 10^4$	$1,35 \times 10^{-3}$	34,8
hu8H9-H2L2 IgG1	$4,40 \times 10^4$	$1,66 \times 10^{-3}$	38,6

Для улучшения связывания hu8H9 с B7H3 была создана и смоделирована структурная модель m8H9 с использованием силовых полей CHARMM. Был проведен мутагенез *in silico* с целью анализа влияния каждой возможной гуманизирующей мутации. В табл. 5 ниже показаны 6 мутаций (в легкой цепи: S20T, S69T, L106I; в тяжелой цепи: V12K, R40A, E42G) в каркасной области, которые привели бы к дестабилизации структуры, присущей m8H9. Возвратные мутации для этих 6 мутаций (в легкой цепи: T20S, T69S, I106L, в тяжелой цепи: K12V, A40R, G42E) были введены в hu8H9 H1L2, что дало hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4). Мутации были проведены исходя из энергетических расчетов *in silico*, что является нестандартным способом гуманизации и оптимизации антител. Стандартный способ гуманизации антител включает пересадку CDR и проведение возвратных мутаций, исходя из гомологии последовательностей и близости к остаткам CDR. Конструкции H1L1, H1L2, H2L1 и H2L2 были созданы стандартными способами пересадки CDR.

Таблица 5

In silico мутационный анализ модели гомологии m8H9, использованный для создания hu8H9 H3L3

		Взвешенная	
Остаток в мышиной последовательности	Мутация	энергия	Эффект
		мутации	
		(ккал/моль)	
LC: Ser20	Thr	+1,181	Дестабилизирующий
LC: Ser69	Thr	+0,759	Дестабилизирующий
LC: Leu106	Ile	+2,078	Дестабилизирующий
HC: Val12	Lys	+5,563	Дестабилизирующий
HC: Arg40	Ala	+1,170	Дестабилизирующий
HC: Glu42	Gly	+0,695	Дестабилизирующий

После создания hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4) на основе гомологичного моделирования, кристаллическая структура фрагмента ch8H9 Fab была решена с разрешением 2,5 Å. В попытке повысить в hu8H9 H3L3 содержание аминокислот из последовательностей человека, кристаллическую структуру фрагмента ch8H9 Fab моделировали с силовыми полями CHARMM и еще раз проводили мутагенез *in silico*, чтобы проанализировать последствия каждой возможной гуманизирующей мутации. В таблицах 6 и 7 ниже представлены 7 мутаций в легкой цепи (S20T, E42Q, S43A, N76S, V78L, E79Q, V83F) и 5 мутаций в тяжелой цепи (L20V, K67R, A68V, L70M и A79V) которые были предсказаны для стабилизации структуры 8H9. Эти 12 гуманизирующих мутаций были включены в hu8H9 H3L3, что дало hu8H9 4.1 (SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6).

Таблица 6

<i>In silico</i> мутационный анализ кристаллической структуры ch8H9, используемый для создания легкой цепи hu8H9 4.1			
Аминокислота в последовательностях ch8H9 и H3L3 LC	Аминокислота в последовательности человека	Положение	Мутационная энергия (ккал/моль)
S20	T	поверхностное	-0,5
E42	Q	поверхностное	-1,1
S43	A	V _H /V _L	-4,5
N76	S	поверхностное	-4,5
V78	L	внутреннее	-2,8
E79	Q	поверхностное	-3,8
V83	F	поверхностное	-2,5

Таблица 7

<i>In silico</i> мутационный анализ кристаллической структуры ch8H9, использованный для создания тяжелой цепи hu8H9 4.1		
Аминокислота в последовательностях ch8H9 и H3L3 HC	Аминокислота в последовательности человека	Мутационная энергия (ккал/моль)
L20	V	-0,1
K67	R	-2,8
A68	V	-1,2
L70	M	-1,0
A79	V	-1,7

Созревание аффинности с помощью дрожжевого дисплея

Конструкция биотинилированного B7H3 была использована для помощи в отборе особенно предпочтительных аффинно-зрелых гуманизированных антител 8H9. При таком подходе, 4Ig-B7H3, слитый с Fc мыши, экспрессировали в клетках DG44 CHO. Для биотинилирования использовали NHS-активированный биотин, который эффективно реагирует с первичными аминогруппами (-NH₂) в боковой цепи остатков лизина (K) и на N-конце полипептидов. Избыток непрореагировавшего биотина удаляли с помощью вытеснительной хроматографии с использованием ультрафильтрующих колонок. Успешное биотинилирование антигена B7H3-mFc было подтверждено путем окрашивания HRP-конъюгированным стрептавидином в ELISA (фиг. 5A). Обнаружение биотинилированного B7H3-Fc с помощью химерного антитела мышь/человек 8H9-IgG подтвердил, что биотиновая группа не препятствовала специфическому связыванию антитела 8H9 с B7H3-FC (фиг. 5B).

Для повышения аффинности гуманизированного hu8H9 H3L3, оно было преобразовано в scFv и подвергнуто случайному мутагенезу с помощью вносящей ошибки ПЦР. Ранее авторы успешно использовали дрожжевой дисплей для дальнейшего созревания антител, поскольку он дает возможность тонкой дискриминации между мутантами с помощью проточной цитометрии. Таким образом, библиотека мутантов была представлена на дрожжевых клетках путем гомологичной рекомбинации с вектором, содержащий тег с-Мус. Была создана дрожжевая библиотека мутантов относительно большого размера (до 10⁸) и подвергнута сначала предварительному отбору на магнитных шариках, конъюгированных с биотинилированным B7H3-mFc, позволяющему устранение дрожжевых клеток, которые не экспрессируют антитела или слабо связываются с антигеном. Мутантная библиотека была затем отсортирована несколько раз с помощью FACS, чтобы отобрать scFv, связывающиеся с B7H3 в жестких условиях (фиг. 6). От-

сортированные варианты scFv были дополнительно мутированы с помощью ошибочной ПЦР по всему гену, чтобы получить новую подбиблиотеку. Процесс сортировки и мутагенеза затем циклически повторяли. Клоны, наиболее сильно связывающие B7H3, были получены из заключительного этапа созревания (фиг. 6). Дрожжи, полученные из последнего (7-го) раунда сортировки, показали значительно более сильное связывание, чем дрожжи, представляющие родительское hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4) (фиг. 7), когда они были окрашены антигеном B7H3-mFc. Эти результаты показали, что обогащенные дрожжевые мутанты значительно увеличили аффинность связывания по сравнению с немутированным родителем. Были идентифицированы наиболее высокоаффинные клоны из заключительного раунда созревания. Данные о последовательностях сильных связывающих элементов были сгруппированы с помощью кластерного анализа. Следующие варианты scFv были отобраны многократно: S7.2 (SEQ ID NO: 19), S7.17 (SEQ ID NO: 20), S7.22 (SEQ ID NO: 21), S7.28 (SEQ ID NO: 22) и S7.29 (SEQ ID NO: 23) (фиг. 8). Связывающие свойства отобранных мутантов scFv В ELISA отобранные в FACS варианты scFv проявляли лучшее связывание с любой формой 4Ig или 2Ig для B7H3, чем наблюдаемое с родительским hu8H9 H3L3 или с S3.3 (Sort3) (фиг. 9). Связывание различных вариантов 8H9 с покрытыми антигеном 4Ig-B7H3 чипами CM5 сравнивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore T-100. Полученные значения K_D для всех выбранных вариантов, включая hu8H9 H3L3 и S3.3, приведены в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Biacore-анализ связывания рекомбинантно экспрессированных scFv с 4IgB7H3			
Конструкция scFv	K_{on} ($c^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
hu8H9 H3L3	$6,379 \times 10^3$	$9,185 \times 10^{-4}$	144,0
S3.3	$2,481 \times 10^4$	$2,443 \times 10^{-4}$	9,85
S7.2	$2,543 \times 10^4$	$1,432 \times 10^{-4}$	5,6
S7.17	$5,097 \times 10^4$	$1,134 \times 10^{-4}$	2,2
S7.22	$8,614 \times 10^4$	$9,989 \times 10^{-5}$	1,2
S7.28	$4,751 \times 10^3$	$1,318 \times 10^{-3}$	277,4
S7.29	$5,593 \times 10^4$	$1,519 \times 10^{-4}$	2,7

Варианты scFv после седьмой сортировки связывались с антигеном с константой диссоциации (K_D) около 6 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 277 нМ и 3 нМ, по сравнению с константами диссоциации (K_D) 144 нМ и 10 нМ, наблюдаемыми для родительского hu8H9 H3L3 и S3.3, соответственно. Среди вариантов scFv после седьмой сортировки, scFv S7.17, S7.22 и S7.29 проявляли самую высокую аффинность связывания, достигая более чем 50-кратного повышения аффинности. scFv S7.22 (SEQ ID NO: 21), в частности, давало более чем 100-кратное улучшение связывания по сравнению с родительским scFv, hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 17).

Иммуноокрашивание опухолевых клеток с помощью аффиннозрелых вариантов scFv

Авторы сравнили связывание вариантов scFv, hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 17), S3.3 (SEQ ID NO: 18) и S7.22 (SEQ ID NO: 21) с клетками нейробластомы M14 (фиг. 10). Авторы обнаружили, что scFv S7.22 показал лучшее связывание, чем варианты scFv, hu8H9 и S3.3.

Определение ключевых мутаций, улучшающих аффинность

В табл. 9 ниже перечислены шесть мутаций, идентифицированных в последовательностях, отсортированных после аффинного созревания (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G, HC: G56D, HC: A102G). Четыре мутации (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G) были получены после третьего раунда сортировки (клон S3.3 [SEQ ID NO: 18]) и впоследствии присутствовали в большинстве клонов из седьмого раунда сортировки.

Таблица 9

Мутации, идентифицированные после созревания аффинности с использованием дрожжевого дисплея	
Мутация	Расположение
LC: S20T	Каркасная область
LC: H34Y	CDR L1
HC: A24T	Каркасная область
HC: E42G	Каркасная область
HC: G56D	CDR H2
HC: A102G	CDR H3

Клон S7.22 с максимальной аффинностью имеет две дополнительные мутации (НС: G56D, НС: A102G). Три из выявленных мутаций находятся непосредственно в CDR-области (LC: H34Y, НС: G56D, НС: A102G). Две мутации (LC: S20T, НС: E42G) имеют такую же последовательность, что и последовательность зародышевой линии человека, используемая для гуманизации.

Варианты с усиленной аффинностью и гуманизированные варианты

Шесть мутаций аффинного созревания (LC: S20T, LC: H34Y, НС: A24T, НС: E42G, НС: G56D, НС: A102G) были включены в последовательность hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4) для создания hu8H9 3.1 scFv- (SEQ ID NO: 24) и IgG1-вариантов. Последовательность hu8H9 4.1 (SEQ ID NO: 25) уже содержит одну из мутаций, выявленных при аффинном созревании (LC: S20T), и пять дополнительных мутаций (LC: H34Y, НС: A24T, НС: E42G, НС: G56D, НС: A102G) были включены, чтобы создать hu8H9 5.1 scFv- (SEQ ID NO: 26) и IgG1-варианты.

Кинетика связывания hu8H9 H3L3 (SEQ ID NO: 17), 3.1 (SEQ ID NO: 24), 4.1 (SEQ ID NO: 25) и 5.1 (SEQ ID NO: 26) scFv-вариантов представлена в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Biacore анализ scFv-конструкций hu8H9 H3L3, 3.1, 4.1 и 5.1			
scFv-конструкция	K_{on} ($c^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
hu8H9 H3L3	$6,379 \times 10^3$	$9,185 \times 10^{-4}$	144,0
hu8H9 3.1	$1,035 \times 10^5$	$9,525 \times 10^{-5}$	0,92
hu8H9 4.1	$1,217 \times 10^4$	$5,565 \times 10^{-4}$	45,7
hu8H9 5.1	$5,878 \times 10^4$	$9,841 \times 10^{-5}$	1,7

Как можно наблюдать, добавление усиливающих аффинность мутаций приводило к существенному увеличению аффинности связывания (K_D 0,9 нМ для hu8H9 3.1 и K_D 1,7 нМ для hu8H9 5.1), по сравнению с аффинностью связывания аффинно незрелых последовательностей.

Кинетика связывания IgG1-антител ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1), H1L2 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3), H3L3 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4), 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) и 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) с 4Ig-B7H3-Fc представлена на фиг. 11 и в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Кинетика связывания IgG ch8H9 и hu8H9 H1L2, H3L3, 3.1 и 5.1 с 4Ig-B7H3, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса			
Конструкция	K_{on} ($c^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
ch8H9	$4,481 \times 10^4$	$5,491 \times 10^{-5}$	1,2
hu8H9 H1L2	$5,596 \times 10^5$	$2,394 \times 10^{-2}$	42,7
hu8H9 H3L3	$6,827 \times 10^6$	$4,519 \times 10^{-2}$	6,6
hu8H9 3.1	$5,559 \times 10^4$	$1,136 \times 10^{-4}$	2,0
hu8H9 5.1	$5,918 \times 10^4$	$7,081 \times 10^{-5}$	1,3

Гуманизированный вариант H1L2 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3), который был разработан с использованием стандартных технологий пересадки CDR, имеет значительно более слабое связывание, чем ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1) (K_D 42,7 нМ для hu8H9 H1L2 и K_D 1,2 нМ для ch8H9). Описанный в настоящем документе новый способ численного моделирования, основанный на расчетах энергии и моделировании молекулярной динамики, был использован по настоящему изобретению для создания hu8H9 H3L3, что приводило к существенному улучшению сродства (6,6 нМ). Включение повышающих аффинность мутаций привело к дальнейшему улучшению и дало hu8H9 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) и 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) (K_D 2,0 и 1,3 нМ, соответственно), которые имеют характеристики связывания, сравнимые с ch8H9. Аналогичные улучшения наблюдались при связывании с 2Ig-B7H3-Fc (фиг. 12 и табл. 12 ниже).

Таблица 12

Кинетика связывания IgG ch8H9 и hu8H9 H1L2, H3L3, 3.1 и 5.1 с 2Ig-B7H3, определенная с помощью поверхностного плазмонного резонанса			
Конструкция	K_{on} ($c^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
ch8H9	$4,957 \times 10^4$	$3,792 \times 10^{-5}$	0,76
hu8H9 H1L2	$1,698 \times 10^4$	$1,162 \times 10^{-3}$	68,4
hu8H9 H3L3	$4,667 \times 10^6$	$3,501 \times 10^{-2}$	7,5
hu8H9 3.1	$3,871 \times 10^4$	$2,321 \times 10^{-4}$	6,0
hu8H9 5.1	$6,783 \times 10^4$	$5,588 \times 10^{-5}$	0,82

Было протестировано связывание ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1) и hu8H9 H1L2 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3), 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) и 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) с B7H3-положительными опухолевыми клетками меланомы M14, и полученные данные представлены на фиг. 13. Связывание Hu8H9 3.1 и 5.1 было сравнимо со связыванием ch8H9, и существенно сильнее, чем у hu8H9 H1L2.

Была определена кинетика связывания IgG-конструкций (m8H9, ch8H9, hu8H9 H3L3 и hu8H9 3.1) с обоими 4Ig-B7-H3 и 2Ig-B7-H3 без слияния с Fc (табл. 13). Оба антитела m8H9 и ch8H9 связывались с 2Ig-B7-H3 с более высоким сродством, чем с 4Ig-B7-H3, что указывает на то, что связываемый эпитоп может быть более полно представлен в формате 2Ig-B7-H3. Hu8H9 H3L3 IgG (K_D 33 нМ для 4Ig-B7H3 и K_D 45 нМ для 2Ig-B7-H3) имело частичную потерю аффинности по сравнению с ch8H9 (K_D 7,7 нМ для 4Ig-B7H3 и K_D 2,7 нМ для 2Ig-B7-H3). Аффинно-зрелое hu8H9 3.1 имело увеличение аффинности в 2,5-9 раз (K_D 13 нМ для 4Ig-B7H3 и K_D 5,0 нМ для 2Ig-B7-H3) по сравнению с родительским hu8H9 H3L3. Поскольку hu8H9 3.1 не имело более высокой аффинности, чем hu8H9, то 6 мутаций созревания аффинности (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G, HC: G56D, HC: A102G) были включены в ch8H9 IgG, что давало hu8H9 6.1. Кинетика связывания у hu8H9 6.1 составляла K_D 3,7 нМ для 4Ig-B7H3 и K_D 0,6 нМ для 2Ig-B7-H3, что показало увеличение связывания в 2-4 раза относительно hu8H9.

Таблица 13

Кинетика связывания IgG-конструкций с 4Ig-B7-H3 и 2Ig-B7-H3 без слияния с Fc						
Антитела	4Ig-B7-H3			2Ig-B7-H3		
	K_a (1/M*c)	k_d (1/c)	K_D (нМ)	K_a (1/M*c)	k_d (1/c)	K_D (нМ)
m8H9	$1,846 \times 10^4$	$1,650 \times 10^{-4}$	8,9	$2,776 \times 10^4$	$2,244 \times 10^{-5}$	0,81
ch8H9	$2,834 \times 10^4$	$2,180 \times 10^{-4}$	7,7	$3,210 \times 10^4$	$8,729 \times 10^{-5}$	2,7
ch8H9 6.1	$3,349 \times 10^4$	$1,229 \times 10^{-4}$	3,7	$6,890 \times 10^4$	$4,254 \times 10^{-5}$	0,62
hu8H9 H3L3	$2,046 \times 10^4$	$6,770 \times 10^{-4}$	33	$1,347 \times 10^4$	$6,069 \times 10^{-4}$	45
hu8H9 3.1	$2,342 \times 10^4$	$2,979 \times 10^{-4}$	13	$3,394 \times 10^4$	$1,711 \times 10^{-4}$	5,0

Свойства 8H9 антител уничтожать опухоли in vitro

Затем авторы протестировали in vitro опухолеподавляющие ADCC-свойства пяти IgG-конструкций антител (m8H9, ch8H9, ch8H96.1, hu8H9 H3L3 и hu8H9 3.1) с использованием опухолевых клеток нейробластомы LAN-1 в качестве мишеней и PBMC человека в качестве эффекторных клеток. Цитотоксичность измеряли с помощью высвобождения 51 хрома (фиг. 14 и табл. 14). m8H9 не имели никакой функции ADCC с PBMC человека, что и ожидалось для мышиного изотипа IgG1. Конструкции ch8H9 и hu8H9 H3L3 имели сильную ADCC (EC_{50} 1,4 и 0,7 мкг/мл, соответственно). ch8H96.1 (EC_{50} 0,1 мкг/мл) имело 14-кратное улучшение цитотоксичности по сравнению с ch8H9, и hu8H9 3.1 (EC_{50} 0,3 мкг/мл) имело 2-кратное увеличение цитотоксичности относительно hu8H9 H3L3 и 5-кратное увеличение цитотоксичности относительно ch8H9.

Таблица 14

In vitro ADCC-анализ анти-B7-H3 IgG-конструкций		
Антитела	EC_{50} (мкг/мл)	Кратность изменения EC_{50} относительно ch8H9
m8H9	Нет	
ch8H9	цитотоксичности	
ch8H9 6.1	$1,40 \pm 0,08$	14-кратное
hu8H9 H3L3	$0,70 \pm 0,03$	2-кратное
hu8H9 3.1	$0,31 \pm 0,03$	5-кратное
hu8H9 5.1	$0,16 \pm 0,02$	9-кратное

In vivo направленное действие на ксенотрансплантаты нейробластомы человека

Биораспределение in vivo конструкций антитела 8H9 (hu8H9 3.1 и ch8H9 6.1 в сравнении с m8H9 и ch8H9) было определено с использованием ксенотрансплантатов у мышей. Кратко, то все антитела были помечены 131 I, и их иммунореактивность была определена in vitro в отношении клеток LAN-1 (m8H9: 69%, ch8H9: 75%, ch8H96.1: 73% и hu8H9 3.1: 54%). Биораспределение in vivo для каждого антитела че-

рез 48 ч после инъекции анализировали с использованием мышей с подкожным ксенотрансплантатами нейробластомы LAN-1 (фиг. 15 и табл. 15 [Средн.: среднее]). Поглощение опухолью, измеряемое как процент от введенной дозы (ID) на грамм (% ID/г), составило 8,9% для m8H9, 6,1% для ch8H9, 6,8% для ch8H9 6.1 и 10,6% для hu8H9 3.1. Соотношение поглощения опухолью и нормальной тканью приведено в табл. 16 (Средн.: среднее). Все протестированные антитела имели сравнимое соотношение поглощения опухолью и неопухолевыми тканями для большинства тканей. Наибольшее поглощение опухолью наблюдалось для hu8H9 3.1, которое было статистически выше, чем для ch8H9 ($p < 0,05$), и оно имело более высокое соотношение поглощения опухолью и кровью, чем ch8H9 (1,26 по сравнению с 0,72, $p < 0,05$). Чуть меньшее поглощение опухолью наблюдалось для ch8H9 6.1, но наблюдалось сопоставимое соотношение поглощению опухолью и кровью.

Таблица 15

Биораспределение ^{131}I -меченых антител 8H9 в ксенотрансплантатах									
LAN-1 у мышей									
Число животных (N)	% ID/г								
	m8H9		ch8H9		ch8H9 6.1		hu8H9 3.1		
	5		5		4		4		
Орган	Средн.	SEM	Средн.	SEM	Средн.	SEM	Средн.	SEM	
Опухоль	8,85	0,96	6,13	0,69	6,85	1,71	10,59	1,95	
Сердце	3,36	0,24	3,01	0,21	2,05	0,33	2,25	0,45	
Легкие	3,72	0,36	3,83	0,23	3,02	0,80	3,37	0,78	
Печень	3,14	0,31	2,81	0,20	2,30	0,37	2,67	0,55	
Селезенка	1,78	0,17	1,60	0,15	1,18	0,18	1,61	0,30	
Желудок	1,64	0,23	1,09	0,11	0,89	0,09	0,95	0,07	
Тонкий кишечник	1,21	0,04	0,92	0,11	0,63	0,09	0,55	0,11	
Толстый кишечник	0,52	0,08	0,45	0,05	0,32	0,05	0,33	0,06	
Почка	2,99	0,22	2,52	0,25	1,65	0,28	1,89	0,31	
Надпочечн ик	2,76	0,36	2,49	0,41	1,86	0,46	2,82	0,68	
Кожа	3,83	0,08	3,62	0,14	2,39	0,24	2,50	0,45	
Бедренная кость	1,76	0,10	1,28	0,11	0,90	0,18	1,32	0,06	
Мышцы	1,20	0,11	0,88	0,06	1,08	0,45	0,77	0,11	
Позвоночн ик	1,47	0,07	1,15	0,07	0,98	0,09	1,01	0,15	
Головной мозг	0,29	0,03	0,22	0,02	0,15	0,02	0,18	0,03	
Хвост	2,38	0,17	1,70	0,10	1,63	0,34	1,54	0,19	
Кровь	10,38	0,49	8,70	0,50	5,77	0,79	8,21	0,63	

Таблица 16

Соотношение поглощения опухолью и неопухолевыми тканями ^{131}I -меченых антител 8Н9 у мышей с ксенотрансплантатами LAN-1								
Число животных (N)	Соотношение между опухолью и неопухолевой тканью							
	m8H9		ch8H9		ch8H9 6.1		hu8H9 3.1	
	5		5		4		4	
Орган	Средн.	SEM	Средн.	SEM	Средн.	SEM	Средн.	SEM
Опухоль	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Сердце	2,67	0,31	2,09	0,28	4,09	1,62	4,98	0,66
Легкие	2,52	0,43	1,64	0,22	2,79	0,98	3,46	0,58
Печень	2,90	0,32	2,29	0,41	3,39	1,24	4,30	0,69
Селезенка	5,18	0,74	4,03	0,67	6,96	2,75	6,67	0,54
Желудок	6,40	1,98	5,77	0,71	7,89	1,99	11,05	1,59
Тонкий кишечник	7,29	0,63	7,11	1,05	13,03	5,04	20,50	3,13
Толстый кишечник	22,37	8,90	14,50	2,23	22,75	6,29	32,86	3,47
Почка	3,02	0,38	2,64	0,54	4,53	1,49	5,64	0,47
Надпочечники	3,31	0,33	2,92	0,75	3,88	0,74	3,94	0,37
Кожа	2,31	0,24	1,73	0,26	2,92	0,76	4,42	0,55
Бедренная кость	5,04	0,48	5,12	1,06	7,96	1,63	7,96	1,31
Мышцы	7,46	0,58	7,00	0,72	8,27	2,93	15,17	3,74
Позвоночники	6,04	0,61	5,49	0,82	7,01	1,67	10,54	0,87
Головной мозг	32,65	6,03	30,60	6,62	47,54	12,77	63,35	10,18
Хвост	3,80	0,49	3,67	0,47	4,74	1,35	6,77	0,59
Кровь	0,85	0,06	0,72	0,10	1,32	0,46	1,26	0,16

Определение эпитопа

Технологии молекулярного докинга были использованы для предсказания точного молекулярного эпитопа на B7H3, ответственного за связывание с 8H9. В частности, была создана гомологичная модель 2Ig-B7H3 человека, и затем были выполнены эксперименты по докингу с кристаллической структурой ch8H9 Fab с использованием ZDOCK. На фиг. 16 показана предсказанная модель, полученная из расчетов докинга. Модель показывает, что 8H9 специфически связывает последовательность IRDF (остатки 126-129, SEQ ID NO: 32) в FG-петле из V-области 2Ig-B7H3. В 4Ig-B7H3 эта последовательность присутствует дважды (остатки 126-129 в домене V1 и остатки 344-347 в домене V2). Предсказанные энергии взаимодействия для каждого из взаимодействующих остатков из 2Ig-B7H3 в состыкованном комплексе приведены в табл. 17 ниже. Arg127 и Asp128 имеют самую высокую энергию взаимодействия (-55,2 и -46,3 ккал/моль, соответственно).

Таблица 17

Энергии взаимодействия, вычисленные из состыкованной модели 8H9:B7H3	
Остаток в 2Ig-B7H3 (SEQ ID NO.:85)	Энергия взаимодействия (ккал/моль)
Phe 123	-3,59
Val 124	-11,8
Ser 125	-14,2
Ile 126	-10,4
Arg 127	-55,2
Asp 128	-46,3
Phe 129	-1,33
Gly 130	-3,80

На основе молекулярного моделирования в 2Ig-B7H3-mFc были внесены точечные мутации R127A и D128A в виде двух отдельных конструкций, и эти конструкции были рекомбинантно проэкспрессированы. На фиг. 17 показана кинетика связывания ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1) с мутантами R127A и D128A в 2Ig-B7H3, наряду с кинетикой связывания трех коммерчески доступных анти-B7H3 MAb (M1H42 и 6A1 от Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL) и клон 185504 от R&D Systems (Minneapolis, MN)). Максимальные единицы отклика (RU) связывания с WT 2Ig-B7H3-Fc (дикого типа), а также относительное связывание с мутантами R127A и D128A, приведено в табл. 18. Для антитела ch8H9 наблюдается почти полная потеря связывания (99,9%) с мутантом R127A и частичная потеря связывания (40%) с мутантом D128A по сравнению с конструкцией антигена дикого типа. Ни для одного из трех других анти-B7H3 антител связывание по существу не терялось ни для одного из мутантных белков B7H3 (а именно, антитела M1H42 и клон 185504 сохраняли приблизительно 70-75% от своего соответствующего связывания с обоими мутантами R127A и D128A, антитело 6A1 имело в целом слабое связывание с WT 2Ig-B7H3, и либо такое же связывание с мутантом R127A или повышенное связывание с мутантом D128A). Аналогичным образом, варианты ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1), hu8H9 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) и 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) также показали общую и частичную потерю связывания (фиг. 18). Эти исследования связывания показали, что ch8H9 было однозначно специфичным к последовательности IRDF из B7H3. Потеря связывания с мутантами B7H3, R127A и D128A, для гуманизированных конструкций 8H9 также была подтверждена с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Таблица 18

Единицы отклика (RU) для связывания с WT B7-H3 и мутантами D128A и R129			
Антитело	Максимальные RU	Относительное связывание	
	WT-2Ig-B7-H3	R127A	D128A
ch8H9	2875	0,1%	60,0%
M1H42	2526	76,1%	68,8%
6A1	196,1	109,1%	167,5%
клон 185504	3344	75,5%	74,9%

Использование моноклонального антитела 8H9 для иммуномодуляции

Ранее было показано, что FG-петля IgV-домена белка B7H3 играет критическую роль в функции торможения белками Т-клеток у мышей. Мышиный B7H3 существует только в виде 2Ig-B7H3, где критической последовательностью, отвечающей за функцию торможения, является IQDF (остатки 126-129, SEQ ID NO:86).

Авторы показали, что m8H9 и клоны 3.1 и 5.1, все связываются с гомологичной последовательностью IRDF (остатки 126-129) в человеческом B7H3 (SEQ ID NO: 32), и в частности с Arg127. Кроме того, m8H9 и его гуманизированные формы не связываются с мышиным B7H3, который содержит Gln127. В отличие от других протестированных анти-B7H3 антител, только 8H9 могут быть использованы для связывания FG-петли в B7H3, что можно использовать для блокирования функции иммуноторможения белка B7H3.

На фиг. 19 приведены данные, показывающие, что клетки B7H3-положительной нейробластомы IMR-32 могут ингибировать пролиферацию Т-клеток. В этом анализе наблюдалось снижение пролиферации Т-клеток на 60% в присутствии клеток IMR-32. Химерное 8H9 подавляет это ингибирующее действие на пролиферацию Т-клеток дозозависимым образом и даже усиливает пролиферацию Т-клеток в присутствии опухолевых клеток (фиг. 20).

Также было проверено, может ли m8H9 преодолеть угнетающее действие B7H3 на функции Т-клеток. С использованием анти-Her2х-анти-CD3 биспецифического антитела (трастузумаба, слитого с huOKT3 scFv) было протестировано, может ли m8H9 усиливать Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность Her2-положительных, B7H3-положительных клеток карциномы шейки матки человека (HeLa) (фиг. 21). Было замечено, что при предварительной инкубации опухолевых клеток с 8H9 максимальная гибель увеличивается с 58% (без предварительной инкубации) до 71% (с предварительной инкубацией с 8H9).

Эти серии экспериментов являются первой демонстрацией того, что m8H9 и его производные могут быть использованы для иммунномодулирующей терапии.

Способы

Гомологичное моделирование.

Гомологичные модели варибельной области 8H9 были получены с использованием сервера моделирования антител ROSETTA и Discovery Studio 3.0 (Accelrys, San Diego, CA).

Рентгеновская кристаллография.

Fab фрагменты ch8H9 были получены расщеплением папаином с использованием стандартного на-

бора для получения Fab (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Очищенный Fab-фрагмент концентрировали до 10 мг/мл в 20 mM HEPES, pH 6,5, а затем кристаллизовали в висячей капле путем диффузии из паровой фазы при 16°C против резервуара с реагентом Hampton Index, содержащего 0,2 М моногидрат сульфата лития, 0,1 М BIS-TRIS, pH 6,5 и 25% (вес/объем) полиэтиленгликоль 3350 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA). Капелька была образована путем смешивания 1 мкл раствора белка и 1 мкл раствора резервуара. Данные были собраны на Argonne Advanced Photon Source beamline 24IDE. Структура Fab была решена путем молекулярного замещения с использованием MolRep (пакет CCP4) (McCoey, A. J., et al., 2007, J. Appl. Crystallogr. 40:658-674). Лучшая модель молекулярного замещения была уточнена с помощью Phenix (Adams, P. D. et al., 2010, Acta crystallographica Section D Biological crystallography 66:213-221), и ручная подгонка была выполнена с O (Bailey, S., 1994, Acta Crystallogr. D 50:760-763). Кристаллическая структура была решена при 2,5 Å.

Молекулярное моделирование структуры ch8H9.

Кристаллическая структура ch8H9 была смоделирована с использованием силовых полей CHARMM (CHemistry at Harvard Molecular mechanics) и влияния каждой точечной мутации, рассчитанной из разницы между свободной энергией укладки мутантного белка и белка дикого типа. Для учета влияния растворителя использовалось обобщенное борновское приближение, и все электростатические члены вычислялись как сумма кулоновских взаимодействий и полярных вкладов в энергию сольватации. Для каждой точечной мутации рассчитывалась взвешенная сумма ван-дер-ваальсовых, электростатических, энтропийных и неполярных сил. Все расчеты выполнялись с использованием Discovery Studio 3.0 (Accelrys, Сан-Диего, Калифорния). Первичные и обратные мутации проверялись на их влияние на стабильность следующего поколения hu8H9. Моделирование докинга было проведено с использованием программного обеспечения ZDOCK (доступно через Бостонский университет, Бостон, Массачусетс). Моделирование докинга было проведено с использованием ZDOCK (Chen, R. et al., 2003, Proteins 52: 80-87), а гомологичное моделирование B7H3 было выполнено с использованием MODELLER (Sanchez, R. and Sali, A., 1997, Proteins Suppl. 1: 50-58). Электростатические потенциалы поверхности были получены с использованием DelPhi (Rocchia, W. et al., 2002, J. Comput., Chem., 23, 128-137).

Биотинилирование антигена B7H3.

Ген слитого белка B7H3 человека и мышинового Fc (mFc) был оптимизирован для экспрессии в клетках CHO (Genscript, Piscataway, NJ). Используя вектор pBluescript (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), ген трансфицировали в клетки DG44 CHO и экспрессировали, как описано ранее (Cheung et al., 2012 Oncolmmunology 1: 477-486). Биотинилирование слитого белка B7H3-mFc осуществляли с использованием EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin и набора для биотинилирования (Thermo Scientific, Tewksbury, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Биотинилированный белок затем концентрировали, используя центрифужную пробирку Vivaspin с молекулярной отсечкой 50000 MWCO (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany) и проверяли его биотинилирование в ELISA по связыванию стрептавидина.

Мутагенез с помощью вносящей ошибки ПЦР. Вносящая ошибки ПЦР для всего гена hu8H9 scFv (V3) была выполнена с использованием набора Stratagene GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, ПЦР проводили в реакции 50 мкл, содержащей 1× реакционный буфер Mutazyme II, по 0,5 мкМ каждого из праймеров ERRORF (5'-TCAGTTTGGCCAGGCGGCC-3', SEQ ID NO: 81) и ERRORR (5'-ACCACTAGTTGGGCCGGCCTG-3', SEQ ID NO: 82), по 0,2 мМ (каждого) dNTP, 1 нг матрицы ДНК, 2 мкМ 8- оксодезоксигуанозинтрифосфата, 2 мкМ 2'-дезоксип-нуклеозид-5'-трифосфата и 2,5 Ед ДНК-полимеразы Mutazyme II. Реакционные смеси денатурировали при 95°C в течение 2 мин, проводили 35 следующих циклов - 95°C в течение 1 мин, 60°C в течение 1 мин и 72°C в течение 1 мин и, в конце проводили удлинение при 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле, и каждый амплифицировали в четырех 100-мкл реакциях ПЦР, содержащих 1× ПЦР-смесь NEB, 1 мкМ праймеры YDRDF (5'-CTTCGCTGTT TTTCAATATT TTCTGTTTT GCTTCAGTTT TGGCCAGGC GGCC-3', SEQ ID NO: 83) и YDRDR (5'-GAGCCGCCAC CCTCAGAACC GCCACCCTCA GAGCCACACAC TAGTTGGGCC GGCCTG-3', SEQ ID NO: 84), 120 нг продукта подверженной ошибкам ПЦР и 2,5 Ед ДНК-полимеразы. Реакции подвергали термической циклизации с использованием 30 циклов, как описано выше. Продукты реакции очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле и концентрировали путем ультрафильтрации с водой.

Отбор мутантов hu8H9 из дрожжевых библиотек.

Конструирование и выращивание дрожжевых библиотек для созревания аффинности было модифицировано относительно ранее опубликованного протокола (Zhao et al., 2011 Mol Cancer Ther 10: 1677-1685). Перед флуоресцентной сортировкой клеток (FACS) дрожжевую библиотеку (1×10^9 клеток) предварительно инкубировали с мышиним иммуноглобулином (3F8 IgG) при комнатной температуре (RT) в течение 1 часа, с последующей инкубацией с 10 мкг конъюгированных с B7H3-mFc магнитных шариков в течение 1 часа при RT в PBSA-буфере (0,1%-м BSA в PBS), с последующим разделением на магнитной подставке. Выделенные шарики трижды промывали буфером PBSA, ресуспендировали в 10 мл среды SDCAA и выращивали в течение ночи в шейкере при 30°C при встряхивании 250 об/мин. Дрожжевые

клетки, выделенные из магнитных шариков, инкубировали в среде SG/RCAA в течение 18 ч при 20°C при встряхивании 250 об/мин. Для первого отбора с использованием FACS осаждали приблизительно 1×10^8 дрожжевых клеток, промывали дважды буфером PBSA и ресуспендировали в 1 мл буфера PBSA, содержащем 10 мкг/мл биотинилированного B7H3-mFc и мышиного антитела против с-мус (Jackson Research Laboratories, Бар-Харбор, штат Мэн). После инкубации дрожжевые клетки промывали 3 раза и затем ресуспендировали в 1 мл буфера PBSA. В дрожжевые клетки для сортировки добавляли разведенный 1:100 R-фикоэритрин, конъюгированный со стрептавидином (BD Bioscience) и конъюгированное с FITC козье антитело против мышиного (Fab)₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA), после чего клетки инкубировали при 4°C в течение 30 мин, промывали 3 раза буфером PBSA и затем ресуспендировали в буфере PBSA для сортировки. Сортировочные окна устанавливали таким образом, чтобы отбирать наиболее высокие сигналы связывания антигена. Собранные клетки выращивали в течение ночи в среде SDCAA при 30°C и затем инкубировали в SG/RCAA для следующего цикла сортировки. Для следующих двух раундов отбора использовали приблизительно $1-2 \times 10^7$ дрожжевых клеток для окрашивания 3 мкг/мл и 1 мкг/мл биотинилированного B7H3, соответственно. Дрожжевые плазмиды были выделены с использованием набора для выделения дрожжевых плазмид Zymoprep yeast Plasmid Mimiprep II Kit (Zymo Research, Irvine, CA) в соответствии с инструкциями производителя и использованы в качестве матриц для второй библиотеки. Конструирование и отбор второй библиотеки выполняли так же, как и для первой дрожжевой библиотеки. Однако на второй дрожжевой библиотеке проводили четыре раунда отбора с помощью FACS с 1, 0,2, 0,05 и 0,01 мкг/мл биотинилированного B7H3-mFc, соответственно. Клетки из последнего раунда отбора были высеваны на планшеты с SDCAA. Моноклональные дрожжевые клетки были охарактеризованы, и выделенные плазмиды, кодирующие scFv с улучшенной аффинностью, были секвенированы.

Экспрессия и очистка растворимых scFv.

Полипептиды scFv экспрессировали и очищали, как описано ранее (Zhao et al., 2011, *Mol. Cancer Ther.*, 10: 1677-1685). Бактериальные клетки HB2151 трансформировали плазмидой pCom3x, содержащей последовательности scFv. Отдельные свежие колонии инокулировали в среду 2YT, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 0,2% глюкозы. Культуру индуцировали изопропил-L-тио- β -D-галактопиранозидом (конечная концентрация 0,5 mM). После роста в течение ночи при 30°C бактерии центрифугировали при 5000 $\times$ g в течение 15 мин. Растворимый scFv высвобождался из бактериальной периплазмы путем инкубации бактерий при 30°C в течение 30 мин. Прозрачный супернатант выделяли и очищали на колонке Ni-NTA. Все рекомбинантные scFv несли теги FLAG и His. Экспрессия и очистка IgG-конструкций

Генные конструкции (на основе вектора pBluescript (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)), кодирующие тяжелую и легкую цепи 8H9, трансфицировали в клетки CHO-S и отбирали на G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Линии, продуцирующие антитела, культивировали в свободной от сыворотки среде OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), а затем собирали супернатант. Аффинную колонку с белком А предварительно уравнивали буферным раствором 25 mM цитрата натрия/0,15 M NaCl с pH 8,2. Связанный 8H9 элюировали буферным раствором 0,1 M лимонной кислоты/цитрата натрия с pH 3,9 и диализовали в 25 mM цитрате натрия и 150 mM NaCl при pH 8,2.

ELISA.

B7H3-mFc (100 нг/лунку) или 2IgB7H3 (R&D, Minneapolis, MN) (25 нг/лунку) наносили на поливинильные титрационные микропланшеты в PBS в течение ночи. Затем планшеты блокировали 0,5%-м BSA в PBS в количестве 150 мкл на лунку в течение 1 часа при комнатной температуре. Антитела добавляли в трех повторах серийными разведениями в 0,5% BSA. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре и промывки PBS добавляли HRP-мышиное антитело против человеческого Fc, HRP-стрептавидин или HRP-мышиное анти-Flag антитело. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре и дальнейшей промывки появлялось цветное окрашивание, которое количественно определяли с использованием ридера для ELISA-планшетов при 490 нм.

Анализ с помощью проточной цитометрии.

Для окрашивания дрожжевых клеток, представляющих scFv на своей поверхности, клетки инкубировали с антигеном B7H3-mFc в различных концентрациях (0,1 и 1 мкг/мл) в PBSA в течение 30 мин на льду с последующей инкубацией с APC-конъюгированным антигеном (BD Bioscience, San Jose, CA) в качестве вторичного антитела. Для окрашивания опухолевых клеток клетки собирали в культуральной среде и инкубировали с 1 мкг/мл очищенных scFv с последующей последовательной инкубацией с мышиным анти-his антителом и PE-антимышиным антителом. Проточную цитометрию выполняли на FAC-Scalibur™ (BD Bioscience, San Jose, CA).

Определение аффинности с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Кратко, антиген B7H3 (либо 2Ig-B7H3, 4Ig-B7H3, 2Ig-B7H3-mFc, 4Ig-B7H3-mFc) напрямую иммобилизовали на чипе датчика CM5 посредством гидрофобного взаимодействия. Эталонная поверхность была настроена для неспецифического связывания и изменений показателя преломления. Для анализа кинетики взаимодействий различные концентрации scFv вводили при скорости потока 30 мкл/мин с использованием рабочего буфера, содержащего 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверх-

ностно-активного вещества P-20 (pH 7,4). Данные для фазы ассоциации и диссоциации аппроксимировали одновременно на модель 1:1 с использованием BIAevaluation 3.2. Все эксперименты проводили при 25°C. Для определения эпитопа, на чип иммобилизовали WT 2Ig-B7H3, R127A и D128A, вводили 400 нМ ch8H9, M1H42, 6A1 и клон 185504, как описано выше (время контакта 180 секунд, время диссоциации 600 с).

Анализ Т-клеточной пролиферации.

Т-клетки очищали из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) с использованием набора для выделения тотальных Т-клеток (Pan T cell isolation kit, Miltenyi Biotec, Cambridge, MA). Клетки нейробластомы IMR-32 облучали при 80 Гр и ресуспендировали в RPMI (GIBCO) при концентрации 0,1 миллион/мл. В 96-луночные планшеты для культивирования клеток добавляли 1×10^4 клеток IMR-32/лунку (100 мкл) с различными концентрациями ch8H9 (50 мкл) и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем 2×10^5 очищенных Т-клеток/лунку смешивали с 1,5 мкл магнитных шариков CD3/CD28 Dynabead (Invitrogen, Carlsbad, CA) и добавляли в лунки с клетками IMR-32. Клетки культивировали и поддерживали в RPMI, дополненной FBS и 30 Ед/мл IL-2, при 37°C в течение 6 дней. Пролиферацию Т-клеток количественно определяли в анализе с использованием набора для подсчета клеток Cell counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Mol, Rockville, MD) в соответствии с протоколом производителя.

Анализ Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Клетки HER2(+) и B7H3(+) карциномы шейки матки человека (HeLa) культивировали при 37°C в RPMI+10% FBS, 2% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки собирали с помощью трипсина/EDTA, и 1×10^6 клеток инкубировали с 100 мкл ^{51}Cr в течение 60 мин при 37°C и со 100 мг/мл специфического к B7H3 мышиного антитела 8H9 или без него. После инкубации клетки промывали дважды, и 5000 клеток-мишеней высевали в каждую лунку круглодонного 96-луночного планшета вместе с Т-клетками в соотношении 1:10, соответственно. Затем добавляли различные концентрации (от 1 до 1×10^{-6} мг/мл) анти-HEK2×анти-CD3 биспецифических антител (трастузумаба, слитого с huOKT3 scFv) и 10 мг/мл мышиного антитела 8H9 (последнее только в клетки, предварительно инкубированные с антителом 8H9). Супернатанты собирали после четырехчасовой инкубации и измеряли их радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Удельный лизис опухолевых клеток рассчитывали на основе следующей формулы:

% удельного лизиса = $(\text{срм образца} - \text{спонтанные срм}) / (\text{максимальные срм} - \text{спонтанные срм}) \times 100\%$.

Культивирование опухолевых клеток и анализ антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Опухолевые клетки нейробластомы LAN-1 были получены из Детской больницы Лос-Анджелеса. Клетки культивировали в RPMI1640 (Cellgro, Manassas, VA), дополненной 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies, Grand Island, NY) при 37°C в инкубаторе с 5%-м содержанием CO_2 и увлажнением. Анализ ADCC проводили, как описано ранее (Cheung, N.K. et al., 2012, Oncoimmunology 1: 477-48652). Кратко, опухолевые клетки нейробластомы LAN-1 радиоактивно метили ^{51}Cr , и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) использовались в качестве эффекторов в соотношении эффектор:мишень 25:1. Цитотоксичность измеряли по высвобождению ^{51}Cr .

Виораспределение антитела у мышей с ксенотрансплантатами.

Самки бестимусных голых мышей (возраст 6-8 недель) были приобретены у Harlan Sprague Dawley, Inc. Все процедуры проводились в соответствии с протоколами, утвержденными ведомственным комитетом по уходу и использованию животных Мемориального ракового центра Слоуна-Кеттеринга и ведомственными инструкциями по правильному и гуманному использованию животных в исследованиях. Опухолевые клетки (LAN-1) собирали и имплантировали подкожно (s.c.) в боковую область мышей (5×10^6 клеток на каждую мышь). Когда объемы опухолей составляли примерно 200 мм³, рандомизированным группам мышей (n=4-5/группу, один препарат радиоактивно меченого антитела/группу) вводили с помощью внутривенных инъекций 50 мКи ^{131}I -меченого антитела (полученного в соответствии со способом IODO-GEN (Salacinski, P.R. et al., 1981, Analytical biochemistry 117:136-146; Harlow, E. and D. Lane, 1999, Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) с последующей очисткой фильтрацией с использованием коммерческих предварительно набитых колонок Сефадекс G-25 в PBS+1%-й BSA; удельная активность: 1,67-3,81 мКи/мг, 13-30 мкг антитела/дозу). Иммунореактивность каждого трекера оценивали с помощью анализа связывания клеток *in vitro* со свежеобработанными LAN-1. Мышей умерщвляли через 48 ч после инъекции (p.i.), органы удаляли и просчитывали в гамма-счетчике (Perkin Elmer Wallac Wizard 3). Эти органы включали кожу, печень, селезенку, почки, надпочечники, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, бедренную кость, мышцу, опухоль, сердце, легкие, позвоночник и головной мозг. Уровни радиоактивности были скорректированы на фон и распад, преобразованы в активность с использованием калибровочного коэффициента системы, специфического для изотопа, нормализованы на введенную активность и выражены в процентах вводимой дозы на грамм (% ID/g). Также рассчитывали отношение ID/g для опухоли и неопухолевых тканей.

Клиническое применение 8H9 в компартментной радиоиммунотерапии.

Метастазы в центральной нервной системе (ЦНС) Метастазирование в головной мозг является разрушительным осложнением и основным препятствием при лечении рака в случае большинства солидных опухолей; его биология плохо понимается, контроль является неадекватным, и излечение происходит редко (Maher EA et al., *Cancer Res* 69: 6015-20, 2009). Опухолевые клетки из крови или метастазы из головного мозга могут проникать в СМЖ и распространяться по всей цереброспинальной оси посредством постоянного потока СМЖ из желудочков в спинной канал и над кортикальными выпуклостями, что называется лептоменингеальным (LM) карциноматозом (Grossman, S.A. et al., 1999, *Oncology* 13: 144-152, Bruno, M.K. et al., 2005, *Cancer Treat. Res.*, 125: 31-52, Gleissner B. et al., 2006, *Lancet Neurol* 5: 443-52).

LM-карциноматоз наиболее часто встречается у пациентов с диссеминированным системным метастазированием (Wasserstrom, W.R. et al., 1982, *Cancer* 49: 759-72, Balm, M. et al., 1996, *Arch Neurol* 53: 626-32, Chamberlain, M.C. et al., 2005, *J. Clin. Oncol.*, 23: 3605-13). Сопутствующее метастазирование в паренхиму головного мозга также встречается (у 11-31% пациентов) (Wasserstrom, W.R. et al., 1982, *Cancer* 49: 759-72; Freilich, R.J. et al., 1995, *Annals of Neurology* 38: 51-57, Posner, J.B., *Neurologic Complications of Cancer*, Contemporary Neurology Series, Philadelphia, FA Davis Company, 1995). В отличие от лейкемии, где LM-метастазирование хорошо контролируется интратекальной химиотерапией (Littman, P. et al., 1987, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 13: 1443-9), прогноз в отношении солидных опухолей чрезвычайно плохой, несмотря на использование химиотерапии и лучевой терапии (Wasserstrom, W.R. et al., 1982, *Cancer* 49: 759-72, Grossman, S.A. et al., 1991, *Neurol. Clin.*, 9: 843-56). Злокачественные асциты

Злокачественные асциты (перитонеальный карциноматоз) сопровождают широкий спектр абдоминальных и внебрюшных опухолей. Лимфатическая обструкция и сосудистая проницаемость являются основными факторами в его патогенезе (Holm-Nielsen, P., 1953, *Acta Pathol., Microbiol. Scand.*, 33: 10-21, Sangisetty, S.L. et al., 2012, *World J. Gastrointest.* 4: 87-95). Злокачественные асциты значительно снижают качество жизни пациентов, поскольку приводят к потере белка, дисбалансу электролитов, диффузному отеку и абдоминальному сепсису. Среди опухолей брюшной полости злокачественные асциты связаны с овариальными, эндометриальными, колоректальными, желудочными, панкреатическими и перитонеальными злокачественными новообразованиями. В некоторых исследованиях у 15% всех пациентов с раком желудочно-кишечного тракта развиваются злокачественные асциты на определенной стадии заболевания (Smith, E.M. et al., 2003, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 15: 59-72, Koppe, M.J. et al., 2006, *Ann Surg.*, 243: 212-22). В то время как эпителиальный рак яичников составляет 25% (22240 новых случаев, 14030 смертей в год в США) всех случаев рака женских половых путей, у двух третей этих пациентов развиваются злокачественные асциты (Eskander, R.N. et al., 2012, *Int. J. Womens Health* 4: 395-404).

Также известно, что внебрюшные опухоли, например, рак молочной железы, рак легкого и лимфома, вызывают злокачественные асциты. У 20% всех пациентов со злокачественными асцитами первичный очаг опухоли неизвестен (Saif, M.W. и др., 2009, *Ann Saudi Med* 29: 369-77).

Согласно многоцентровому исследованию эволюции перитонеального карциноматоза (EVOCAPE), злокачественные асциты являются неблагоприятным прогностическим фактором, приводящим к медианной выживаемости в несколько месяцев (Sadeghi, B. et al., 2000, *Cancer* 88: 358-63). Полностью успешных методов лечения не существует, в то время как паллиативное лечение является неадекватным, часто приводящим к болезненной смерти (Sangisetty, S.L. et al., 2012, *World J. Gastrointest. Surg.*, 4: 87-95; Sugraker, P.H. et al., 2006, *Ann Surg.*, *Oncol* 13: 635-44).

Предшествующий опыт работы с компартментной радиоиммунотерапией (cRIT).

Одним из подходов к лечению злокачественных асцитных опухолей и LM-карциноматоза является компартментная радиоиммунотерапия (cRIT), где радиоактивно меченные антитела вводятся напрямую в пораженный компартмент (перитонеальную полость или пространство CSF), чтобы направленно воздействовать радиацией на опухоли. Внутривнутрибрюшинное введение антитела ^{90}Y -CC49 (мышинное анти-TAC-72, $\leq 24 \text{ МКи/м}^2$) (Alvarez, R.D. et al., *Clin. Cancer Res.* 8: 2806-11) и антитела ^{90}Y -HMFG1 (мышинное анти-MUC1, 666 МБк/м^2) (Verheijen, R.H. et al., 2006, *J. Clin. Oncol.*, 24: 571-8) переносилось пациентами с рецидивом рака яичников, хотя исследование не показало никаких признаков увеличения выживаемости. Интратекальное и интравентрикулярное введение для лечения LM-карциноматоза и внутритопуховое введение для лечения злокачественных опухолей головного мозга с использованием антитела ^{131}I -81C6 (анти-тениносового MAb) увеличивало выживаемость пациентов (Reardon et al., 2006, *J. Clin. Oncol.* 24:115-22; Reardon, D.A. et al., 2008, *Neuro. Oncol.* 10:182-9). Использование антитела At-81C6 является одним из примеров терапии α -частицами при минимальном остаточном заболевании при злокачественной глиоме (Zalutsky, M.R. et al., 2008, *J. Nucl. Med.*, 49: 30-8).

CSF-компартмент идеально подходит для cRIT, позволяя получить крайне выгодный терапевтический индекс. Пространство CSF (текальная сумка) имеет уникальные характеристики, подходящие для cRIT: (1) гематоэнцефалический барьер (BBB) предотвращает рециркуляцию MAb; (2) по сравнению с кровью, CSF имеет мало белых клеток и, следовательно, нет FcR(N) и приблизительно в 1000 раз меньше IgG (Davson, H., Segal MB: *Physiology of the CSF and blood-brain barriers*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, pp 489-523); (3) MAb, вводимые в компартмент CSF, лучше защищены от иммунитета хозяина с меньшим секвестром рецепторами Fc или меньшей деградацией ферментами; (4) в 200 раз более низкое содержание белка в CSF (по сравнению с сывороткой) облегчает связывание MAb с его предполагаемой

мишенью; (5) поскольку объем CSF мал (140 мл), MAb достигает очень высокой концентрации в компартменте; (6) компартмент CSF обновляется каждые 7-8 часов, обеспечивая естественную стадию промывки; (7) поток CSF может быть снижен фармакологически, что позволяет увеличить время реакции MAb; (8) очевидное отсутствие анатомического барьера облегчает движение MAb между CSF и внеклеточным пространством мозга (Davson H, Segal MB: Physiology of the CSF and blood-brain barriers. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, pp 489-523; Spector, R., Mock D.M., 1988, Neurochem. Res. 13:213-9), особенно если присутствует повреждение мозговых оболочек из-за опухоли или хирургического вмешательства. Метастазирование нейробластом в ЦНС

Метастазы нейробластом в ЦНС когда-то были редкостью. В ретроспективном анализе 61 пациента с нейробластомами, метастазирующими в ЦНС, в Мемориальном онкологическом центре Слоуна-Кеттеринга (MSKCC) за последнее десятилетие, у 34 пациентов с нейробластомой ЦНС (без признаков костной болезни в черепе) наблюдалось MYCN-амплификация, тогда как 9 имели поясничную пункцию при первоначальном диагнозе, которые являются известными факторами риска (Kramer, K. et al., 2001, Cancer 91: 1510-9). У двух пациентов было заболевание ЦНС при первичном проявлении нейробластомы (НБ), как с головными болями, так и с высоким внутричерепным давлением, требующим шунтирования. 57 пациентов имели ЦНС НБ в возрасте 5-61 мес (медиана 21,7) от постановки диагноза, медиана 18,5 мес в когорте пациентов с амплифицированным MYCN. У сорока пациентов (68%) был изолированный рецидив в ЦНС, включая 26 (44%) пациентов с единственным паренхиматозным очагом.

Лептоменингеальное распространение произошло у 19 (32%) пациентов, у остальных - мультифокальное заболевание. Поскольку естественная история НБ изменилась, изолированный рецидив в ЦНС сделал полное излечение невозможным, теперь поражая >20% пациентов в MSKCC, системная болезнь у которых была "искоренена" (Cheung, N.K. et al., 2012, J. Clin. Oncol. 30:3264-70). Традиционные методы лечения, включая хирургическую резекцию, химиотерапию и облучение, не улучшили результаты лечения пациентов (Causa, L. et al., 2010, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 79(1):214-9; Croog, V.J. et al., 2010, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 78 (3) :849-54).

cRIT метастазирующего в центральную нервную систему рака в исследовании фазы 1/11 с использованием Intra-Qmmaуа ¹³¹I-8H9.

Первое использование у человека интратекального ¹³¹I-моноклонального антитела было успешно протестировано в клиническом испытании фазы I с благоприятным профилем токсичности и исходом для пациента (Kramer, K. et al., 2007, J. Clin. Oncol., 25: 5465-70). Используя эту платформу, ¹³¹I-8H9 было протестировано в фазе I/II исследования. Пациентов исследовали с помощью ОФЭКТ (Однофотонной эмиссионной компьютерной томографии) после приема 2 мКи ¹³¹I-8H9 или ПЭТ (Позитронно-эмиссионной томографии) после приема ¹²⁴I-8H9, вводимого через резервуар Оммаи. Серийные образцы CSF и крови брались в течение 48 ч для дозиметрических расчетов. ОФЭКТ или ПЭТ проводили приблизительно через 4, 24 и 48 ч. МР-визуализацию головного мозга и позвоночника, а также цитологию CSF проводили до и через 4 недели после инъекции. Вторую инъекцию ¹³¹I-8H9 осуществляли, если у пациентов не развилось прогрессирующее заболевание. Острые побочные эффекты включали лихорадку 1 или 2 степени, головную боль или рвоту, а иногда и переходное повышение уровня АЛТ до 3-го класса. Расчетная средняя доза радиации для CSF составила 36,3 (диапазон 12,8-106) сГр/мКи; средняя доза в крови составляла 2,5 сГр/мКи. ¹²⁴I-8H9/ПЭТ обеспечивали изображения с высоким разрешением распределения лекарственного соединения в пространстве CSF и хорошо коррелировали с предсказанной дозой, получаемой при терапии ¹³¹I-8H9. Наблюдался радиографический ответ LM-заболевания. Острые побочные эффекты были ограниченными. Intra-Ommaуа ¹³¹I-8H9 по-видимому является относительно безопасным, имеет благоприятный терапевтический коэффициент, и за исключением медуллярной токсичности максимально переносимая доза (МПД) не была достигнута (80 мКи на дозу).

Длительная выживаемость пациентов с ЦНС-нейробластомой (Kramer K et al., J Neurooncol 97:409-18, 2010; Kramer K et al., Advances in Neuroblastoma Research A-0241, 2014).

Пациенты в Мемориальном онкологическом центре Слоуна-Кеттеринга прошли курс спасения ЦНС, основанный на темозоламиде/иринотекане, включающий cRIT с использованием ¹³¹I-8H9 (n=37) и ¹³¹I-3F8 (n=5), плюс системную иммунотерапию с использованием 3F8+GMCSF (гранулоцитарного макрофаг-колониестимулирующего фактора) (Grp1). Во внесхемных методах лечения использовались другие методы лечения +/-cRIT (Grp2, все ¹³¹I-8H9). Оценка заболевания включала серии МР головного мозга/спинного мозга, МИБГ, КТ и пункцию костного мозга. Из 83 пациентов с нейробластомой в ЦНС cRIT был возможен у 56 (67%), 42 (51%) после режима спасения (Grp1), 33% с множественными паренхиматозными массами +/-лептоменингеальное заболевание. После Grp1 2 6/42 (62%) пациентов являются живыми и здоровыми, средняя продолжительность жизни (ОС) составляет 82,6 месяца, включая 5/14 (35%) с лептоменингеальным заболеванием или множественными паренхиматозными массами; 3/42 (7%) случаев смерти были вызваны несвязанными с нейробластомой осложнениями. ОС для пациентов с Grp2 составляла 15% (в среднем 21 месяц). Среди долгожителей, выживших только среди пациентов с Grp2, были 7 человек, которые получали cRIT (средняя продолжительность жизни 42,8 месяца). В целом 47 пациентов (56%) умерли от нейробластомы, затрагивающей только ЦНС (n=12, 25%), только системные органы (n=14, 30%), ЦНС и системные органы (n=16, 34%) или токсичности (n=5, 11%). Токсичность

лечения включала кровоизлияние в ЦНС (1) и легочную недостаточность во время химиотерапии (1). Причина смерти у выживших в течение долгого времени включала инфекции (1), легочный фиброз (1) и AML (1). Радионекроз был редок. (Kramer, K. et al., 2014, *Advances in Neuroblastoma Research* A-0246). Это представляет собой значительное улучшение выживаемости у пациентов, получавших cRIT при первом рецидиве в ЦНС. Режим cRIT хорошо переносился молодыми пациентами, несмотря на их предшествующую историю интенсивной цитотоксической терапии. Это лечение обладает потенциалом увеличения выживаемости с лучшим, чем ожидается, качеством жизни.

Внутрибрюшинный (IP) cRit с ^{131}I -8H9 (Modak, MJ et al., ASCO Annual Meeting, J Clin Oncol 2013).

Исследование фазы I внутрибрюшинного (IP) cRIT ^{131}I -8H9 для пациентов с десмопластическими мелко-круглоклеточными опухолями (DSRCT) и другими солидными опухолями, затрагивающими брюшину, почти завершено на детях и молодежи (clinicaltrials.gov NCT01099644). DSRCT, редкая саркома подростков и молодежи, обычно возникающая из брюшины, летальна более чем у 80% пациентов, невзирая на агрессивную мультимодальную терапию. Рецидивы часто присутствуют в виде мультифокальных перитонеальных имплантатов, что делает их уникальными для внутрибрюшинно-направленного воздействия. IP cRIT, благодаря длительному времени удерживания и медленному/неполному переносу в кровоток, может избирательно воздействовать на внутрибрюшинное заболевание, сводя к минимуму токсичность для органов. В этом исследовании когорты из 3-6 пациентов получали лечение ^{131}I -8H9 в увеличивающихся дозах от 30 мКи/м² до 60 мКи/м² в виде однократной внутривенной инъекции. Дозу 2 мКи трекера ^{124}I -8H9 вводили внутрибрюшинно до ^{131}I -8H9 для получения ПЭТ-изображений и данных биораспределения. Фармакокинетика (ФК) изучалась с использованием серийных образцов крови. 15 пациентов, ранее получавших усиленное лечение (из которых 13 имели DSRCT и 2 имели рабдомиосаркому), получили по 30, 40, 50 мКи/м² ^{131}I -8H9 (3 на каждый уровень дозы) или 60 мКи/м² (n=6). Дозолимитирующая токсичность не наблюдались. Три отдельных случая временной, самоограничивающейся, возможно связанной с терапией токсичности 3-й степени были отмечены у 3 пациентов: нейтропения, повышение печеночной трансаминазы и тромбоцитопения, соответственно. Ни один пациент не нуждался в спасении кроветворных стволовых клеток. Период полувыведения из крови составлял 32,5±11,5 ч (n=12), а среднее время пребывания в брюшине составляло 14,6 ч (n=3). Средняя поглощенная доза в крови по данным для отобранных образцов крови составляла 0,56±0,21 рад/мКи (n=14). Средняя поглощенная доза (рад/мКи) в почках, печени, легких и селезенке составляла 1,72, 1,92, 0,64 и 1,03 соответственно (n=3). Дегалогенирование было незначительным: более 80% йода оставалось связанным с белками в крови (n=10). 6/7 пациентов с DSRCT, которые лечились без поддающегося оценке заболевания, остаются в состоянии ремиссии в среднем через 11,1 месяцев после ^{131}I -8H9. cRIT с использованием внутрибрюшинного введения ^{131}I -8H9 была безопасной, а введение ^{124}I -8H9 предоставило ценные данные по ФК и дозиметрии. Поскольку максимальная переносимая доза не была достигнута, доза для пациентов было наращена до 90 мКи/м².

Конвекционно усиленная доставка (CED) ^{124}I -8H9 для пациентов с непрогрессирующими диффузными понтитскими глиомами, ранее получавших лечение внешней лучевой терапии (Clinicaltrials.gov NCT01502917).

Диффузная понтитская глиома (DPG) в детском возрасте является смертельно опасным заболеванием со средней ожидаемой продолжительностью жизни всего лишь 8-10 месяцев после постановки диагноза. (Dunkel, I.J. et al., 1998, *J. Neurooncol*, 37:67-73; Kaplan, A.M. et al., 1996, *Pediatr., Neurosurg*, 24: 185-92). Несмотря на новаторские клинические испытания, включающие гиперфракционированную лучевую терапию и высокодозную химиотерапию, выживаемость пациентов с DPG не изменилась. CED, также называемой внутритканевой инфузией, представляет собой способ локальной доставки лекарств, который опирается на градиент, зависящий от давления, для повышения однородности дисперсии инфузата и объема распределения. (Laske, D.W. et al., 1997, *J. Neurosurg*, 87:586-94; Morrison, P.F. et al., 1994, *Am.J. Physiol.*, 266:R292-305). Малокалиберную канюлю стереотаксически помещают в паренхиму или опухоль, а инфузат доставляется с медленной постоянной скоростью. Это позволяет обойти ГЭБ, который создает естественное препятствие для высокой региональной концентрации и распределения системно вводимых терапевтических средств в головном мозге. В случае DPG, когда ГЭБ в основном не поврежден, пероральное или системное введение противораковой терапии ограничивает проникновение в ЦНС. Доклинические исследования показали, что CED 8H9 в мозговом стволе грызунов была безопасной. (Luther, N. et al., 2008, *Neurosurgery* 63:1166-74; Occhiogrosso G. et al., 2003, *Neurosurgery* 52:388-94; Luther N. et al., 2014, *Neuro. Oncol.*, в печати). Кроме того, внутриопухолевая CED 8H9 (Luther, N. et al., 2008, *Neurosurgery* 63: 1166-74) или его иммунотоксина (8H9-псевдомональный экзотоксин) (Luther, N. et al., 2010, *Mol. Cancer*. 9: 1039-46) в иммунореактивных ксенотрансплантатах U87 в головном мозге крысы также оказалась безопасной с распределением аналогичным обнаруженному в здоровом мозге. Наконец, ^{124}I -8H9 в стволе головного мозга хорошо переносится грызунами, а также приматами, после интерстициальной инфузии (Luther, N. et al., 2014, *Neuro. Oncol.*: в печати). При увеличении либо дозы, либо объема инфузии антитела, объем распределения 8H9 может быть увеличен. ^{124}I -8H9 является идеальным терапевтическим агентом для дозиметрии и терапии. В клиническом испытании фазы I пациенты с DIPG, прошедшие внешнюю лучевую терапию в рамках стандартного лечения, получали CED ^{124}I -8H9 с 4

уровнями доз (0,25, 0,5, 0,75 и 1 мКи/инъекцию) с 3-6 пациентами в каждой группе. При 1 мКи/инъекцию МПД не была достигнута. По ПЭТ, ^{124}I -8Н9 показал точную локализацию опухоли. Никаких осложнений со стороны СЕД не наблюдалось, и не отмечалось значительной токсичности (>2-й степени). Пациенты, получавшие лечение при более высоких дозах ^{124}I -8Н9, выживали в течение времени, превышающего пределы установленной ранее средней остаточной продолжительности жизни. В настоящее время в испытания вносятся изменения для продолжения увеличения дозы с 3 дополнительными дозами (2,5, 3,5 и 4 мКи). СЕД радиоактивно меченым 8Н9 может применяться к другим солитарно инфильтрующимся первичным или метастатическим опухолям головного мозга.

Эквиваленты и область применения

Специалисты в данной области поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения приведенного выше описания, а напротив, соответствует указанному в прилагаемой формуле изобретения.

В пунктах формулы изобретения единственное число может означать один или более одного, если иное не указано или иным способом не ясно из контекста. Пункты формулы или описания, которые включают "или" между одним или несколькими членами группы считаются выполненными, если один, более одного или все члены группы присутствуют в, заняты в или иным образом имеют отношение к данному продукту или процессу, если иное не указано или иным образом не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает варианты, в которых один член группы присутствует в, занят в или иным образом имеет отношение к данному продукту или процессу. Изобретение включает варианты осуществления, в которых более одного или все члены группы присутствуют в, заняты в или иным способом имеют отношение к данному продукту или процессу. Более того, следует понимать, что изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько из ограничений, элементов, предметов, описательных терминов и т.д., из одного или нескольких из перечисленных пп. вводятся в другой пункт. Например, любой пункт, который зависит от другого пункта, может быть модифицирован, чтобы включать одно или несколько ограничений, найденных в любых других пп., которые зависят от того же самого основного пункта. Кроме того, если в пункте формулы указана композиция, следует понимать, что включены способы применения композиции для любой из целей, раскрытых в настоящем описании, и включены способы изготовления композиции любым из способов изготовления, раскрытых в настоящем документе, или другими способами, известными в этой области техники, если не указано иное, или иным образом не очевидно среднему специалисту в данной области, что будут возникать противоречие или несогласованность.

Если элементы представлены в виде списков, например, в формате групп Маркуша, то следует понимать, что каждая подгруппа из элементов также является раскрытой, и любой элемент(ы) может быть удален из группы. Следует понимать, что, в общем случае, когда изобретение, или аспекты настоящего изобретения, являются/указываются как содержащие конкретные элементы, признаки и т.д., некоторые варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят из или по существу состоят из таких элементов, признаков и т.д. В целях упрощения эти варианты не были конкретно изложены *in haec verba* в настоящем документе. Следует отметить, что термин "содержащий" предназначен, чтобы быть открытым, и допускает включение дополнительных элементов или стадий.

Если приведены диапазоны, то конечные точки включены. Кроме того, следует понимать, что, если иное не указано или иным образом не очевидно из контекста и пониманию обычного специалиста в данной области техники, значения, которые выражены в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или субдиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления настоящего изобретения до одной десятой от нижнего предела диапазона, если контекст явно не указывает иное.

Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, который относится к предшествующему уровню техники, может быть явным образом исключен из любого одного или нескольких пп. формулы изобретения. Поскольку такие варианты считаются известными обычному специалисту в данной области техники, они могут быть исключены, даже если исключение не указано явно в данном документе.

Обсуждаемые выше и включенные в текст публикации приведены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что изобретатели не имеют права датировать задним числом такое раскрытие на основании предшествующего изобретения.

Специалистам в данной области будет понятно, или они будут в состоянии установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Объем настоящего изобретения не ограничен приведенным выше описанием, а напротив, соответствует изложенному в нижеследующей формуле изобретения.

Литературные ссылки

- Mellman I, Coukos G, Dranoff G: Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-9, 2011
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM: Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 24:207-12, 2012
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al: Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al: Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012
- Romagne F, Andre P, Spee P, et al: Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114:2667-77, 2009
- Godal R, Bachanova V, Gleason M, et al: Natural killer cell killing of acute myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia blasts by killer cell immunoglobulin-like receptor-negative natural killer cells after NKG2A and LIR-1 blockade. *Biol. Blood Marrow Transplant* 16:612-21, 2010
- Tarek N, Gallagher MM, Zheng J, et al: Unlicensed natural killer cells dominate neuroblastoma killing in the presence of anti-GD2 monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* (in press), 2012
- Zhao XW, van Beek EM, Schornagel K, et al: CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:18342-7, 2011
- Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al: CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138:286-99, 2009
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al: Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 71:1374-84, 2011
- Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, et al: Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2:63ra94, 2010
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al: Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142:699-713, 2010

Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, et al: The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:6662-6667, 2012

Wilcox RA, Ansell SM, Lim MS, et al: The B7 Homologues and their Receptors in Hematologic Malignancies. *Eur. J. Haematol.*, 2012

Chapoval AI, Ni J, Lau JS, et al: B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* 2:269-74, 2001

Steinberger P, Majdic O, Derdak SV, et al: Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J. Immunol.* 172:2352-9, 2004

Sun M, Richards S, Prasad DV, et al: Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J. Immunol.* 168:6294-7, 2002

Suh WK, Gajewska BU, Okada H, et al: The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 4:899-906, 2003

Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, et al: Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:12640-5, 2004

Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, et al: B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res.* 67:7893-900, 2007

Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, et al: B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:19458-63, 2007

Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, et al: Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14:5150-7, 2008

Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, et al: T-cell

coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. Clin. Cancer Res. 14:4800-8, 2008

Zang X, Sullivan PS, Soslow RA, et al: Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas. Mod. Pathol. 23:1104-12, 2010

Lemke D, Pfenning PN, Sahm F, et al: Costimulatory protein 4IgB7H3 drives the malignant phenotype of glioblastoma by mediating immune escape and invasiveness. Clin. Cancer Res. 18:105-17, 2012

Wang L, Zhang Q, Chen W, et al: B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis. PLoS One 8:e70689, 2013

Yamato I, Sho M, Nomi T, et al: Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer. Br. J. Cancer 101:1709-16, 2009

Gregorio A, Corrias MV, Castriconi R, et al: Small round blue cell tumours: diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule. Histopathology 53:73-80, 2008

Sun X, Vale M, Leung E, et al: Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. Gene Ther. 10:1728-34, 2003

Wu CP, Jiang JT, Tan M, et al: Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis. World J. Gastroenterol. 12:457-9, 2006

Loos M, Hedderich DM, Ottenhausen M, et al: Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer. BMC Cancer 9:463, 2009

Hofmeyer KA, Ray A, Zang X: The contrasting role of B7-H3. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:10277-8, 2008

Vigdorovich V, Ramagopal UA, Lazar-Molnar E, et al: Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. Structure 21:707-17, 2013

Zhou Z, Luther N, Ibrahim GM, et al: B7-H3, a

potential therapeutic target, is expressed in diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* 111:257-64, 2013

Calabro L, Sigalotti L, Fonsatti E, et al: Expression and regulation of B7-H3 immunoregulatory receptor, in human mesothelial and mesothelioma cells: immunotherapeutic implications. *J. Cell Physiol.* 226:2595-600, 2011

Modak S, Kramer K, Gultekin SH, et al: Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res.* 61:4048-54, 2001

Xu H, Cheung IY, Guo HF, et al: MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res.* 69:6275-81, 2009

Modak S, Guo HF, Humm JL, et al: Radioimmunotargeting of human rhabdomyosarcoma using monoclonal antibody 8H9. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20:534-46, 2005

Luther N, Cheung NK, Dunkel IJ, et al: Intraparenchymal and intratumoral interstitial infusion of anti-glioma monoclonal antibody 8H9. *Neurosurgery* 63:1166-74; discussion 1174, 2008

Juhl H, Petrella EC, Cheung NK, et al: Additive cytotoxicity of different monoclonal antibody-cobra venom factor conjugates for human neuroblastoma cells. *Immunobiology* 197:444-59, 1997

Onda M, Wang QC, Guo HF, et al: In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* 64:1419-24, 2004

Luther N, Cheung NK, Souliopoulos EP, et al: Interstitial infusion of glioma-targeted recombinant immunotoxin 8H9scFv-PE38. *Mol. Cancer Ther.* 9:1039-46, 2010

Cheung NK, Guo HF, Modak S, et al: Anti-idiotypic antibody facilitates scFv chimeric immune receptor gene transduction and clonal expansion of human lymphocytes for tumor therapy. *Hybrid Hybridomics* 22:209-18, 2003

Kramer K, Modak S, Kushner BH, et al: Radioimmunotherapy of metastatic cancer to the central nervous system: Phase I study of intrathecal ¹³¹I-8H9. American Association for Cancer Research LB-4 (Presentation), 2007

Kramer K, Kushner BH, Modak S, et al: Effective Intrathecal Radioimmunotherapy-Based Salvage Regimen for Metastatic Central Nervous System (CNS) Neuroblastoma (NB). Presented at the ISPNO 2008, 2008

Kramer K, Kushner BH, Modak S, et al: Compartmental intrathecal radioimmunotherapy: results for treatment for metastatic CNS neuroblastoma. J. Neurooncol. 97:409-18, 2010

Loo D, Alderson RF, Chen FZ, et al: Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. Clin. Cancer Res. 18:3834-45, 2012

Cheung NK, Guo H, Hu J, et al: Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. OncoImmunology 1:477-486, 2012

Zhao Q, Feng Y, Zhu Z, et al: Human monoclonal antibody fragments binding to insulin-like growth factors I and II with picomolar affinity. Mol. Cancer Ther. 10:1677-85, 2011

Cheung, I. Y., Farazi, T. A., Ostrovnaya, I., et al: Deep MicroRNA sequencing reveals downregulation of miR-29a in neuroblastoma central nervous system metastasis. Genes, chromosomes & cancer 53:803-814, 2014

Chen, R., Li, L., and Weng, Z.: ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. Proteins 52, 80-87, 2003

Sanchez, R., and Sali, A.: Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. Proteins Suppl. 1:50-58, 1997

Rocchia, W., Sridharan, S., Nicholls, A. et al: Rapid grid-based construction of the molecular surface and the use of induced surface charge to calculate reaction field energies: Applications to the molecular systems and geometric objects. J. Comput. Chem. 23:128-137, 2002

Salacinski, P. R., McLean, C., Sykes, J. E. et al:

Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycoluril (Iodogen). *Analytical biochemistry* 117:136-146, 1981

Harlow, E., and Lane, D., 1999, *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Ahmed, M., Hu, J., and Cheung, N. K.: Structure Based Refinement of a Humanized Monoclonal Antibody That Targets Tumor Antigen Disialoganglioside GD2. *Frontiers in immunology* 5:372, 2014

Zhao, Q., Ahmed, M., Tassev, D. V. et al: Affinity maturation of T-cell receptor-like antibodies for Wilms tumor 1 peptide greatly enhances therapeutic potential. *Leukemia*, 2015

Zhao, Q., Ahmed, M., Guo, H. F., Cheung, I. Y., and Cheung, N. K.: Alteration of Electrostatic Surface Potential Enhances Affinity and Tumor Killing Properties of Anti-ganglioside GD2 Monoclonal Antibody hu3F8. *J. Biol. Chem.* 290:13017-13027, 2015

Lin, D. Y., Tanaka, Y., Iwasaki, M. et al: The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:3011-3016, 2008

Lazar-Molnar, E., Yan, Q., Cao, E. et al: Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 105:10483-10488, 2008

Stamper, C. C., Zhang, Y., Tobin, J. F. et al: Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 410:608-611, 2001

Schwartz, J. C., Zhang, X., Fedorov, A. A. et al: Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* 410:604-608, 2001

Maher EA, Mietz J, Arteaga CL, et al: Brain metastasis: opportunities in basic and translational research. *Cancer Res.* 69:6015-20, 2009

Grossman SA, Spence A: NCCN clinical practice guidelines for carcinomatous/lymphomatous meningitis. *Oncology* 13:144-152, 1999

Bruno MK, Raizer J: Leptomeningeal metastases from solid tumors (meningeal carcinomatosis). *Cancer Treat. Res.* 125:31-52, 2005

Gleissner B, Chamberlain MC: Neoplastic meningitis. *Lancet Neurol.* 5:443-52, 2006

Wasserstrom WR, Glass JP, Posner JB: Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. *Cancer* 49:759-72, 1982

Balm M, Hammack J: Leptomeningeal carcinomatosis. Presenting features and prognostic factors. *Arch. Neurol.* 53:626-32, 1996

Chamberlain MC: Neoplastic meningitis. *J. Clin. Oncol.* 23:3605-13, 2005

Freilich RJ, FRACP, Krol G, et al: Neuroimaging and Cerebrospinal Fluid Cytology in the Diagnosis of Leptomeningeal Metastasis. *Annals of Neurology* 38:51-57, 1995

Posner JB: Neurologic Complications of Cancer, Contemporary neurology series. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1995

Littman P, Coccia P, Bleyer WA, et al: Central nervous system (CNS) prophylaxis in children with low risk acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13:1443-9, 1987

Grossman SA, Moynihan TJ: Neoplastic meningitis. *Neurol. Clin.* 9:843-56, 1991

Holm-Nielsen P: Pathogenesis of ascites in peritoneal carcinomatosis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 33:10-21, 1953

Sangisetty SL, Miner TJ: Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J. Gastrointest. Surg.* 4:87-95, 2012

Smith EM, Jayson GC: The current and future management of malignant ascites. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*

15:59-72, 2003

Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, et al: Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann. Surg.* 243:212-22, 2006

Eskander RN, Tewari KS: Emerging treatment options for management of malignant ascites in patients with ovarian cancer. *Int. J. Womens Health* 4:395-404, 2012

Saif MW, Siddiqui IA, Sohail MA: Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Ann. Saudi Med.* 29:369-77, 2009

Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al: Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* 88:358-63, 2000

Sugarbaker PH, Alderman R, Edwards G, et al: Prospective morbidity and mortality assessment of cytoreductive surgery plus perioperative intraperitoneal chemotherapy to treat peritoneal dissemination of appendiceal mucinous malignancy. *Ann. Surg. Oncol.* 13:635-44, 2006

Alvarez RD, Huh WK, Khazaeli MB, et al: A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 8:2806-11, 2002

Verheijen RH, Massuger LF, Benigno BB, et al: Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission. *J. Clin. Oncol.* 24:571-8, 2006

Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, et al: Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J. Clin. Oncol.* 24:115-22, 2006

Reardon DA, Zalutsky MR, Akabani G, et al: A pilot study: 131I-antitenascin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro Oncol.* 10:182-9, 2008

Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, et al: Clinical

experience with alpha-particle emitting ^{211}At : treatment of recurrent brain tumor patients with ^{211}At -labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* 49:30-8, 2008

Davson H, Segal MB: Physiology of the CSF and blood-brain barriers. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, pp 489-523

Spector R, Mock DM: Biotin transport and metabolism in the central nervous system. *Neurochem. Res.* 13:213-9, 1988

Kramer K, Kushner B, Heller G, et al: Neuroblastoma metastatic to the central nervous system. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Experience and A Literature Review. *Cancer* 91:1510-9, 2001

Cheung NK, Cheung IY, Kushner BH, et al: Murine Anti-GD2 Monoclonal Antibody 3F8 Combined With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and 13-Cis-Retinoic Acid in High-Risk Patients With Stage 4 Neuroblastoma in First Remission. *J. Clin. Oncol.* 30:3264-70, 2012

Causa L, Hijal T, Michon J, et al: Role of Palliative Radiotherapy in the Management of Metastatic Pediatric Neuroblastoma: A Retrospective Single-Institution Study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010

Croog VJ, Kramer K, Cheung NK, et al: Whole Neuraxis Irradiation to Address Central Nervous System Relapse in High-Risk Neuroblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010

Kramer K, Humm JL, Souweidane MM, et al: Phase I study of targeted radioimmunotherapy for leptomeningeal cancers using intra-Ommaya ^{131}I -3F8. *J. Clin. Oncol.* 25:5465-70, 2007

Kramer K, Kushner B, Modak S, et al: Recurrent Neuroblastoma Metastatic to the Central Nervous System: Is it curable? *Advances in Neuroblastoma Research* 2014:A-0241, 2014

Kramer K, Kushner B, Modak S, et al: Radionecrosis in Children treated with Conventional Radiation Therapy and Intrathecal Radioimmunotherapy for CNS Neuroblastoma: Is it a Concern? *Advances in Neuroblastoma Research* 2014:A-0246, 2014

Modak MJ, LaQuaglia M, Carrasquillo JA, et al: Intraperitoneal radioimmunotherapy (RIT) for desmoplastic small round cell tumor (DSRCT): Initial results from a phase I trial (clinicaltrials.gov NCT01099644), ASCO Annual Meeting 2013, J. Clin. Oncol., 2013

Dunkel IJ, Garvin JH, Jr., Goldman S, et al: High dose chemotherapy with autologous bone marrow rescue for children with diffuse pontine brain stem tumors. Children's Cancer Group. J. Neurooncol. 37:67-73, 1998

Kaplan AM, Albright AL, Zimmerman RA, et al: Brainstem gliomas in children. A Children's Cancer Group review of 119 cases. Pediatr. Neurosurg. 24:185-92, 1996

Laske DW, Morrison PF, Lieberman DM, et al: Chronic interstitial infusion of protein to primate brain: determination of drug distribution and clearance with single-photon emission computerized tomography imaging. J. Neurosurg. 87:586-94, 1997

Morrison PF, Laske DW, Bobo H, et al: High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. Am. J. Physiol. 266:R292-305, 1994

Occhiogrosso G, Edgar MA, Sandberg DI, et al: Prolonged convection-enhanced delivery into the rat brainstem. Neurosurgery 52:388-93; discussion 393-4, 2003

Luther N, Zhou Z, Zanzonico P, et al: The potential of theragnostic ¹²⁴I-8H9 convection-enhanced delivery in diffuse intrinsic pontine glioma. Neuro Oncol.:in press, 2014

Compte, M., Nunez-Prado, N., Sanz, L. & Alvarez-Vallina, L. Immunotherapeutic organoids: a new approach to cancer treatment. Biomatter 3, doi:10.4161/biom.23897 (2013).

Noel, D. et al. In vitro and in vivo secretion of cloned antibodies by genetically modified myogenic cells. Hum. Gene Ther. 8:1219-1229, doi:10.1089/hum.1997.8.10-1219 (1997).

Noel, D. et al. High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer. Hum. Gene Ther. 13:1483-1493, doi:10.1089/10430340260185111 (2002).

Jooss, K. & Chirmule, N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy.

Gene Ther. 10:955-963, doi:10.1038/sj.gt.3302037 (2003).

Xiao, P. J., Lentz, T. B. & Samulski, R. J. Recombinant adeno-associated virus: clinical application and development as a gene-therapy vector. Therapeutic delivery 3:835-856 (2012).

Nathwani, A. C. et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N. Engl. J. Med. 365:2357-2365, doi:10.1056/NEJMoal108046 (2011).

Patel, N., Reiss, U., Davidoff, A. M. & Nathwani, A. C. Progress towards gene therapy for haemophilia B. International journal of hematology 99:372-376, doi:10.1007/s12185-014-1523-0 (2014).

Fang, J. et al. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. Nat. Biotechnol. 23:584-590 (2005).

Watanabe, M., Boyer, J. L. & Crystal, R. G. Genetic delivery of bevacizumab to suppress vascular endothelial growth factor-induced high-permeability pulmonary edema. Hum. Gene Ther. 20:598-610, doi:10.1089/hum.2008.169 (2009).

Ho, D. T. et al. Growth inhibition of an established A431 xenograft tumor by a full-length anti-EGFR antibody following gene delivery by AAV. Cancer Gene Ther. 16:184-194, doi:10.1038/cgt.2008.68 (2009).

Wang, G. et al. Persistent expression of biologically active anti-HER2 antibody by AAVrh.10-mediated gene transfer. Cancer Gene Ther. 17:559-570, doi:10.1038/cgt.2010.11 (2010).

Vigna, E. et al. "Active" cancer immunotherapy by anti-Met antibody gene transfer. Cancer Res. 68:9176-9183, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1688 (2008).

Balazs, A. B. et al. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. Nature 481:81-84, doi:10.1038/nature10660 (2012).

Arafat, W. O. et al. Effective single chain antibody (scFv) concentrations in vivo via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv. Gene Ther. 9:256-262,

doi:10.1038/sj.gt.3301639 (2002).

Sanz, L., Kristensen, P., Russell, S. J., Ramirez Garcia, J. R. & Alvarez-Vallina, L. Generation and characterization of recombinant human antibodies specific for native laminin epitopes: potential application in cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 50:557-565 (2001).

Sanz, L. et al. A novel cell binding site in the coiled-coil domain of laminin involved in capillary morphogenesis. *Embo J.* 22:1508-1517, doi:10.1093/emboj/cdg150 (2003).

Sanz, L. et al. Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Ther.* 9:1049-1053, doi:10.1038/sj.gt.3301725 (2002).

Sanchez-Arevalo Lobo, V. J. et al. Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int. J. Cancer* 119:455-462, doi:10.1002/ijc.21851 (2006).

Afanasieva, T. A. et al. Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther.* 10:1850-1859, doi:10.1038/sj.gt.3302085 (2003).

Liu, X., Wu, J., Zhang, S., Li, C. & Huang, Q. Novel strategies to augment genetically delivered immunotoxin molecular therapy for cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 16:861-872, doi:10.1038/cgt.2009.30 (2009).

Blanco, B., Holliger, P., Vile, R. G. & Alvarez-Vallina, L. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J. Immunol.* 171:1070-1077 (2003).

Compte, M. et al. Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA x anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther.* 14: 380-388, doi:10.1038/sj.cgt.7701021 (2007).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, которое содержит CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 с последовательностями SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 62, соответственно.

2. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкие цепи с SEQ ID NO: 5 или 7 и тяжелые цепи с SEQ ID NO: 13 или 15.

3. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь с SEQ ID NO: 5 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 13.

4. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь с SEQ ID NO: 7 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 15.

5. Конъюгат антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-4 и терапевтического средства.

6. Конъюгат антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-4 и диагностического средства.

7. Конъюгат по п.5 или 6, где терапевтическое средство или агент для детекции представляет собой радиоизотоп, лекарственное средство, наночастицу или иммунотоксин.

8. Конъюгат по п.6, где агент для детекции представляет собой диагностическое или визуализирующее средство, или то и другое.

9. Биспецифическое антитело для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3 и вторым антигеном, которое представляет собой CD3 или DOTA, где биспецифическое антитело содержит первый антиген-связывающий сайт, содержащий антитело или антиген-связывающий фрагмент по п.1.

10. Биспецифическое антитело по п.9, которое содержит линкер и второй антиген-связывающий сайт с SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

11. Биспецифическое антитело по п.9 или п.10, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент представляет собой scFv.

12. Биспецифическое антитело по п.11, где scFv содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 26.

13. Биспецифическое антитело для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3 и со вторым антигеном, который представляет собой CD3 или DOTA, где биспецифическое антитело содержит первый антиген-связывающий сайт, содержащий scFc по п.12.

14. Биспецифическое антитело по п.13, которое содержит линкер и второй антиген-связывающий сайт с SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

15. Конъюгат биспецифического антитела по п.12 и терапевтического средства.

16. Конъюгат биспецифического антитела по п.12 и диагностического средства.

17. Конъюгат по п.15 или п.16, где полипептид scFv является частью химерного антигенного рецептора.

18. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, которое специфически связывается с эпитопом, расположенным в FG-петле в V-доме белка 2Ig-B7H3 и в доменах V1 и V2 белка 4Ig-B7H3 со значением K_D ниже 2 нМ.

19. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.18, которое подавляет ингибирующий эффект B7H3 в отношении одного из следующего:

- a) пролиферации Т-клеток;
- b) функции Т-клеток;
- c) активности NK-клеток; и
- d) функции NK-клеток.

20. Фармацевтическая композиция для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, содержащая эффективное количество антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-4 или 18-19, конъюгата по любому из пп.5-8 или 15-17, биспецифического антитела по любому из пп.9-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ лечения рака, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-4 или 18-19, конъюгата по любому из пп.5-8 или 15-17, биспецифического антитела по любому из пп.9-14, где указанный рак содержит B7H3-позитивные опухолевые клетки.

22. Способ модуляции иммунной системы, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-4 или 18-19, конъюгата по любому из пп.5-8 или 15-17, биспецифического антитела по любому из пп.9-14.

23. Способ лечения рака, включающий стадию введения индивиду фармацевтической композиции по п.20, где указанный рак содержит B7H3-позитивные опухолевые клетки.

24. Способ по п.23, где рак представляет собой (a) нейробластому или (b) рак шейки матки.

25. Способ по любому из пп.21-24, где пациент выбран из человека, собаки, кошки, шимпанзе, орангутанга, гиббона, макаки, игрунка, свиньи, лошади, панды и слона.

26. Способ усиления Т-клеточной цитотоксичности у пациента, включающий стадию введения пациенту композиции, содержащей эффективное количество антитела или его антиген-связывающего фрагмента по п.1.

27. Способ по п.26, в котором антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 13 или 15 и легкую цепь с SEQ ID NO: 5 или 7.

28. ДНК, кодирующая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-4 или 18-19.

29. Клетка для экспрессии антитела или его антиген-связывающего фрагмента для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, которая содержит ДНК или РНК, кодирующие антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-4 или 18-19, где клетка представляет собой одну или несколько следующих клеток:

- (a) иммунную клетку;
- (b) антиген-презентирующую клетку и
- (c) Т-клетку.

30. Способ получения клетки, экспрессирующей антитело или его антиген-связывающий фрагмент для специфического связывания с белком 2Ig-B7H3 или 4Ig-B7H3, включающий трансфекцию или трансдукцию с помощью вируса клетки ДНК или РНК, кодирующей антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-4 или 18-19.

31. Способ по п.30, в котором клетку трансдуцируют с помощью вируса в организм пациента.

32. Способ лечения рака у пациента, включающий введение клетки по п.29 пациенту, где указанный рак содержит B7H3-позитивные опухолевые клетки.

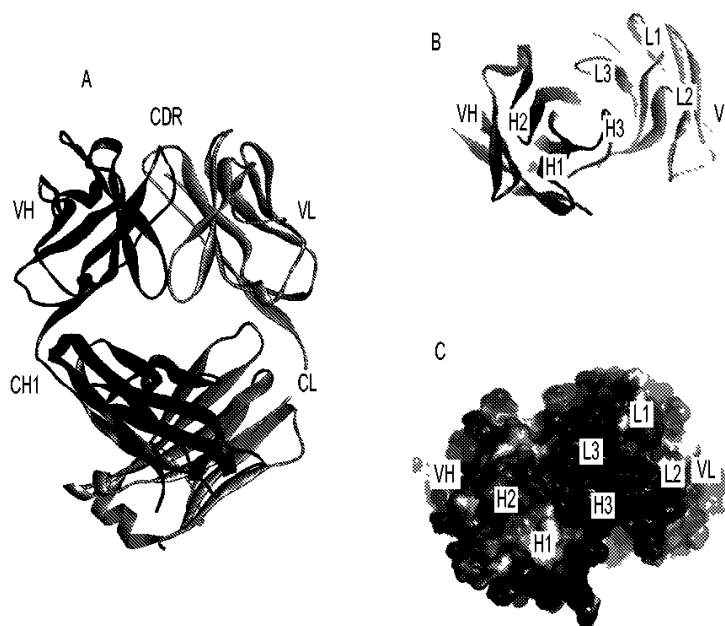
33. Способ лечения рака у пациента, включающий введение вируса, содержащего ДНК или РНК, кодирующую антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-4 или 8-19, где указанный рак содержит B7H3-позитивные опухолевые клетки.

34. Способ лечения рака у пациента с помощью компартментальной радиоиммунотерапии (сRit), включающий введение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-4 или 18-19, конъюгата по любому из пп.5-8 или 15-17, биспецифического антитела по любому из пп.9-14 пациенту, где указанный рак содержит B7H3-позитивные опухолевые клетки.

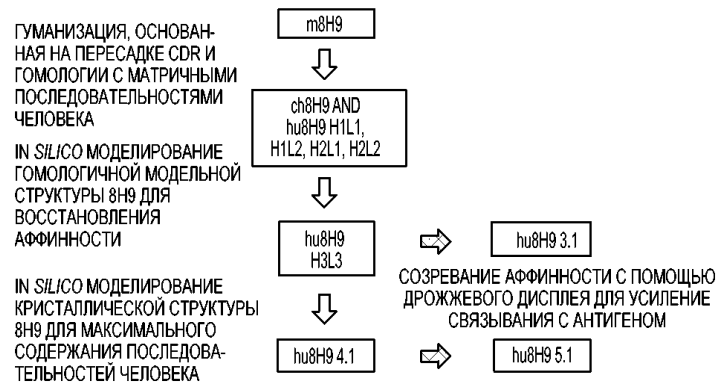
35. Способ по п.34, в котором антитело или его антиген-связывающий фрагмент вводят интраклеточно, внутривенно или путем конвекционно усиленной доставки.

36. Способ по любому из пп.32-35, где пациент выбран из человека, собаки, кошки, шимпанзе, орангутанга, гиббона, макаки, игрунка, свиньи, лошади, панды и слона.

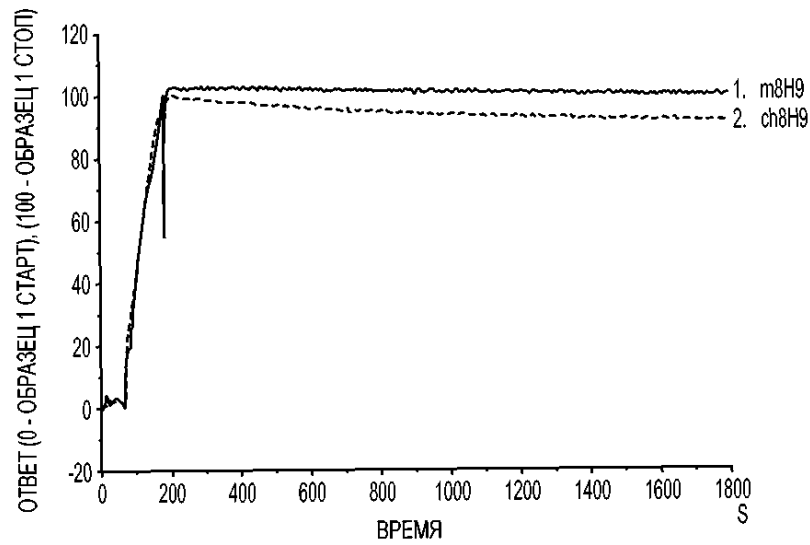
37. РНК, кодирующая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-4 или 18-19.



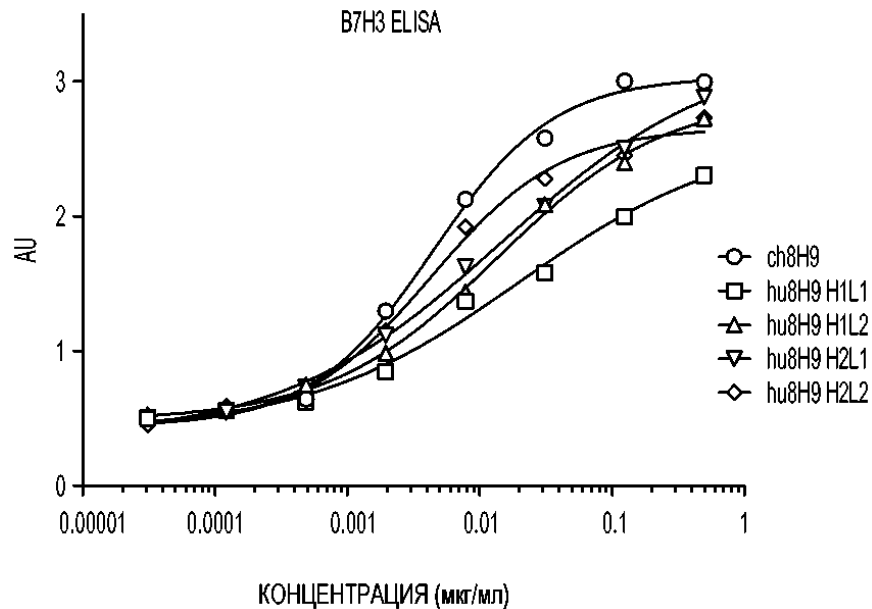
Фиг. 1



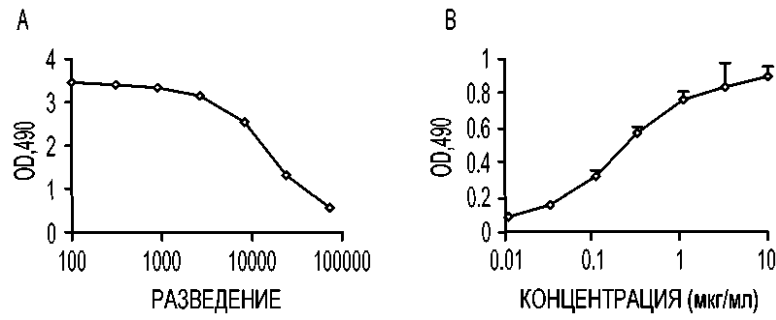
Фиг. 2



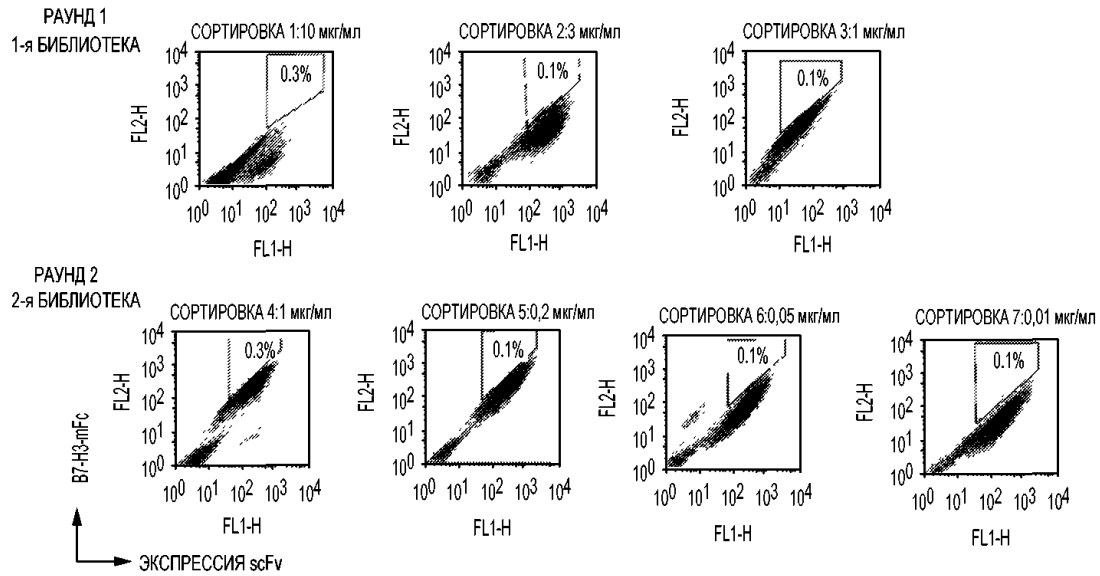
Фиг. 3



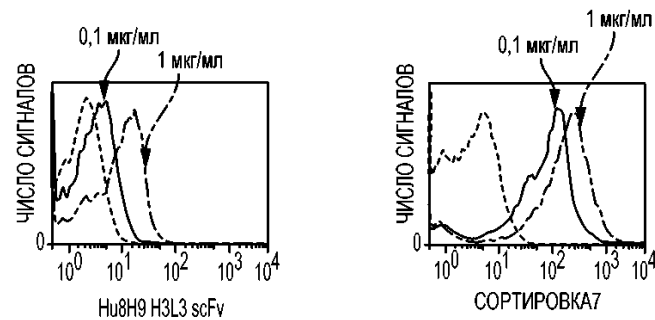
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

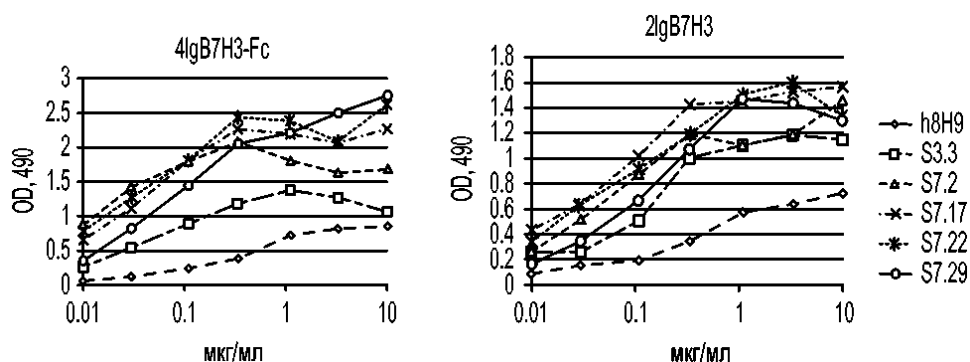


Фиг. 7

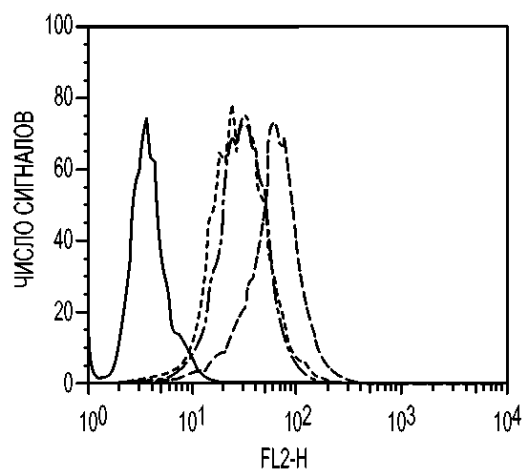
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
8H9 H3L3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASCTFTNYDINWVRQPEQGLEWIGWIFPGDGSRQYNEKFKGKATLTFTSTSTAYXELSSLRSEDTAVYFCARQT									
8H9S3.3			T.....	G.....						
8H9S7.2	..XX.....	X.....	T.....	G.....						
8H9S7.3	..X.....		T.....	G.....				L.....	G.....	
8H9S7.4	..X.....		T.....	G.....						
8H9S7.5			T.....	G.....					G.....	
8H9S7.6			T.....	G.....				L.....	G.....	
8H9S7.7	..X.....			A.....	G.....			G.....		
8H9S7.8	..X.X.....		T.....	G.....				L.....	G.....	
8H9S7.9			T.....	G.....					G.....	
8H9S7.17			T.....	G.....	V.....					
8H9S7.18			T.....	G.....				L.....	G.....	
8H9S7.19	..XXXX.....	XXX.....	T.....	G.....				L.....	G.....	
8H9S7.20	..XXX.....		T.....	G.....				L.....	G.....	
8H9S7.21	..XXX.....		T.....	G.....						
8H9S7.22	..XXX.....		T.....	G.....		D.....				
8H9S7.27	..X.X.....		T.....	G.....						
8H9S7.28	..X.....		T.....	G.....					G.....	
8H9S7.29	..X.X.....		T.....	G.....				L.....	G.....	

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
8H9	TATWFAYWCGGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQISDKLHWYQOKSJESPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGS									
8H9S3.3					T.....			Y.....		
8H9S7.2			V.....		T.....		G.....	Y.....		
8H9S7.3	..G.....				T.....			Y.....		
8H9S7.4			V.....		T.....		G.....	Y.....		
8H9S7.5					T.....			Y.....		
8H9S7.6	..G.....				T.....			Y.....		
8H9S7.7		V.....		N.....	T.....			VY.....	P.....	
8H9S7.8	..G.....				T.....			Y.....		
8H9S7.9					T.....		P.....	Y.....		
8H9S7.17	..S.....				T.....		P.....	Y.....		
8H9S7.18	..G.....				T.....			Y.....		
8H9S7.19	..G.....				T.....			Y.....		
8H9S7.20	..G.....				T.....			Y.....	XX.....	
8H9S7.21			V.....		T.....		G.....	Y.....		
8H9S7.22	..G.....				T.....			Y.....		P.....
8H9S7.27					T.....			Y.....		
8H9S7.28			S.....		T.....		G.....	Y.....		
8H9S7.29	..G.....				T.....			Y.....		

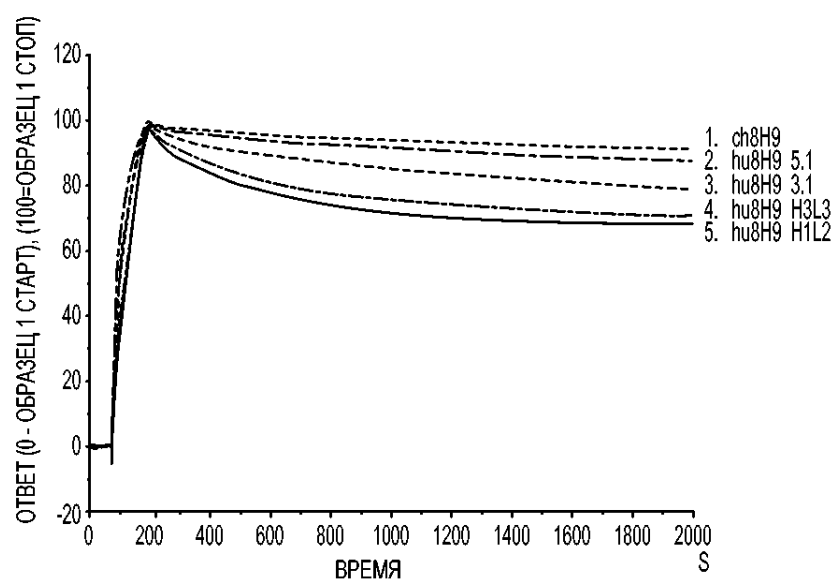
Фиг. 8



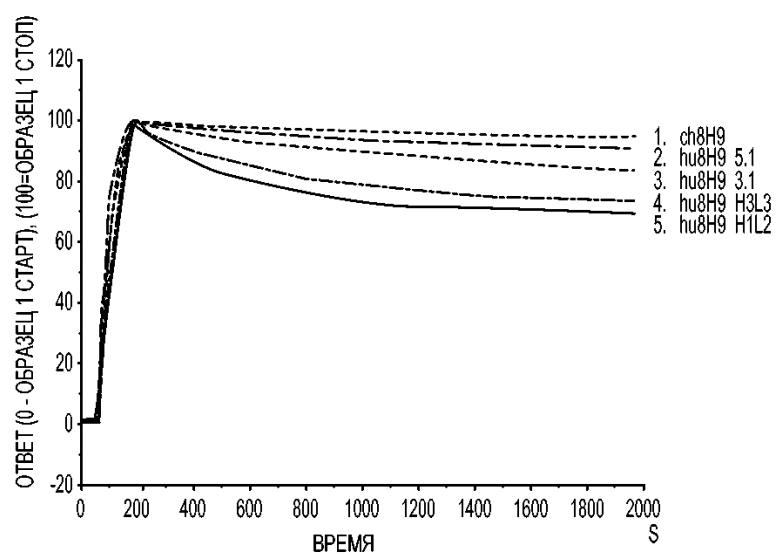
Фиг. 9



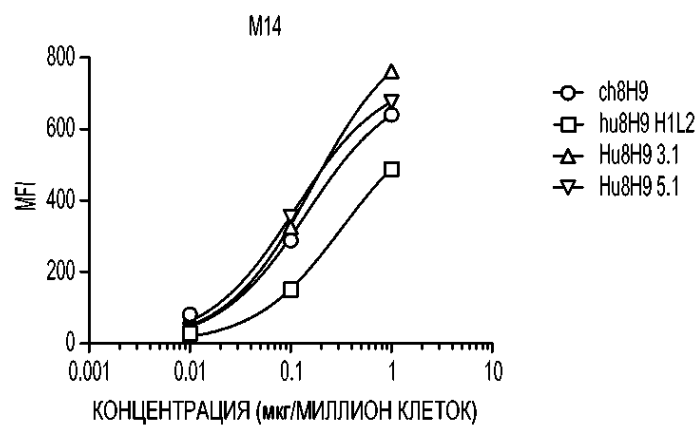
Фиг. 10



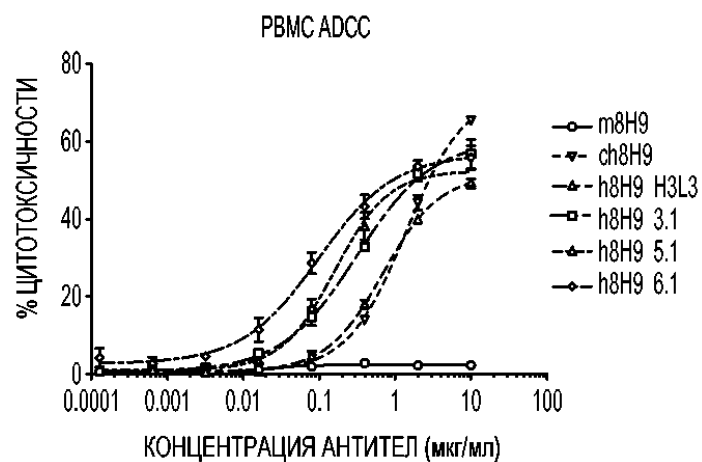
Фиг. 11



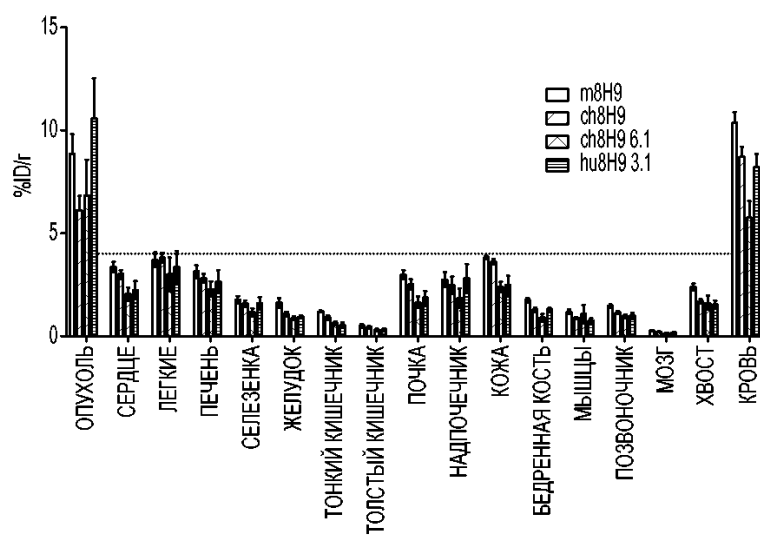
Фиг. 12



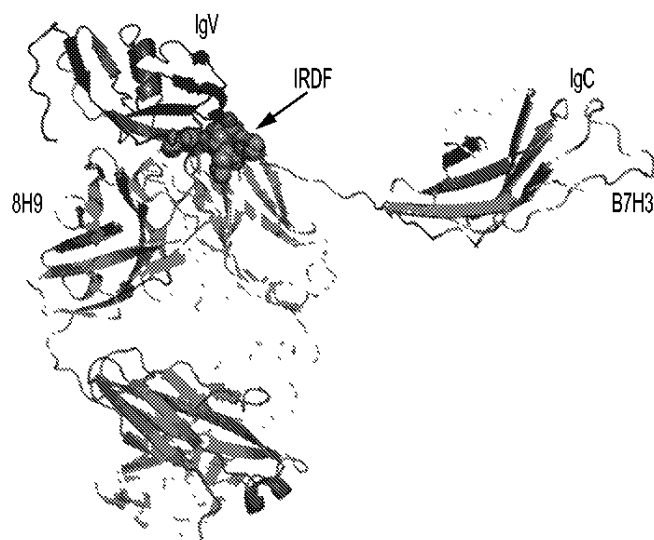
Фиг. 13



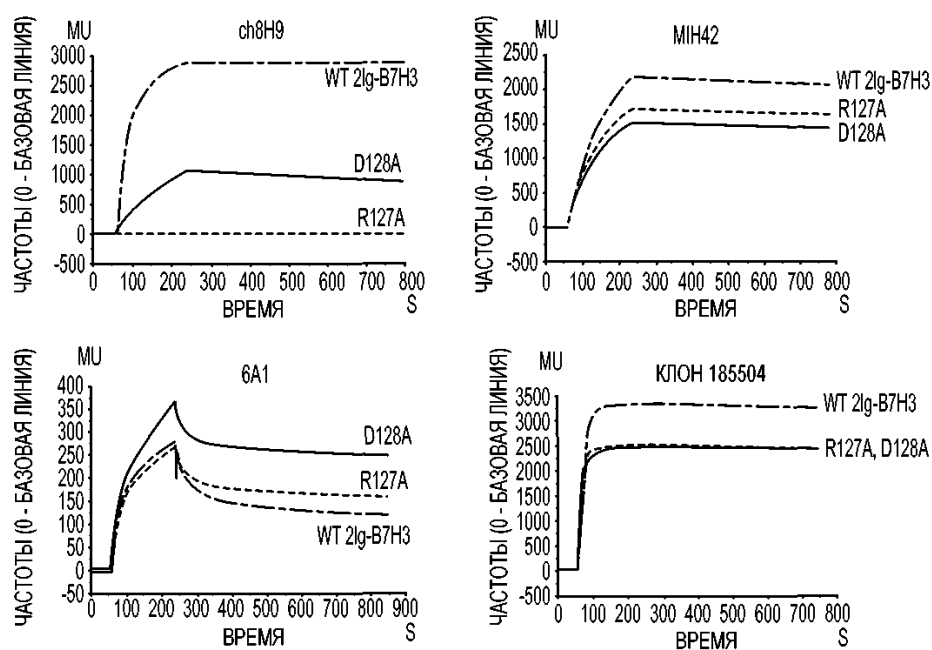
Фиг. 14



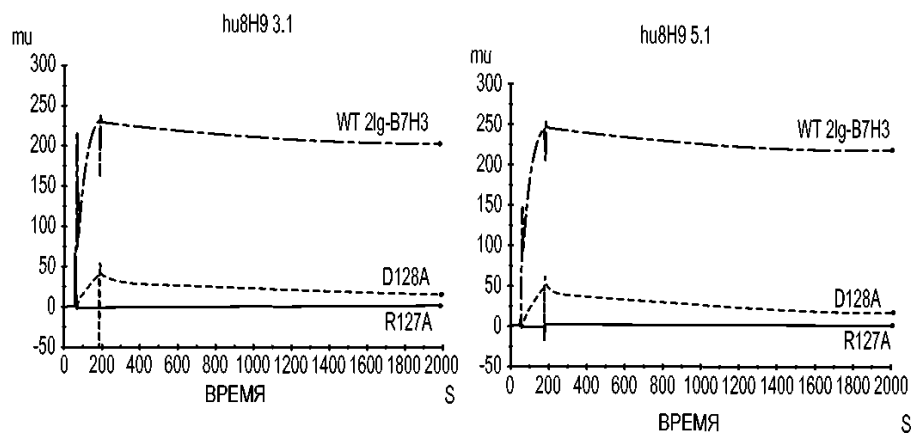
Фиг. 15



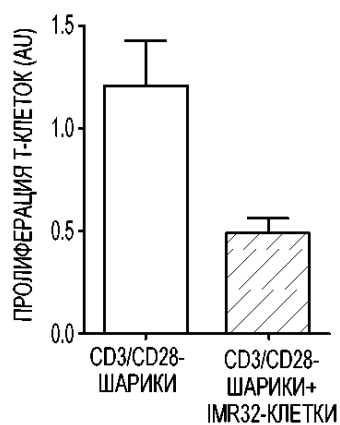
Фиг. 16



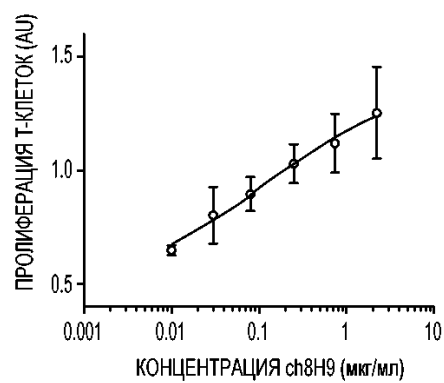
Фиг. 17



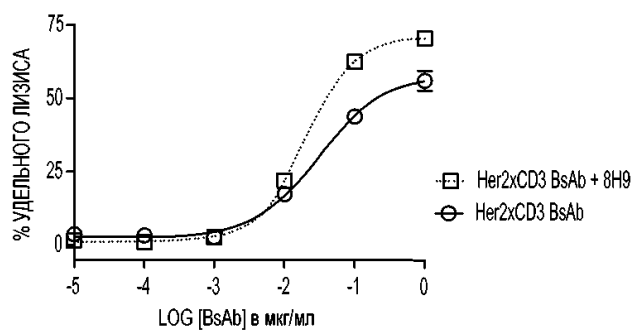
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

