



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109423** (13) **C2**

(51) МПК (2015.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2012 08022</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.11.2010</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.08.2015</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/265,262, 61/384,467</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.11.2009, 20.09.2010</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.09.2012, Бюл.№ 18</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2015, Бюл.№ 16</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2010/058197, 29.11.2010</p>	<p>(72) Винахідник(и): Денніс Марк (US), Полакис Пол (US), Рубінфелд Бонні (US)</p> <p>(73) Власник(и): ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009097128 A1, 06.08.2009 Kiyamova et al. Development of Monoclonal Antibodies Specific for the Human Sodium-dependent Phosphate Co-transporter NaPi2b HYBRIDOMA, 4.11.2008, Vol.27 №4, p. 277-284 Yin B. W. T. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas Cancer Immunity, 06.02.2008, Vol. 8, p. 1-9 Kiyamova R. G. et al. Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach, Біополімери і клітина, 2008, Т. 24 №3, с. 218 - 224</p>
--	--

(54) КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ І ЛІКУВАННЯ ПУХЛИНИ

(57) Реферат:

Винахід належить до виділеного антитіла або його функціонального фрагмента, яке специфічно зв'язується з TAT211, кон'югату, що містить зазначене антитіло, композиції для застосування у діагностиці та лікуванні пухлин у ссавців.

UA 109423 C2

СПОΡΙДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка є непопередньою заявкою, поданою відповідно до 37 C.F.R. § 1.53(b)(1), і по ній заявляється пріоритет відповідно до 35 U.S.C. § 119(e) попередньої заявки США № 61/265262, поданої 30 листопада 2009 р., і попередньої заявки США № 61/384467, поданої 20 вересня 2010 р., зміст яких приведений в даному описі як посилання в повному об'ємі.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується композицій, які можуть використовуватися для діагностики і лікування пухлини у ссавців, і способів застосування цих композицій для тих же цілей.

ПОПЕРЕДНІЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Злоякісні пухлини (ракові захворювання) є другою ведучою причиною смерті в Сполучених Штатах, після захворювань серця (Boring et al., CA Cancel J. Clin. 43:7 (1993)). Рак характеризується збільшенням кількості патологічних або неопластичних клітин, що є похідними нормальної тканини, які проліферують з утворенням пухлинної маси, інвазією сусідніх тканин цими неопластичними пухлинними клітинами, і продукцією злоякісних клітин, які поступово поширюються через кров або лімфатичну систему до регіональних лімфатичних вузлів і до віддалених ділянок за допомогою процесу, що називається метастазуванням. При раковому стані, клітина проліферує в умовах, при яких нормальні клітини не змогли б рости. Рак існує в широкий різноманітності форм, які відрізняються різними ступенями інвазивності і агресивності.

У спробах виявити ефективні клітинні мішені для діагностики і терапії раку, дослідники знаходять шляхи для ідентифікації трансмембранних або інших зв'язаних з мембраною поліпептидів, які специфічно експресуються на поверхні одного або більше конкретних типів ракових клітин в порівнянні з однією або більше нормальних неракових клітин. Часто, такі мембранно-зв'язані поліпептиди більш широко експресуються на поверхні ракових клітин в порівнянні з поверхнею неракових клітин. Ідентифікація таких пухлино-зв'язаних антигенних поліпептидів клітинної поверхні забезпечує здатність специфічно мітити ракові клітини для руйнування за допомогою терапій, основаних на антитілах. У цьому відношенні, зазначається, що терапія на основі антитіл виявилася дуже ефективною при лікуванні деяких видів раків. Наприклад, HERCEPTIN® і RITUXAN® (обидва від Genentech Inc., South San Francisco, California) являють собою антитіла, які успішно використовувалися для лікування раку молочної залози неХоджкінської лімфоми, відповідно. Більш конкретно, HERCEPTIN® являє собою рекомбінантні ДНК-похідні гуманізовані моноклональні антитіла, які селективно зв'язуються з позаклітинним доменом прото-онкогена рецептора 2 фактор росту епідермісу (HER2) людини. Надекспресія білка HER2 спостерігається у 25-30 % з первинних раків молочної залози. RITUXAN® являє собою генно-інженерні химерні моноклональні антитіла миші/людини, направлені проти антигена CD20, виявленого на поверхні нормальних і малігнізованих В лімфоцитів. Обидва види цих антитіл рекомбінантно продукуються в клітинах CHO.

Незважаючи на вказані вище досягнення в терапії раку молочної залози, існує величезна потреба в додаткових діагностичних і терапевтичних засобах, здатних до виявлення присутності пухлини у ссавця і до ефективного інгібування зростання неопластичних клітин, відповідно. Відповідно, метою даного винаходу є ідентифікація клітинних мембранно-зв'язаних поліпептидів, які більш поширено експресуються у одного або більше типів ракових клітин в порівнянні з нормальними клітинами або у інших відмінних ракових клітин і застосування цих поліпептидів, і кодуючих їх нуклеїнових кислот, для отримання композицій речовин, застосовних в терапевтичному лікуванні і діагностичному виявленні раку у ссавців.

КОРОТКИЙ ЗМІСТ СУТІ ВІНАХОДУ

У даному описі заявники уперше описують ідентифікацію клітинних поліпептидів (і кодуючих їх нуклеїнових кислот або їх фрагментів), які експресуються в більшій мірі на поверхні одного або більше типів ракових клітин в порівнянні з поверхнею одного або більше типів нормальних неракових клітин. Ці поліпептиди в даному описі називаються пухлино-зв'язаними антигенними поліпептидами-мішенями ("поліпептидами ТАТ") і, передбачається, що вони можуть служити як ефективні мішені для лікування і діагностики раку ссавців.

Відповідно, в одному з варіантів здійснення даного винаходу, винахід стосується виділеної молекули нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність, яка кодує пухлино-зв'язаний антиген поліпептид-мішень або його фрагмент ("поліпептид ТАТ").

У деяких аспектах, виділена молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична послідовності нуклеїнової кислоти, альтернативно щонайменше приблизно на 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовності нуклеїнової кислоти, по відношенню до (а) молекули ДНК, що кодує непроцесований поліпептид ТАТ, що має амінокислотну послідовність, як описано в даній

заявці, амінокислотну послідовність поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, позаклітинний домен трансмембранного поліпептиду ТАТ, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, або будь-який інший конкретно визначений фрагмент амінокислотної послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, або (b) комплемент молекули ДНК (а).

У інших аспектах, виділена молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична послідовності нуклеїнової кислоти, альтернативно щонайменше приблизно на 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична послідовності нуклеїнової кислоти по відношенню до (а) молекули ДНК, що містить кодуючу послідовність кДНК непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, кодуючу послідовність поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, кодуючу послідовність позаклітинного домену трансмембранного поліпептиду ТАТ, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, або кодуючу послідовність будь-якого іншого конкретно визначеного фрагмента амінокислотної послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, або (b) комплемент молекули ДНК (а).

У ще одному з аспектів винахід стосується виділеної молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид ТАТ, який має або делецію трансмембранного домену, або інактивацію трансмембранного домену, або є комплементарною такій кодуючій нуклеотидній послідовності, де трансмембранні домен(и) таких поліпептидів описані в даній заявці. Отже, розглядаються розчинні позаклітинні домени описаних в даній заявці поліпептидів ТАТ.

У інших аспектах даний винахід стосується виділених молекул нуклеїнових кислот, які гібридизуються з (а) нуклеотидною послідовністю, яка кодує поліпептид ТАТ, що має непроцесовану амінокислотну послідовність, як описано в даній заявці, амінокислотну послідовність поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, позаклітинний домен трансмембранного поліпептиду ТАТ, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, або будь-який інший конкретно визначений фрагмент амінокислотної послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, або (b) комплемент нуклеотидної послідовності (а). У цьому відношенні в одному з варіантів здійснення даний винахід стосується послідовності, яка кодує фрагменти непроцесованого поліпептиду ТАТ, або його комплементу, як описано в даній заявці, що може знайти застосування як, наприклад, зонди гібридизації, що використовуються як, наприклад, діагностичні зонди, праймери ПЛР, антисмислові олігонуклеотидні зонди, або для кодування фрагментів непроцесованого поліпептиду ТАТ, які можуть необов'язково кодувати поліпептид, що містить ділянку зв'язування для антитіла проти поліпептиду ТАТ. Такі фрагменти нуклеїнової кислоти мають звичайно щонайменше приблизно 5 нуклеотидів по довжині, альтернативно щонайменше приблизно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 або 1000 нуклеотидів по довжині, де в даному контексті термін "приблизно" означає довжину нуклеотидної послідовності, що вказується плюс або мінус 10 % від цієї вказаної довжини. Крім того, такі фрагменти нуклеїнової кислоти звичайно складаються з послідовних нуклеотидів, похідних від послідовності, яка кодує непроцесований поліпептид ТАТ або його комплемент. Зазначають, що нові фрагменти нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид ТАТ або його комплемент, можуть бути визначені рутинним чином за допомогою вирівнювання нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид ТАТ з іншими відомими нуклеотидними послідовностями з використанням будь-якої з ряду добре відомих програм вирівнювання послідовностей і визначення того, які фрагмент(и) нуклеотидної послідовності, що кодують поліпептид ТАТ, або його комплемент, є новими. Всі з таких фрагментів нуклеотидних послідовностей, які кодують поліпептид ТАТ, або їх комплемент, розглядаються в цьому документі. Також розглядаються фрагменти поліпептиду ТАТ, що кодуються цими нуклеотидними фрагментами молекули, переважно, такі фрагменти поліпептиду ТАТ, які містять ділянку зв'язування для антитіла проти ТАТ.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується виділених поліпептидів ТАТ, які кодуються будь-якою з послідовностей виділеної нуклеїнової кислоти, ідентифікованих в даній заявці вище.

У певному аспекті винахід стосується виділеного поліпептиду ТАТ, що містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична амінокислотній послідовності, альтернативно щонайменше приблизно 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, по відношенню до поліпептиду ТАТ, що має непроцесовану амінокислотну послідовність, як описано в даній заявці, амінокислотній послідовності поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, позаклітинному домену трансмембранного поліпептидного ТАТ білка, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, амінокислотній послідовності, що кодується будь-якою з послідовностей нуклеїнової кислоти, описаної в даній заявці, або будь-якого іншого конкретно визначеного фрагмента амінокислотної послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці.

У іншому додатковому аспекті, винахід стосується виділеного поліпептиду ТАТ, що містить амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується з комплементом молекули ДНК, що кодує (а) поліпептид ТАТ, що має непроцесовану амінокислотну послідовність, як описано в даній заявці, (b) амінокислотну послідовність поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, (c) позаклітинний домен трансмембранного поліпептидного ТАТ білка, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, (d) амінокислотну послідовність, що кодується будь-якою з послідовностей нуклеїнової кислоти, розкритих в даній заявці, або (e) будь-який інший конкретно визначений фрагмент амінокислотної послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці.

У конкретному аспекті винахід стосується виділеного поліпептиду ТАТ без N-кінцевої сигнальної послідовності і/або без ініціюючого метіоніну, і який кодується нуклеотидною послідовністю, яка кодує таку амінокислотну послідовність, як описано в даній заявці вище. Способи для їх отримання також описані в даній заявці, де способи включають культивування клітини-хазяя, що містить вектор, який містить відповідну кодуючу молекулу нуклеїнової кислоти при умовах, відповідних для експресії поліпептиду ТАТ і виділення поліпептиду ТАТ з клітинної культури.

У іншому аспекті винахід стосується виділеного поліпептиду ТАТ, який має або делецію трансмембранного домену, або інактивацію трансмембранного домену. Способи для їх отримання також описані в даній заявці, де ці способи включають культивування клітини-хазяя, що містить вектор, який містить відповідну кодуючу молекулу нуклеїнової кислоти при умовах, відповідних для експресії поліпептиду ТАТ і виділення поліпептиду ТАТ з клітинної культури.

У інших варіантах здійснення даного винаходу винахід стосується векторів, які містять ДНК, які кодують будь-які з описаних в даній заявці поліпептидів. Також винахід стосується клітин-хазяїв, що містять будь-який такий вектор. За допомогою прикладу, клітини-хазяї можуть являти собою СНО клітини, Е. солі клітини або дріжджові клітини. Додатково наданий спосіб отримання будь-яких описаних в даній заявці поліпептидів, який включає культивування клітин-хазяїв при умовах, відповідних для експресії бажаного поліпептиду і виділення бажаного поліпептиду з клітинної культури.

У інших варіантах здійснення винахід стосується виділених химерних поліпептидів, які містять будь-який з описаних поліпептидів ТАТ, рекомбінованих з гетерологічним (не-ТАТ) поліпептидом. Приклади таких химерних молекул містять будь-який з описаних в даній заявці поліпептидів ТАТ, рекомбінованих з гетерологічним поліпептидом, таким як, наприклад, послідовність епітопної мітки або Fc-область імуноглобуліну.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язується, переважно, конкретно, з будь-яким з вказаних вище або описаних нижче поліпептидів. Необов'язково, антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло, антитіло з єдиним ланцюгом або антитіло, яке конкурентно інгібує зв'язування антитіла проти поліпептиду ТАТ з його відповідним антигенним епітопом. Антитіла за даним винаходом можуть необов'язково бути кон'юговані з агентом, який інгібує ріст, або цитотоксичним агентом, таким як токсин, що включає, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент або т. п. Антитіла за даним винаходом можуть необов'язково продукуватися в СНО клітинах або бактерійних клітинах і, переважно, інгібують ріст або проліферацію або індують смерть клітини, з якою вони зв'язуються. Для діагностичних цілей, антитіла за даним винаходом можуть бути помічені для виявлення, приєднані до твердого носія, або т. п.

У інших варіантах здійснення даного винаходу винахід стосується векторів, які містять ДНК, які кодують будь-яке з описаних в даній заявці антитіл. Також винахід стосується клітин-хазяїв,

що містять будь-який такий вектор. Як приклад, клітини-хазяї можуть являти собою СНО клітини, клітини E. coli або дріжджові клітини. Додатково, винахід стосується способу отримання будь-якого з описаних в даній заявці антитіл, який включає культивування клітин-хазяїв при умовах, відповідних для експресії бажаного антитіла і виділення бажаного антитіла з клітинної культури.

У іншому додатковому варіанті здійснення винахід стосується композиції, що містить поліпептид ТАТ, як описано в даній заявці, химерний поліпептид ТАТ, як описано в даній заявці, або антитіло проти ТАТ, як описано в даній заявці, в комбінації з носієм. Необов'язково, носій являє собою фармацевтично прийнятний носій.

У ще одному іншому варіанті здійснення винахід стосується виробу, що містить контейнер і композицію речовин, що міститься всередині контейнера, де композиція речовин може містити поліпептид ТАТ, як описано в даній заявці, химерний поліпептид ТАТ, як описано в даній заявці, або антитіло проти ТАТ, як описано в даній заявці. Виріб може додатково необов'язково містити етикетку, прикріплену до контейнера, або листок-вкладиш, включений в контейнер, який стосується застосування композиції речовин для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення пухлини.

У іншому варіанті здійснення даний винахід стосується застосування поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, химерного поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, або антитіла проти поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, для отримання лікарського засобу, що використовується для лікування стану, який є сприйнятливим до поліпептиду ТАТ, химерного поліпептиду ТАТ, або антитіла проти поліпептиду ТАТ.

Інші варіанти здійснення даного винаходу стосуються будь-якого виділеного антитіла, що містить одну або більше з послідовностей CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 або CDR-H3, розкритих в даній заявці, або будь-яке антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом як будь-яке таке антитіло.

У іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу інгібування росту клітини, яка експресує поліпептид ТАТ, де спосіб передбачає приведення в контакт клітини з антитілом, яке зв'язується з поліпептидом ТАТ, і, де зв'язування антитіла з поліпептидом ТАТ викликає інгібування росту клітини, яка експресує поліпептид ТАТ. У переважних варіантах здійснення клітина являє собою ракову клітину, і зв'язування антитіла з поліпептидом ТАТ викликає смерть клітини, яка експресує поліпептид ТАТ. Необов'язково, антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло або антитіло з єдиним ланцюгом. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково бути кон'юговані з агентом, який інгібує ріст, або цитотоксичним агентом, таким як токсин, що включає, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент, або т. п. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково продукуватися в СНО клітинах або бактерійних клітинах.

У іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу терапевтичного лікування ссавця, що має ракову пухлину, що містить клітини, які експресують поліпептид ТАТ, де спосіб включає введення ссавцеві терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з поліпептидом ТАТ, за допомогою чого приводячи в результаті до ефективного терапевтичного лікування пухлини. Необов'язково, антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло або антитіло з єдиним ланцюгом. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково бути кон'юговані з агентом, який інгібує ріст, або цитотоксичним агентом, таким як токсин, що включає, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент, або т. п. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково продукуватися в СНО клітинах або бактерійних клітинах.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується способу визначення присутності поліпептиду ТАТ в зразку, що підозрюється на вміст поліпептиду ТАТ, де спосіб включає вплив зразка на антитіло, яке зв'язується з поліпептидом ТАТ, і визначення зв'язування антитіла з поліпептидом ТАТ в зразку, де присутність такого зв'язування вказує на присутність поліпептиду ТАТ в зразку. Необов'язково, зразок може містити клітини (які можуть бути раковими клітинами), в яких передбачають експресію поліпептиду ТАТ. Антитіло, що використовується в способі, може необов'язково бути міченим для виявлення, приєднане до твердого носія, або т. п.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу стосується способу діагностики присутності пухлини у ссавця, де спосіб включає виявлення рівня експресії гена, що кодує поліпептид ТАТ (а) в тестованому зразку клітин тканини, отриманих від вказаного ссавця, і (b) в контрольному зразку відомих нормальних неракових клітин такого ж тканинного походження або типу, де більш високий рівень експресії поліпептиду ТАТ в тестованому зразку, в порівнянні з

контрольним зразком, вказує на присутність пухлини у ссавця, від якого був отриманий тестований зразок.

У іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу діагностики присутності пухлини у ссавця, де спосіб передбачає (а) приведення в контакт тестованого зразка, що містить тканинні клітини, отримані від ссавця, з антитілом, яке зв'язується з поліпептидом ТАТ і (b) виявлення утворення комплексу між антитілом і поліпептидом ТАТ в тестованому зразку, де утворення комплексу вказує на присутність пухлини у ссавця. Необов'язково, використовуване антитіло є міченим для виявлення, приєднане до твердого носія, або т. п., і/або тестований зразок клітин тканини отримують від індивідуума, що підозрюється, як такий, що має ракову пухлину.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення, пов'язаного зі зміненою, переважно, збільшеною, експресією або активністю поліпептиду ТАТ, спосіб, що включає введення суб'єкту, потребуючому такого лікування, ефективної кількості антагоніста поліпептиду ТАТ. Переважно, клітинне проліферативне порушення є раком, а антагоніст поліпептиду ТАТ являє собою антитіло проти ТАТ поліпептиду або антисмисловий олігонуклеотид. Ефективне лікування або профілактика клітинного проліферативного порушення може бути результатом безпосереднього знищення або інгібування росту клітин, які експресують поліпептид ТАТ або за допомогою антагонізації клітинного росту, потенціюючої активність поліпептиду ТАТ.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу зв'язування антитіла з клітиною, яка експресує поліпептид ТАТ, де спосіб передбачає приведення в контакт клітини, яка експресує поліпептид ТАТ з вказаним антитілом при умовах, які є відповідними для зв'язування антитіла з вказаним поліпептидом ТАТ і забезпечення зв'язування між ними. У переважних варіантах здійснення, антитіло мітять молекулою або сполукою, які використовуються для якісного і/або кількісного визначення розташування і/або кількості зв'язування антитіла з клітиною.

Інші варіанти здійснення даного винаходу стосуються застосування поліпептиду ТАТ, нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид ТАТ, або вектора або клітини-хазяя, що містить цю нуклеїнову кислоту, або антитіла проти поліпептиду ТАТ при отриманні лікарського засобу, застосовного для (i) терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку або пухлини, або (ii) терапевтичного лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу інгібування росту ракової клітини, де ріст вказаної ракової клітини є щонайменше частково залежним від потенціюючих ріст ефекту(ів) поліпептиду ТАТ (де поліпептид ТАТ може експресуватися або самою раковою клітиною, або клітиною, яка продукує поліпептид(и), які мають потенціюючий ріст ефект на ракові клітини), де спосіб включає приведення в контакт поліпептиду ТАТ з антитілом, яке зв'язується з поліпептидом ТАТ, за допомогою чого антагонізуючи ріст-потенціюючу активність поліпептиду ТАТ і, в свою чергу, інгібуючи ріст ракової клітини. Переважно, ріст ракової клітини раку повністю інгібуються. Навіть більш переважно, зв'язування антитіла з поліпептидом ТАТ індукуює смерть ракової клітини. Необов'язково, антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло або антитіло з єдиним ланцюгом. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково бути кон'юговані з агентом, який інгібує ріст, або цитотоксичним агентом, таким як токсин, що включає, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент, або т. п. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково продукуватися в СНО клітинах або бактерійних клітинах.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу терапевтичного лікування пухлини у ссавця, де ріст вказаної пухлини є щонайменше частково залежним від ріст-потенціюючих ефекту(ів) поліпептиду ТАТ, де спосіб включає введення ссавцеві терапевтично ефективної кількості антитіла, який зв'язується з поліпептидом ТАТ, за допомогою чого антагонізуючи ріст-потенціюючу активність вказаного поліпептиду ТАТ і приводячи в результаті до ефективного терапевтичного лікування пухлини. Необов'язково, антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло або антитіло з єдиним ланцюгом. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково бути кон'юговані з агентом, який інгібує ріст, або цитотоксичним агентом, таким як токсин, що включає, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент, або т. п. Антитіла, що використовуються в способах даного винаходу, можуть необов'язково продукуватися в СНО клітинах або бактерійних клітинах.

У ще додаткових варіантах здійснення винахід стосується наступного набору потенційних пунктів формули винаходу для даної або майбутньої заявок:

1. Виділена нуклеїнова кислота, що має нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична послідовності нуклеїнової кислоти по відношенню до (a) молекули ДНК, яка кодує амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) молекулі ДНК, що кодує амінокислотну послідовність, показаній як SEQ ID NO:2, в якій відсутній його зв'язаний сигнальний пептид, (c) молекулі ДНК, що кодує позаклітинний домен поліпептиду, показаній як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) молекулі ДНК, що кодує позаклітинний домен поліпептиду, показаній як SEQ ID NO:2, в якій відсутній його зв'язаний сигнальний пептид, (e) нуклеотидної послідовності, показана як SEQ ID NO:1, (f) непроцесованій кодуючій послідовності нуклеотидної послідовності, показаній як SEQ ID NO:1, або (g) комплементу (a), (b), (c), (d), (e) або (f).

2. Виділена нуклеїнова кислота, що має (a) нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, в якій відсутній його зв'язаний сигнальний пептид, (c) нуклеотидну послідовність, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) нуклеотидну послідовність, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, в якому відсутній його зв'язаний сигнальний пептид, (e) нуклеотидну послідовність, показану як SEQ ID NO:1, (f) непроцесовану кодуючу область нуклеотидної послідовності, показану як SEQ ID NO:1, або (g) комплемент (a), (b), (c), (d), (e) або (f).

3. Виділена нуклеїнова кислота, яка гібридизується з (a) нуклеїновою кислотою, яка кодує амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) нуклеїновою кислотою, яка кодує амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) нуклеїновою кислотою, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) нуклеїновою кислотою, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, (f) непроцесованою кодуючою областю нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, або (g) комплементом (a), (b), (c), (d), (e) або (f).

4. Нуклеїнова кислота за п. 3, де гібридизація відбувається при суворих умовах.

5. Нуклеїнова кислота за п. 3, яка містить щонайменше приблизно 5 нуклеотидів по довжині.

6. Експресійний вектор, що містить нуклеїнову кислоту за п. 1, 2 або 3.

7. Експресійний вектор за п. 6, де вказана нуклеїнова кислота є функціонально зв'язаною з контрольними послідовностями, розпізнаваними клітиною-хазяєм, трансформованою вектором.

8. Клітина-хазяїн, яка містить експресійний вектор за п. 7.

9. Клітина-хазяїн за п. 8, яка являє собою CHO клітину, клітину E. coli або дріжджову клітину.

10. Спосіб продукування поліпептиду, що включає культивування клітини-хазяя за п. 8 при умовах, відповідних для експресії вказаного поліпептиду і виділення вказаного поліпептиду з клітинної культури.

11. Виділений поліпептид, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності по відношенню до (a) поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, (b) поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, в якому відсутній його зв'язаний сигнальний пептид, (c) позаклітинного домену поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинного домену поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, в якому відсутній його зв'язаний сигнальний пептид, (e) поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептиду, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

12. Виділений поліпептид, що має (a) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

13. Химерний поліпептид, що містить поліпептид за п. 11 або 12, рекомбінований з гетерологічним поліпептидом.

14. Химерний поліпептид за п. 13, де вказаний гетерологічний поліпептид являє собою послідовність епітопної мітки або Fc-область імуноглобуліну.

15. Виділене антитіло, яке зв'язується з поліпептидом, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності по відношенню до (a) поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, (b) поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинного домену поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинного домену поліпептиду, показаному як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептиду, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаної як SEQ ID NO:1.

16. Виділене антитіло, яке зв'язується з поліпептидом, що має (a) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

17. Антитіло за п. 15 або 16, яке являє собою моноклональне антитіло.

18. Антитіло за п. 15 або 16, яке являє собою фрагмент антитіла.

19. Антитіло за п. 15 або 16, яке являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

20. Антитіло за п. 15 або 16, яке є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

21. Антитіло за п. 15 або 16, яке є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

22. Антитіло за п. 21, де цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

23. Антитіло за п. 21, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

24. Антитіло за п. 23, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцин.

25. Антитіло за п. 23, де токсин являє собою майтансиноїд.

26. Антитіло за п. 15 або 16, яке продукується в бактеріях.

27. Антитіло за п. 15 або 16, яке продукується в CHO клітинах.

28. Антитіло за п. 15 або 16, яке індукуює смерть клітини, з якою воно зв'язується.

29. Антитіло за п. 15 або 16, яке мітять для виявлення.

30. Виділена нуклеїнова кислота, що має нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло за п. 15 або 16.

31. Експресійний вектор, що містить нуклеїнову кислоту за п. 30, функціонально зв'язану з контрольними послідовностями розпізнаваними клітинами-хазяями, трансформованими вектором.

32. Клітина-хазяїн, яка містить експресійний вектор за п. 31.

33. Клітина-хазяїн за п. 32, яка являє собою CHO клітину, клітину E. coli або дріжджову клітину.

34. Спосіб продукування антитіла, що включає культивування клітини-хазяя за п. 32 при умовах, відповідних для експресії вказаного антитіла і виділення вказаного антитіла з клітинної культури.

35. Композиція речовин, яка містить (a) поліпептид за п. 11, (b) поліпептид за п. 12, (c) химерний поліпептид за п. 13, (d) антитіло за п. 15 або (e) антитіло за п. 16 в комбінації з носієм.

36. Композиція речовин за п. 35, де вказаний носій являє собою фармацевтично прийнятний носій.

37. Виріб, що містить (a) контейнер; і (b) композицію речовин за п. 35, що міститься всередині вказаного контейнера.

38. Виріб за п. 37, що додатково містить етикетку, прикріплену до вказаного контейнера, або листок-вкладиш, включений з вказаним контейнером, що стосується застосування вказаної композиції речовин для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

39. Спосіб інгібування росту клітини, яка експресує білок, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним, як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його

зв'язаного сигнального пептиду, (е) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, вказаний спосіб, що включає приведення в контакт вказаної клітини з антитілом, яке зв'язується з вказаним білком, зв'язування вказаного антитіла з вказаним білком таким чином, викликаючи інгібування росту вказаної клітини.

40. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло являє собою моноклональне антитіло.

41. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло являє собою фрагмент антитіла.

42. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

43. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

44. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

45. Спосіб за п. 44, де вказаний цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

46. Спосіб за п. 44, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

47. Спосіб за п. 46, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.

48. Спосіб за п. 46, де токсин являє собою майтансиноїд.

49. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло продукується в бактеріях

50. Спосіб за п. 39, де вказане антитіло продукується в CHO клітинах.

51. Спосіб за п. 39, де вказана клітина являє собою ракову клітину.

52. Спосіб за п. 51, де вказана ракова клітина додатково піддається променевої терапії або впливу хімотерапевтичного агента.

53. Спосіб за п. 51, де вказану ракову клітину вибирають з групи, яка складається з клітини раку молочної залози, клітини колоректального раку, клітини раку легень, клітини раку яєчника, клітини раку центральної нервової системи, клітини раку печінки, клітини раку сечового міхура, клітини раку підшлункової залози, клітини раку шийки матки, клітини меланоми і лейкоїдної клітини.

54. Спосіб за п. 51, де вказаний білок в більшій мірі експресується вказаними раковими клітинами в порівнянні з нормальною клітиною такого ж тканинного походження.

55. Спосіб за п. 39, який викликає смерть вказаної клітини.

56. Спосіб за п. 39, де вказаний білок має (а) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (е) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

57. Спосіб терапевтичного лікування ссавця, що має ракову пухлину, яка містить клітини, які експресують білок, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (а) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаного як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (е) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1; або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, вказаний спосіб, що включає введення вказаному ссавцеві терапевтично ефективної кількості антитіла, який зв'язується з вказаним білком, за допомогою чого ефективно виліковуючи вказаний ссавця.

58. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло являє собою моноклональне антитіло.

59. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло являє собою фрагмент антитіла.

60. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

61. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

62. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

63. Спосіб за п. 62, де вказаний цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

64. Спосіб за п. 62, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

65. Спосіб за п. 64, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.

66. Спосіб за п. 64, де токсин являє собою майтансиноїд.

67. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло продукується в бактеріях.

68. Спосіб за п. 57, де вказане антитіло продукується в CHO клітинах.

69. Спосіб за п. 57, де вказана пухлина додатково піддається променевої терапії або впливу хіміотерапевтичного агента.

70. Спосіб за п. 57, де вказана пухлину являє собою пухлину молочної залози, колоректальну пухлину, пухлину легені, пухлину яєчника, пухлину центральної нервової системи, пухлину печінки, пухлину сечового міхура, пухлину підшлункової залози або пухлину шийки матки.

71. Спосіб за п. 57, де вказаний білок в більшій мірі експресується раковими клітинами вказаної пухлини в порівнянні з нормальною клітиною такого ж тканинного походження.

72. Спосіб за п. 57, де вказаний білок має (a) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

73. Спосіб визначення присутності білка в зразку, що підозрюється на вміст вказаного білка, де вказаний білок щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, вказаний спосіб, що включає піддавання вказаного зразка впливу антитіла, який зв'язується з вказаним білком, і визначення зв'язування вказаного антитіла з вказаним білком у вказаному зразку, де зв'язування антитіла з вказаним білком вказує на присутність вказаного білка у вказаному зразку.

74. Спосіб за п. 73, де вказаний зразок містить клітину, що підозрюється на експресію вказаного білка.

75. Спосіб за п. 74, де вказана клітина являє собою ракову клітину.

76. Спосіб за п. 73, де вказане антитіло є міченим для виявлення.

77. Спосіб за п. 73, де вказаний білок має (a) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

78. Спосіб діагностики присутності пухлини у ссавця, де вказаний спосіб включає визначення рівня експресії гена, що кодує білок, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, в тестованому зразку клітин тканини, отриманих від вказаного ссавця і в контрольному зразку відомих нормальних клітин такого ж тканинного походження, де більш високий рівень експресії вказаного білка в тестованому зразку, в порівнянні з контрольним зразком, вказує на присутність пухлини у ссавця, з якого був отриманий тестований зразок.

79. Спосіб за п. 78, де стадія визначення рівня експресії гена, що кодує вказаний білок, включає використання олігонуклеотиду при гібридизації in situ або аналізі методом РВ-ПЛР.

80. Спосіб за п. 78, де стадія визначення рівня експресії гена, що кодує вказаний білок, включає використання антитіла при імуногістохімії або аналізі методом вестерн-блотингу.

81. Спосіб за п. 78, де вказаний білок має (а) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

82. Спосіб діагностики присутності пухлини у ссавця, де вказаний спосіб включає приведення в контакт тестованого зразка клітин тканини, отриманих від вказаного ссавця з антитілом, яке зв'язується з білком, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, і виявлення утворення комплексу між вказаним антитілом і вказаним білком в тестованому зразку, де утворення комплексу вказує на присутність пухлини у вказаного ссавця.

83. Спосіб за п. 82, де вказане антитіло є міченим для виявлення.

84. Спосіб за п. 82, де вказаний тестований зразок клітин тканини отримують від індивідуума, що підозрюється на наявність ракової пухлини.

85. Спосіб за п. 82, де вказаний білок має (а) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

86. Спосіб лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення, пов'язаного із збільшеною експресією або активністю білка, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, вказаний спосіб, що включає введення суб'єкту, потребує такого лікування ефективної кількості антагоніста вказаного білка, за допомогою чого ефективно виліковуючи або запобігаючи вказаному клітинному проліферативному порушенню.

87. Спосіб за п. 86, де вказане клітинне проліферативне порушення являє собою рак.

88. Спосіб за п. 86, де вказаний антагоніст являє собою антитіло проти поліпептиду TAT або антисмисловий олігонуклеотид.

89. Спосіб зв'язування антитіла з клітиною, яка експресує білок, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, де вказаний спосіб включає приведення в контакт вказаної клітини з антитілом, яке зв'язується з вказаним білком і

забезпечує наявність зв'язування антитіла з вказаним білком, таким чином, зв'язуючи вказане антитіло з вказаною клітиною.

90. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло являє собою моноклональне антитіло.

91. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло являє собою фрагмент антитіла.

5 92. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

93. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

94. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

95. Спосіб за п. 94, де вказаний цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

10 96. Спосіб за п. 94, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

97. Спосіб за п. 96, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.

98. Спосіб за п. 96, де токсин являє собою майтансиноїд.

99. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло продукується в бактеріях.

15 100. Спосіб за п. 89, де вказане антитіло продукується в CHO клітинах.

101. Спосіб за п. 89, де вказана клітина являє собою ракову клітину.

102. Спосіб за п. 101, де вказана ракова клітина додатково піддається променевій терапії або впливу хімотерапевтичного агента.

20 103. Спосіб за п. 101, де вказану ракову клітину вибирають з групи, яка складається з клітини раку молочної залози, клітини колоректального раку, клітини раку легень, клітини раку яєчника, клітини раку центральної нервової системи, клітини раку печінки, клітини раку сечового міхура, клітини раку підшлункової залози, клітини раку шийки матки, клітини меланоми і лейкоемічної клітини.

25 104. Спосіб за п. 103, де вказаний білок в більшій мірі експресується вказаною раковою клітиною в порівнянні з нормальною клітиною такого ж тканинного походження.

105. Спосіб за п. 89, який викликає смерть вказаної клітини.

106. Застосування нуклеїнової кислоти, за будь-яким з пп. 1-5 або 30 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

30 107. Застосування нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-5 або 30 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

108. Застосування нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-5 або 30 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

109. Застосування експресійного вектора за будь-яким з пп. 6, 7 або 31 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

35 110. Застосування експресійного вектора за будь-яким з пп. 6, 7 або 31 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

111. Застосування експресійного вектора за будь-яким з пп. 6, 7 або 31 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

40 112. Застосування клітини-хазяя за будь-яким з пп. 8, 9, 32 або 33 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

113. Застосування клітини-хазяя за будь-яким з пп. 8, 9, 32 або 33 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

114. Застосування клітини-хазяя за будь-яким з пп. 8, 9, 32 або 33 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

45 115. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 11-14 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

116. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 11-14 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

50 117. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 11-14 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

118. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 15-29 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

119. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 15-29 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

55 120. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 15-29 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

121. Застосування композиції речовин за будь-яким з пп. 35 або 36 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

60 122. Застосування композиції речовин за будь-яким з пп. 35 або 36 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

123. Застосування композиції речовин за будь-яким з пп. 35 або 36 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

124. Застосування виробу за будь-яким з пп. 37 або 38 при отриманні лікарського засобу для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

5 125. Застосування виробу за будь-яким з пп. 37 або 38 при отриманні лікарського засобу для лікування пухлини.

126. Застосування виробу за будь-яким з пп. 37 або 38 при отриманні лікарського засобу для лікування або профілактики клітинного проліферативного порушення.

10 127. Спосіб інгібування росту клітини, де ріст вказаної клітини є щонайменше частково залежним від ріст-потенціюючого ефекту білка, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, де вказаний спосіб включає приведення в контакт вказаного білка з антитілом, яке зв'язується з вказаним білком, за допомогою чого інгібуючи ріст вказаної клітини.

20 128. Спосіб за п. 127, де вказана клітина являє собою ракову клітину.

129. Спосіб за п. 127, де вказаний білок експресується вказаною клітиною.

130. Спосіб за п. 127, де зв'язування вказаного антитіла з вказаним білком антагонізує клітинну ріст-потенціюючу активність вказаного білка.

25 131. Спосіб за п. 127, де зв'язування вказаного антитіла з вказаним білком індукує смерть вказаної клітини.

132. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло являє собою моноклональне антитіло.

133. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло являє собою фрагмент антитіла.

134. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

135. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

30 136. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

137. Спосіб за п. 136, де вказаний цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

138. Спосіб за п. 136, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

35 139. Спосіб за п. 138, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.

140. Спосіб за п. 138, де токсин являє собою майтансиноїд.

141. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло продукується в бактеріях.

142. Спосіб за п. 127, де вказане антитіло продукується в CHO клітинах.

40 143. Спосіб за п. 127, де вказаний білок має (a) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

50 144. Спосіб терапевтичного лікування пухлини у ссавця, де ріст вказаної пухлини є щонайменше частково залежним від ріст-потенціюючого ефекту білка, який щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотній послідовності з (a) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, (b) поліпептидом, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (c) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, з його зв'язаним сигнальним пептидом, (d) позаклітинним доменом поліпептиду, показаним як SEQ ID NO:2, без його зв'язаного сигнального пептиду, (e) поліпептидом, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) поліпептидом, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1, вказаний спосіб, що включає приведення в контакт вказаного білка з антитілом, яке зв'язується з вказаним білком, за допомогою чого ефективно виліковуючи вказану пухлину.

145. Спосіб за п. 144, де вказаний білок експресується клітинами вказаної пухлини.

146. Спосіб за п. 144, де зв'язування вказаного антитіла з вказаним білком антагонізує клітинну ріст-потенціюючу активність вказаного білка.

147. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло являє собою моноклональне антитіло.

148. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло являє собою фрагмент антитіла.

5 149. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

150. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

151. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

152. Спосіб за п. 151, де вказаний цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

10 153. Спосіб за п. 151, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

154. Спосіб за п. 153, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.

155. Спосіб за п. 153, де токсин являє собою майтансиноїд.

156. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло продукується в бактеріях.

15 157. Спосіб за п. 144, де вказане антитіло продукується в CHO клітинах.

158. Спосіб за п. 144, де вказаний білок має (a) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, (b) амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (c) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, з послідовністю його зв'язаного сигнального пептиду, (d) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, показану як SEQ ID NO:2, без послідовності його зв'язаного сигнального пептиду, (e) амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, показаною як SEQ ID NO:1, або (f) амінокислотну послідовність, що кодується кодуючою областю непроцесованої нуклеотидної послідовності, показаною як SEQ ID NO:1.

25 159. Виділене антитіло, яке зв'язується з таким же епітопом, зв'язаним з антитілом за будь-яким з пп. 15-29.

160. Антитіло за п. 159, яке являє собою моноклональне антитіло.

161. Антитіло за п. 159, яке являє собою фрагмент антитіла.

162. Антитіло за п. 159, яке являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

30 163. Антитіло за п. 159, яке є кон'югованим з агентом, який інгібує ріст.

164. Антитіло за п. 159, яке є кон'югованим з цитотоксичним агентом.

165. Антитіло за п. 164, де цитотоксичний агент вибирають з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.

166. Антитіло за п. 164, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

35 167. Антитіло за п. 166, де токсин вибирають з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.

168. Антитіло за п. 166, де токсин являє собою майтансиноїд.

169. Антитіло за п. 159, яке продукується в бактеріях.

170. Антитіло за п. 159, яке продукується в CHO клітинах.

40 171. Антитіло за п. 159, яке індукуює смерть клітини, з якою воно зв'язується.

172. Антитіло за п. 159, яке мітять для виявлення.

173. Антитіло за п. 159, яке містить щонайменше одну з областей визначення комплементарності будь-якого антитіла за пп. 15-29.

174. Клітина гібридоми, яка продукує моноклональне антитіло, яке зв'язується з поліпептидом TAT.

45 175. Спосіб ідентифікації антитіла, яке зв'язується з епітопом, зв'язаним з будь-яким антитілом за пп. 15-29, вказаний спосіб, що включає визначення здатності тестованого антитіла блокувати зв'язування будь-якого антитіла за пп. 15-29, де здатність вказаного тестованого антитіла блокувати зв'язування вказаного будь-якого антитіла за пп. 15-29 з поліпептидом TAT на щонайменше 40 % і при однакових концентраціях антитіла вказує на те, що вказане тестоване антитіло має здатність до зв'язування з епітопом, зв'язаним з вказаним будь-яким антитілом за пп. 15-29.

Ще додаткові варіанти здійснення даного винаходу будуть очевидними для кваліфікованого фахівця в даній галузі при прочитанні даного опису.

55 **КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ**

Фігура 1 показує нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO:1) кДНК TAT211, де SEQ ID NO:1 є клоном, позначеним в даній заявці як "ДНК219894".

Фігура 2 показує амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:2), що є похідною кодуючої послідовності SEQ ID NO:1, показаної на Фігурі 1.

Фігури 3А-С показують вирівнювання в лінійний ланцюг амінокислотних послідовностей варіабельних легких ланцюгів для наступних: консенсусна послідовність підгрупи I людини (huK1; SEQ ID NO:3) з легким ланцюгом, мишаче 10H1 антитіло проти TAT211 (mu10H1-L; SEQ ID NO:4), прищене "гуманізоване" антитіло 10H1 проти TAT211 (10H1-графт; SEQ ID NO:5), і різноманітні інші "гуманізовані" антитіла проти TAT211 (SEQ ID NO:6-11).

Фігури 4А-С показують вирівнювання в лінійний ланцюг амінокислотних послідовностей варіабельних важких ланцюгів для наступних: консенсусна послідовність підгрупи III людини з важким ланцюгом (hum III; SEQ ID NO:12), мишаче антитіло 10H1 проти TAT211 (mu10H1-H; SEQ ID NO:13), прищене "гуманізоване" антитіло 10H1 проти TAT211 (10H1-графт; SEQ ID NO:14), і різноманітні інші "гуманізовані" антитіла проти TAT211 (SEQ ID NO: 15-20).

Фігура 5 показує різноманітні CDR-L1 послідовності (SEQ ID NO:21-34) вибраних 10H1-похідних антитіл зі зрілою афінністю.

Фігура 6 показує різноманітні CDR-L2 послідовності (SEQ ID NO:35-38) вибраних 10H1-похідних антитіл зі зрілою афінністю.

Фігура 7 показує різноманітні CDR-L3 послідовності (SEQ ID NO:39-41) вибраних 10H1-похідних антитіл зі зрілою афінністю.

Фігура 8 показує різноманітні CDR-H1 послідовності (SEQ ID NO:42-45) вибраних 10H1-похідних антитіл зі зрілою афінністю.

Фігура 9 показує різноманітні CDR-H2 послідовності (SEQ ID NO:46-60) вибраних 10H1-похідних антитіл зі зрілою афінністю.

Фігура 10 показує різноманітні CDR-H3 послідовності (SEQ ID NO:61-65) вибраних 10H1-похідних антитіл зі зрілою афінністю.

Фігура 11 показує зразкові акцепторні консенсусні каркасні послідовності людини для застосування при практичній реалізації даного винаходу з наступними ідентифікаторами послідовностей: VH підгрупи I консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата (SEQ ID NO:66), VH підгрупи I консенсусна каркасна людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:67-69), VH підгрупи II консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата (SEQ ID NO:70), VH підгрупи II консенсусна каркасна людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:71-73), VH підгрупи III консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата "L-варіант" (SEQ ID NO:74), і VH підгрупи III консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата "F-варіант" (SEQ ID NO:75).

Фігура 12 показує зразкові акцепторні консенсусні каркасні послідовності людини для застосування при практичній реалізації даного винаходу з наступними ідентифікаторами послідовностей: VL каппа підгрупи I консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата (SEQ ID NO:76), VL каппа підгрупи II консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата (SEQ ID NO:77), VL каппа підгрупи III консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата (SEQ ID NO:78), і VL каппа підгрупи IV консенсусна каркасна людини мінус CDR Кабата (SEQ ID NO: 79).

Фігура 13 показує амінокислотну послідовність важкого ланцюга антитіла 10H1.1.4 В (SEQ ID NO:80).

Фігура 14 показує амінокислотну послідовність легкого ланцюга антитіла 10H1.1.4 В (SEQ ID NO:81).

Фігура 15 показує знищення *in vitro* клітин OVCAR-3 клітини (які ендогенно експресують поліпептид TAT211 на клітинній поверхні) за допомогою обробки наступними ADC вс-MMAE кон'югованими антитілами, 10H1.11 (◆), 10H1.11.1 (■), 10H1.11.2 В (▲), 10H1.11.4 В (●), 10H1.11.6 В (X), 10H1-графт (o), проти-людські gD (I), проти-аглютиніну пилка (□).

Фігура 16 показує знищення *in vitro* 293 клітин (які не експресують поліпептид TAT211 на клітинній поверхні) за допомогою обробки наступними ADC вс-MMAE кон'югованими антитілами, 10H1.11.4 В (●), або проти-людськими gD (I). Фігура 17 показує знищення *in vitro* 293/TAT211 клітин (які були створені методом генної інженерії для експресії поліпептиду TAT 211 на клітинній поверхні) за допомогою обробки наступними ADC вс-MMAE кон'югованими антитілами, 10H1.11.4 В (●), або проти-людськими gD (I).

Фігура 18 показує знищення *in vivo* пухлин OVCAR-3 в експерименті з жировим шаром мишачої молочної залози з наступними ADC вс-MMAE кон'югованими антитілами, тільки середовищем (□), 10H1.11 (◆), 10H1.11.1 (■), 10H1.11.2 В (▲), 10H1.11.4 В (●), 10H1.11.6 В (+), і 10H1-графт (o).

Фігура 19 показує знищення *in vivo* пухлин OVCAR-3 в експерименті з жировим шаром мишачої молочної залози з наступними ADC вс-MMAE кон'югованими антитілами, тільки середовищем (X), 10H1.11.4 В при 3 мг/кг (■), 10H1.11.4 В при 1 мг/кг (●), або неспецифічним проти-grp120 контрольним антитілом, яке не зв'язується з TAT211 (▲).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

I. Визначення

Терміни "поліпептид ТАТ" і "ТАТ", як використовують в даній заявці, і, коли відразу супроводжуються числовим позначенням, стосуються різноманітних поліпептидів, де повне позначення (тобто, ТАТ/номер) стосується конкретних поліпептидних послідовностей, як описано в даній заявці. Терміни "ТАТ/номер поліпептиду" і "ТАТ/номер" де термін "номер" наданий як дійсне числове позначення, як використовують в даній заявці, охоплює нативні послідовності поліпептидів, поліпептидні варіанти і фрагменти нативних послідовностей поліпептидів і поліпептидні варіанти (які далі визначаються в даній заявці). Поліпептиди ТАТ, описані в даній заявці, можуть бути виділені з різноманітних джерел, таких як з тканинних типів людини або з ще одного іншого джерела, або отримані за допомогою рекомбінантних або синтетичних способів. Термін "поліпептид ТАТ" стосується кожного індивідуального ТАТ/номер поліпептиду, розкритого в даній заявці. Всі розкриття в даному описі, які стосуються "поліпептиду ТАТ" стосуються кожного з поліпептидів індивідуально, а також спільно. Наприклад, описи їх отримання, очищення, отримання похідних, утворення антитіл до них або проти, утворення ТАТ-зв'язувальних олігопептидів до них або проти, утворення ТАТ-зв'язувальних органічних молекул до них або проти, їх введення, композицій, що містить їх, лікування захворювання з їх використанням, і т. д., стосуються кожного поліпептиду винаходу індивідуально. Термін "поліпептид ТАТ" також включає варіанти ТАТ/номер поліпептидів, розкритих в даній заявці. У одному варіанті здійснення, поліпептидна послідовність ТАТ211 показана як SEQ ID NO:2.

"Поліпептид ТАТ з нативною послідовністю" включає поліпептид, що має таку ж амінокислотну послідовність, як і відповідний поліпептид ТАТ, отриманий в природі. Такі поліпептиди ТАТ з нативною послідовністю можуть бути виділені з природних джерел або можуть бути продуковані за допомогою рекомбінантних або синтетичних засобів. Термін "поліпептид ТАТ з нативною послідовністю" конкретно охоплює процесовані або секретовані форми конкретного поліпептиду ТАТ, які зустрічаються в природі (наприклад, послідовності позаклітинного домену), варіантні форми, що зустрічаються в природі (наприклад, альтернативно сплайсовані форми) і алельні варіанти поліпептиду, що зустрічаються в природі. У певних варіантах здійснення винаходу, поліпептиди ТАТ з нативною послідовністю, описані в даній заявці, являють собою зрілі або непроцесовані (з повною довжиною) поліпептиди з нативною послідовністю, що містять амінокислотні послідовності з повною довжиною, показані на відповідних фігурах. Стартові і стоп-кодони (якщо вказані) показані жирним шрифтом і підкреслені на фігурах. Залишки нуклеїнової кислоти, вказані як "N" або "X" на відповідних фігурах, є будь-яким залишком нуклеїнової кислоти. Однак, в той час як показано, що поліпептиди ТАТ, розкриті на відповідних фігурах, починаються із залишків метіоніну, позначених в даній заявці як амінокислотне положення 1 на фігурах, є зрозумілим і можливим, що інші залишки метіоніну, розташовані або вгору у напрямку або вниз у напрямку від амінокислотного положення 1 на фігурах, можуть використовуватися як вихідний амінокислотний залишок для поліпептидів ТАТ.

"Позаклітинний домен" поліпептиду ТАТ або "ECD" стосується форми поліпептиду ТАТ, яка по суті не містить трансмембранних і цитоплазматичних доменів. Звичайно, ECD поліпептиду ТАТ буде складати менше ніж 1 % від таких трансмембранних і/або цитоплазматичних доменів і переважно, буде складати менше ніж 0,5 % від таких доменів. Буде зрозумілим, що будь-які трансмембранні домени, ідентифіковані для поліпептидів ТАТ даного винаходу, ідентифіковані відповідно до критеріїв, що традиційно використовуються в даній галузі для ідентифікації цього типу гідрофобного домену. Точні межі трансмембранного домену можуть змінюватися, але найбільш ймовірно на не більше ніж приблизно 5 амінокислот по обох кінцях домену, як спочатку ідентифіковано в даній заявці. Необов'язково, отже, позаклітинний домен поліпептиду ТАТ може містити від приблизно 5 або менше амінокислот по обох сторонах межі трансмембранного домену/позаклітинного домену, як ідентифіковано в Прикладах або описі, і такі поліпептиди, з зв'язаним сигнальним пептидом або без нього, і нуклеїнова кислота, що кодує їх, передбачена даним винаходом.

Приблизно розташування "сигнальних пептидів" різноманітних поліпептидів ТАТ, розкритих в даній заявці, може бути показане в даному описі і/або на відповідних фігурах. Відмічають, однак, що С-кінцева межа сигнального пептиду може змінюватися, але, найбільш ймовірно, не більше ніж на приблизно 5 амінокислот по обох сторонах С-кінцевої межі сигнального пептиду, як спочатку ідентифіковано в даній заявці, де С-кінцева межа сигнального пептиду може бути ідентифікований відповідно до критеріїв, що традиційно використовуються в даній галузі для ідентифікації цього типу елемента амінокислотної послідовності (наприклад, Nielsen et al., Prot. Eng. 10: 1-6 (1997) і von Heinje et al, Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Крім того, також

визнають, що, в деяких випадках, розщеплення сигнальної послідовності з секретованого поліпептиду не є повністю однорідним, приводячи в результаті до більше ніж одного секретованого виду. Ці зрілі поліпептиди, де сигнальний пептид розщеплюється в межах не більше ніж приблизно 5 амінокислот по обох сторонах С-кінцевої межі сигнального пептиду, як

5 ідентифіковано в даній заявці, і полінуклеотиди, що кодують їх, передбачені даним винаходом.
 "Варіант поліпептиду ТАТ" означає поліпептид ТАТ, переважно, активний поліпептид ТАТ, як визначено в даній заявці, що має щонайменше приблизно 80 % ідентичність амінокислотної послідовності з послідовністю поліпептиду ТАТ з непроцесованою нативною послідовністю, як описано в даній заявці, з послідовністю поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в
 10 даній заявці, позаклітинним доменом поліпептиду ТАТ, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, або будь-яким іншим фрагментом послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці (такі як кодовані нуклеїновою кислотою, яка представляє тільки частину повної кодуючої послідовності для поліпептиду ТАТ непроцесований). Такі варіанти поліпептидів ТАТ включають, наприклад, поліпептиди ТАТ, де
 15 додані або видалені (піддані делеції) один або більше амінокислотних залишків, по N- або С-кінцю нативної амінокислотної послідовності непроцесований. Звичайно, варіант поліпептиду ТАТ буде мати щонайменше приблизно 80 % ідентичність амінокислотної послідовності, альтернативно щонайменше приблизно 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %), 98 % або 99 % ідентичність амінокислотної
 20 послідовності, з нативною послідовністю непроцесованої послідовності поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці, з послідовністю поліпептиду ТАТ без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, позаклітинним доменом поліпептиду ТАТ, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, або будь-яким іншим конкретно визначеним фрагментом послідовності непроцесованого поліпептиду ТАТ, як описано в даній заявці. Звичайно, варіантні поліпептиди
 25 ТАТ складають щонайменше приблизно 10 амінокислот по довжині, альтернативно щонайменше приблизно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 амінокислот по довжині або більше. Необов'язково, варіантні поліпептиди ТАТ будуть
 30 мати не більше ніж одну консервативну заміну амінокислоти в порівнянні з послідовністю поліпептиду ТАТ, альтернативно не більше ніж 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 консервативних заміни амінокислот, в порівнянні з нативною послідовністю поліпептиду ТАТ.

"Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності" по відношенню до послідовностей поліпептиду ТАТ, ідентифікованого в даній заявці, визначають як процентний вміст амінокислотних залишків в кандидатній послідовності, які є ідентичними амінокислотним залишкам в конкретній послідовності поліпептиду ТАТ, після вирівнювання послідовностей і введення пропусків, якщо необхідно, для досягнення максимального процента ідентичності послідовності, і без урахування будь-яких консервативних заміни як частини ідентичності послідовності. Вирівнювання в лінію з метою визначення процента ідентичності амінокислотної
 40 послідовності може досягатися різноманітними шляхами, які знаходяться в межах об'єму кваліфікації в даній галузі, наприклад, з використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Кваліфіковані фахівці в даній галузі можуть визначити відповідні параметри для вимірювання вирівнювання в лінію, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для
 45 досягнення максимального вирівнювання в лінію протягом непроцесованих порівнюваних послідовностей. Для цілей даного винаходу в даній заявці, однак, значення % ідентичності амінокислотної послідовності генерують, використовуючи комп'ютерну програму порівняння послідовностей ALIGN-2, де повний вихідний текст для програми ALIGN-2 наданий в патенті США № 7160985, який включений в дану заявку за допомогою посилання. Комп'ютерна
 50 програма порівняння послідовностей ALIGN-2 має авторські права від Genentech, Inc. і її повний вихідний текст був поданий разом з документацією користувача в Бюро реєстрації авторських прав США, Вашингтон, D.C., 20559, де він зареєстрований під реєстраційним номером TXU510087. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною від Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, Каліфорнія, або може бути складена по повному вихідному тексту. Програма ALIGN-2 повинна бути складена для застосування з операційною системою UNIX, переважно, цифровою UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлені програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У ситуаціях, де ALIGN-2 використовують для порівнянь амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотної послідовності даної амінокислотної послідовності А по відношенню,
 60 з або проти даної амінокислотної послідовності В (яка може бути альтернативно

перефразована як дана амінокислотна послідовність A, яка має або містить певний % ідентичності амінокислотної послідовності по відношенню, з або проти даної амінокислотної послідовності B) розраховують таким чином:

100-кратна фракція X/Y ,

5 де X є числом амінокислотних залишків, що оцінюються як ідентичні збіги за допомогою програми вирівнювання в лінію послідовностей ALIGN-2 в цьому програмному вирівнюванні в лінію A і B, і, де Y є повним числом амінокислотних залишків в B. Слід враховувати, що там, де довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B, % ідентичності амінокислотної послідовності A з B не буде дорівнювати % ідентичності амінокислотної послідовності B з A.

10 "Полінуклеотид TAT варіанту" або "послідовність нуклеїнової кислоти TAT варіанту" означає молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид TAT, переважно, активний поліпептид TAT, як визначено в даній заявці, і, який має щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовності нуклеїнової кислоти з послідовністю нуклеотидної кислоти, що кодує послідовність
15 неprocесованого поліпептиду TAT з нативною послідовністю, як описано в даній заявці, послідовність неprocесованого поліпептиду TAT з нативною послідовністю без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, позаклітинний домен поліпептиду TAT, з сигнальним пептидом або без нього, як описано в даній заявці, або будь-який інший фрагмент послідовності неprocесованого поліпептиду TAT, як описано в даній заявці (такі як кодовані нуклеїною
20 кислотою, яка представляє тільки частину повної кодуєчої послідовності для неprocесованого поліпептиду TAT). Звичайно, полінуклеотид TAT варіанту буде мати щонайменше приблизно 80 % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти, альтернативно щонайменше приблизно 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти з послідовністю нуклеїнової
25 кислоти, що кодує послідовність неprocесованого поліпептиду TAT з нативною послідовністю, як описано в даній заявці, послідовність неprocесованого поліпептиду TAT з нативною послідовністю без сигнального пептиду, як описано в даній заявці, позаклітинний домен поліпептиду TAT, з сигнальною послідовністю або без неї, як описано в даній заявці, або будь-який інший фрагмент неprocесованої послідовності поліпептиду TAT, як описано в даній заявці.
30 Варіанти не охоплюють нативну нуклеотидну послідовність.

Звичайно, полінуклеотиди TAT варіантів складають щонайменше приблизно 5 нуклеотидів по довжині, альтернативно щонайменше приблизно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200,
35 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 або 1000 нуклеотидів по довжині, де в даному контексті термін "приблизно" означає довжину нуклеотидної послідовності, що порівнюється плюс або мінус 10 % від цієї порівнюваної довжини.
40

"Процент (%) ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти" по відношенню до TAT-кодуєчих послідовностей нуклеїнової кислоти, ідентифікованих в даній заявці, визначають як процентний вміст нуклеотидів в кандидатній послідовності, які є ідентичними нуклеотидам в послідовності TAT-нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, після вирівнювання послідовностей і введення пропусків, якщо необхідно, для досягнення максимального процента ідентичності послідовності. Вирівнювання в лінію з метою визначення процента ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти може досягатися різноманітними шляхами, які знаходяться в межах об'єму кваліфікації в даній галузі, наприклад, з використанням загальнодоступного
50 комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Для цілей даного винаходу в даній заявці, однак, значення % ідентичності амінокислотної послідовності генерують, використовуючи комп'ютерну програму порівняння послідовностей ALIGN-2, де повний вихідний текст для програми ALIGN-2 наданий в патенті США № 7160985, який включений в дану заяву за допомогою посилання. Комп'ютерна
55 програма порівняння послідовностей ALIGN-2 має авторські права від Genentech, Inc. і її повний вихідний текст був поданий разом з документацією користувача в Бюро реєстрації авторських прав США, Вашингтон, D.C., 20559, де він зареєстрований під реєстраційним номером TXU510087. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною від Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, Каліфорнія, або може бути складена по повному вихідному тексту. Програма ALIGN-2 повинна бути складена для застосування з операційною системою UNIX, переважно,
60

цифровою UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлені програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У ситуаціях, де ALIGN-2 використовують для порівнянь послідовності нуклеїнової кислоти, % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти даної послідовності нуклеїнової кислоти С по відношенню до, з або проти даної послідовності нуклеїнової кислоти D (яка альтернативно може бути перефразована як дана послідовність нуклеїнової кислоти С, яка має або містить певний % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти по відношенню до, з або проти даної послідовності нуклеїнової кислоти D) розраховують таким чином:

100-кратна фракція W/Z ,

де W є числом нуклеотидів, що оцінюються як ідентичні збіги за допомогою програми вирівнювання в лінію послідовностей ALIGN-2 в цьому програмному вирівнюванні в лінію С і D, і, де Z є загальним числом нуклеотидів в D. Слід враховувати, що там, де довжина послідовності нуклеїнової кислоти С не дорівнює довжині послідовності нуклеїнової кислоти D, % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти С з D не буде дорівнювати % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти D з С.

У інших варіантах здійснення, поліпептиди TAT варіанту являють собою молекули нуклеїнової кислоти, які кодують поліпептид TAT і які є здатними до гібридизації, переважно, при умовах суворої гібридизації і промивання, з нуклеотидними послідовностями, що кодують непроцесований поліпептид TAT, як описано в даній заявці. Поліпептиди TAT варіанту можуть бути поліпептидами, які кодуються поліпептидом TAT варіанту.

Термін "непроцесована кодуюча область", коли використовується по відношенню до нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид TAT, стосується послідовності нуклеотидів, яка кодує непроцесований поліпептид TAT винаходу (який часто показують між стартовими і стоп-кодонами, включаючи їх, на відповідних фігурах). Термін "непроцесована кодуюча область", коли використовується по відношенню до нуклеїнової кислоти, депонованої в ATCC, стосується поліпептид TAT-кодуючої частини кДНК, яку вводять у вектор, депонований разом з ATCC (який часто показують між стартовими і стоп-кодонами, включаючи їх, на відповідних фігурах).

"Виділений", коли використовують для опису різноманітних поліпептидів TAT, розкритих в даній заявці, означає поліпептид, який був ідентифікований і виділений і/або витягнутий з компонента його природного оточення. Забруднюючі компоненти його природного оточення являють собою речовини, які звичайно надають впливи при діагностичних або терапевтичних застосуваннях поліпептиду, і можуть включати ферменти, гормони, і інші білкові або небілкові розчинні речовини. У переважних варіантах здійснення, поліпептид буде очищений (1) до ступеня, достатнього для отримання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою застосування секвенатора з обертовою склянкою, або (2) до гомогенності за допомогою SDS-PAGE при невідновних або відновних умовах, використовуючи Кумассі синій або, переважно, срібний барвник. Виділений поліпептид включає поліпептид in situ в рекомбінантних клітинах, оскільки щонайменше один компонент природного оточення поліпептиду TAT не буде присутнім. Звичайно, однак, виділений поліпептид буде отриманий за допомогою щонайменше однієї стадії очищення.

"Виділена" поліпептид TAT-кодуюча нуклеїнова кислота або інша поліпептид-кодуюча нуклеїнова кислота являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яку ідентифікують і відділяють від щонайменше однієї контамінантної молекули нуклеїнової кислоти, з якою вона звичайно зв'язана в природному джерелі поліпептид-кодуючої нуклеїнової кислоти. Виділена поліпептид-кодуюча молекула нуклеїнової кислоти відрізняється за формою або характеристиками, з якими її виявляють в природі. Виділені поліпептид-кодуючі молекули нуклеїнової кислоти, отже, відрізняються від конкретної поліпептид-кодуючої молекули нуклеїнової кислоти, як вона існує в природних клітинах. Однак, виділена поліпептид-кодуюча молекула нуклеїнової кислоти включає поліпептид-кодуючу молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, яка звичайно експресує поліпептид, де, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти знаходиться в хромосомному розташуванні, відмінному від розташування в природних клітинах.

Термін "контрольні послідовності" стосується послідовностей ДНК, необхідних для експресії функціонально зв'язаної кодуючої послідовності в конкретному організмі-хазяї. Контрольні послідовності, які є придатними для прокаріотів, наприклад, включають промотор, необов'язково операторну послідовність, і ділянку зв'язування рибосоми. Відомо, що еукаріотичні клітини використовують промотори, сигнали поліаденілювання і енхансери.

Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною", коли її вміщують в функціональну взаємодію з ще однією іншою послідовністю нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК для препослідовності або секреторного лідера функціонально зв'язують з ДНК для поліпептиду, якщо він експресується як білок-попередник, який бере участь в секреції поліпептиду; промотор

або енхансер є функціонально зв'язаним з кодуючою послідовністю, якщо він надає вплив на транскрипцію послідовності; або ділянка зв'язування рибосоми є функціонально зв'язаною з кодуючою послідовністю, якщо вона розташована таким чином, щоб полегшити трансляцію. Загалом, "функціонально зв'язані" означає, що послідовності ДНК будучи зв'язаними є

5 перекривними, і, у разі секреторного лідера, перекривними і в фазі зчитування. Однак, енхансери не повинні бути перекривними. Зв'язування завершується лігуванням по зручних рестрикційних сайтах. Якщо такі сайти не існують, застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери відповідно до загальноприйнятої практики.

"Суворість" реакцій гібридизацій легко визначається рядовим фахівцем в даній галузі, і, як

10 правило, є емпіричним розрахунком, залежним від довжини зонда, температури промивання і концентрацій солі. Загалом, більш довгі зонди вимагають більш високих температур для потрібної ренатурації, в той час як більш короткі зонди потребують більш низьких температур. Гібридизація загалом залежить від здатності денатурованої ДНК до повторної ренатурації, коли комплементарні нитки присутні в оточенні нижче їх температури плавлення. Чим вищий ступінь

15 бажаної гомології між зондом і гібридизованою послідовністю, тим вища відносна температура, яка може застосовуватися. У результаті, виходить, що більш високі відносні температури будуть мати тенденцію зробити умови реакції більш суворими, в той час як більш низькі температури менш суворими. Для додаткових подробиць і пояснення суворості реакцій гібридизації, див. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Суворі умови" або "умови високої суворості", як визначено в даній заявці, можуть бути ідентифіковані як такі умови, при яких: (1) використовують низьку іонну силу і високу

20 температуру для промивання, наприклад 0,015 М хлорид натрію/0,0015 М цитрат натрію/0,1 % додецилсульфат натрію при 50 °C; (2) використовують у час гібридизації денатуруючий агент, такий як формамід, наприклад, 50 % (об./об.) формамід з 0,1 % альбумін бичачої сироватки/0,1 % Фіколл/0,1 % полівінілпіролідон/буфер 50 мМ фосфат натрію при pH 6,5 з 750

25 мМ хлоридом натрію, 75 мМ цитрат натрію при 42 °C; або (3) використовують гібридизацію протягом ночі в розчині, в якому використовують 50 % формамід, 5× SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрат натрію), 50 мМ фосфат натрію (pH 6,8), 0,1 % пірофосфат натрію, 5× розчин Денхардта, озвучену ультразвуком ДНК сперми лосося (50 мкг/мл), 0,1 % SDS, і 10 % декстрансульфату

30 при 42 °C, з 10 хвилинним промиванням при 42 °C в 0,2× SSC (хлорид натрію/цитрат натрію) з подальшим 10 хвилинним промиванням в суворих умовах, що складається з 0,1× SSC, що містить ЕДТА при 55 °C.

"Помірно суворі умови" можуть бути ідентифіковані, як описано у Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, і включають застосування

35 промивального розчину і умов гібридизації (наприклад, температури, іонної сили і % SDS) менш суворих, ніж умови, описані вище. Приклад помірно суворих умов являє собою інкубацію протягом ночі при 37 °C в розчині, що містить: 20 % формамід, 5× SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ цитрат тринатрію), 50 мМ фосфат натрію (pH 7,6), 5× розчин Денхардта, 10 % декстрансульфат, і 20 мкг/мл денатурованої деформованої ДНК сперми лосося, з подальшим промиванням

40 фільтрів в 1× SSC при приблизно 37-50 °C. Кваліфікований фахівець в даній галузі зможе зрозуміти, як регулювати температуру, іонну силу, і т. д. за потреби для акомодатії чинників, таких як довжина зонда і т.п.

Термін "маркований епітопом", коли використовують в даній заявці, стосується химерного поліпептиду, що містить поліпептид TAT або антитіло проти TAT, рекомбіноване з "маркерним

45 поліпептидом". Маркерний поліпептид має достатньо залишків, щоб надати епітоп, проти якого може бути отримане антитіло, все ще досить короткий, щоб не надавати впливу на активність поліпептиду, з яким він злитий. Маркерний поліпептид, переважно, також є цілком унікальним, таким чином, що антитіло по суті не реагує перехресно з іншими епітопами. Прийнятні маркерні поліпептиди, як правило, мають щонайменше шість амінокислотних залишків і звичайно між

50 приблизно 8 і 50 амінокислотними залишками (переважно, між приблизно 10 і 20 амінокислотними залишками).

"Активний" або "активність" для цілей даного винаходу стосується форми(формам) поліпептиду TAT, який зберігає біологічну і/або імунологічну активність нативного або який зустрічається в природі TAT, де "біологічна" активність стосується біологічної функції (або

55 інгібіторної або стимуляторної), що викликається нативним або яким зустрічається в природі TAT, відмінній від здатності індукувати продукування антитіл проти антигенного епітопа, який має нативний або що зустрічається в природі TAT, а "імунологічна" активність стосується здатності індукувати продукування антитіла проти антигенного епітопа, який має нативний або що зустрічається в природі TAT.

Термін "антагоніст" застосовують в найширшому значенні, і включає будь-яку молекулу, яка частково або повністю блокує, інгібує або нейтралізує біологічну активність нативного поліпептиду ТАТ, розкритого в даній заявці. Аналогічним чином, термін "агоніст" застосовують в найширшому значенні, і включає будь-яку молекулу, яка імітує біологічну активність нативного поліпептиду ТАТ, розкритого в даній заявці. Відповідні молекули агоніста або антагоніста конкретно включають агоністичне або антагоністичне антитіла або фрагменти антитіл, фрагменти або амінокислотну послідовність варіантів нативних поліпептидів ТАТ, пептиди, антисмислові олігонуклеотиди, малі органічні молекули, і т.д. Способи ідентифікації агоністів або антагоністів поліпептиду ТАТ можуть включати приведення в контакт поліпептиду ТАТ з кандидатною молекулою агоніста або антагоніста і вимірювання зміни, що виявляється, однієї або більше біологічних активностей, що звичайно асоціюються з поліпептидом ТАТ.

"Вилікування" або "лікування", або "пом'якшення" стосується як терапевтичного лікування, так і профілактичних або запобіжних засобів, де мета полягає в запобіганні або сповільненні (зниженні) цільового патологічного стану або порушення. Потребуючі лікування включають тих, які вже мають порушення, а також що мають схильність до захворювання або тих, у яких порушення повинно відвертатися. Суб'єкта або ссавця вважають успішно "вилікованими" від поліпептид ТАТ-експресуючого раку, після отримання терапевтичної кількості антитіла проти ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули відповідно до способів даного винаходу, пацієнт показує спостережуване і/або вимірюване зниження або відсутність одного або декількох з наступних: зниження кількості ракових клітин або відсутності ракових клітин; зниження розміру пухлини; інгібування (тобто, сповільнення в деякій мірі і, переважно, зупинки) інфільтрації ракових клітин до периферичних органів, що включає поширення раку в м'які тканини і кістки; інгібування (тобто, сповільнення в деякій мірі і, переважно, зупинки) пухлинних метастазів; інгібування, в деякій мірі, пухлинного росту; і/або пом'якшення в деякій мірі, одного або більше з симптомів, пов'язаних з конкретним раком; знижену захворюваність і смертність, і поліпшення якості життєвих показників. У тій мірі, в якій антитіло проти ТАТ або ТАТ-зв'язувальний олігопептид можуть запобігати росту і/або знищувати існуючі ракові клітини, вони можуть бути цитостатичними і/або цитотоксичними. Зниження цих ознак або симптомів можуть також відчуватися пацієнтом.

Вказані вище параметри для оцінки успішного лікування і поліпшення стану захворювання є легко вимірюваними за допомогою звичайних методик, відомих терапевту. Для лікування раку, ефективність може бути виміряна, наприклад, за допомогою оцінки часу до розвитку захворювання (TTP) і/або визначення ступеня відгуку (RR). Метастази можуть визначатися за допомогою стадійних тестів і сканування кісткових тканин, і тестів на рівень кальцію і інших ферментів для визначення поширення в кісткову тканину. КТ-сканування можуть також проводитися для пошуку поширення в ділянці таза і лімфатичних вузлів. Рентгенівські дослідження грудної клітки і вимірювання рівнів ферментів печінки відомими способами застосовують для пошуку метастазів в легенях і печінці, відповідно. Інші традиційні методи для моніторингу захворювання включають трансректальну ультразвукову ехографію (TRUS) і трансректальну голкову біопсію (TRNB).

"Постійне" введення стосується введення агента(агентів) в безперервному режимі на протигагу гострому режиму, таким чином, щоб підтримувати первинний терапевтичний ефект (активність) протягом тривалого періоду часу. "Дробне" введення являє собою лікування, яке не проводиться без переривання, але в більшій мірі є циклічним за природою.

"Ссавець" для цілей лікування, полегшення симптомів або діагностики раку стосується будь-якої тварини, що класифікується як ссавець, включаючи людей, домашніх і сільськогосподарських тварин, і тварин в зоопарках, спортивних або домашніх тварин, таких як собаки, кішки, велика рогата худоба, коні, вівці, свині, кози, кролики і т. д. Переважно, ссавець є людиною.

Введення "в комбінації з" одним або більше додатковими терапевтичними агентами включає одночасне (супутнє) і послідовне введення в будь-якому порядку.

"Носії", як використовують в даній заявці, включають фармацевтично прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори, які є нетоксичними для клітини або ссавця, що піддається їх впливу при використуванні дозуваннях і концентраціях. Часто фізіологічно прийнятний носій являє собою водний рН-забуферений розчин. Приклади фізіологічно прийнятних носіїв включають буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту; низькомолекулярний (менше ніж приблизно 10 залишків) поліпептид; білки, такі як альбумін сироватки, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, що включають глюкозу, манозу або

декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТА; спиртоцукри, такі як манітол або сорбітол; солетворні протиіони, такі як натрій; і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN®, поліетиленгліколь (PEG) і PLURONICS®.

"Тверда фаза" або "твердий носій" означає неводну матрицю, до якої антитіло, ТАТ-зв'язувальний олігопептид або ТАТ-зв'язувальна органічна молекула даного винаходу можуть прилипати або приєднуватися. Приклади твердих фаз, що охоплюються в даній заявці, включають фази, утворені частково або повністю зі скла (наприклад, скло з контрольованим розміром пор), полісахариди (наприклад, агарозу), поліакриламід, полістирол, полівініловий спирт і силікони. У певних варіантах здійснення, залежно від контексту, тверда фаза може містити ямку аналітичної плашки; в інших являє собою колонку для очищення (наприклад, колонку для афінної хроматографії). Цей термін також включає переривисту тверду фазу з дискретних частинок, таку як ті, що описані в патенті США № 4275149.

"Ліпосома" являє собою невелику везикулу, складену з різноманітних типів ліпідів, фосфоліпідів і/або поверхнево-активної речовини, яка є застосовною для доставки лікарського засобу (такого як поліпептид ТАТ, антитіло до нього або ТАТ-зв'язувального олігопептиду) ссавцеві. Компоненти ліпосоми звичайно розташовані в двошаровому утворенні, яке схоже з розташуванням ліпідів біологічних мембран.

У даній заявці визначено, що "мала" молекула або "мала" органічна молекула мають молекулярну масу нижче приблизно 500 Дальтон.

"Ефективна кількість" поліпептиду, антитіла, ТАТ-зв'язувального олігопептиду, ТАТ-зв'язувальної органічної молекули або її агоніста або антагоніста, як описано в даній заявці, являє собою кількість, достатню для здійснення конкретно встановленої мети. "Ефективна кількість" може бути визначена емпірично і традиційним чином, по відношенню до встановленої мети.

Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості антитіла, поліпептиду, ТАТ-зв'язувального олігопептиду, ТАТ-зв'язувальної органічної молекули або іншого лікарського засобу, ефективного, щоб "лікувати" захворювання або порушення у суб'єкта або ссавця. У разі раку, терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може знижувати кількість ракових клітин; зменшувати розмір пухлини; інгібувати (тобто сповільнювати до деякої міри і, переважно, зупиняти) інфільтрацію ракових клітин до периферичних органів; інгібувати (тобто сповільнювати до деякої міри і, переважно, зупиняти метастази пухлини; інгібувати, до деякої міри ріст пухлини; і/або полегшувати до деякої міри один або більше з симптомів, пов'язаних з раком. Див. визначення, дане в даній заявці "вилікування". У тому ступені, в якому лікарський засіб може запобігати росту і/або знищувати існуючі ракові клітини, він може бути цитостатичним і/або цитотоксичним.

"Інгібуюча ріст кількість" антитіла проти ТАТ, поліпептиду ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули являє собою кількість, здатну до інгібування росту клітини, особливо, пухлинної, наприклад, ракової клітини, або *in vitro* або *in vivo*. "Інгібуюча ріст кількість" антитіла проти ТАТ, поліпептиду ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули з метою інгібування росту неопластичної клітини може бути визначена емпірично і традиційним чином.

"Цитотоксична кількість" антитіла проти ТАТ, поліпептиду ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули являє собою кількість, здатну викликати деструкцію клітини, особливо пухлинної, наприклад, ракової клітини, або *in vitro* або *in vivo*. "Цитотоксична кількість" антитіла проти ТАТ, поліпептиду ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули з метою інгібування росту неопластичної клітини може бути визначена емпірично і традиційним чином.

Термін "антитіло" застосовують в найширшому значенні, і він конкретно охоплює, наприклад, одиничні проти ТАТ моноклональні антитіла (включаючи агоністичні, антагоністичні, і нейтралізуючі антитіла), композиції антитіла проти ТАТ з поліепітопною специфічністю, поліклональні антитіла, однокланові антитіла проти ТАТ, і фрагменти антитіл проти ТАТ (див. нижче), оскільки вони виявляють бажану біологічну або імунологічну активність. Термін "імуноглобулін" (Ig) застосовують в даній заявці взаємозамінно з антитілом.

"Виділене антитіло" являє собою антитіло, яке було ідентифіковане і відділене і/або витягнуте з компонента його природного оточення. Забруднюючі компоненти його природного оточення являють собою речовини, які звичайно впливають при діагностичних або терапевтичних застосуваннях антитіла, і можуть включати ферменти, гормони і інші білкові або небілкові розчинні речовини. У переважних варіантах здійснення, антитіло буде очищене (1) до більше ніж 95 % маси антитіла, як визначають по методу Лоурі, і найбільш переважно, більше ніж 99 % маси, (2) до ступеня, достатнього для отримання щонайменше 15 залишків N-кінцевої

або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою застосування секвенатора з обертовою склянкою, або (3) до гомогенності за допомогою SDS-PAGE при невідновних або відновних умовах, використовуючи Кумассі синій або, переважно, срібний барвник. Виділене антитіло включає антитіло *in situ* в рекомбінантних клітинах, оскільки щонайменше один компонент природного оточення антитіла не буде присутнім. Звичайно, однак, виділене антитіло буде отримане за допомогою щонайменше однієї стадії очищення.

Базова одиниця 4-ланцюжкового антитіла являє собою гетеротетрамерний глікопротеїн, складений з двох ідентичних легких (L) ланцюгів і двох ідентичних важких (H) ланцюгів (IgM антитіло складається з 5 базових гетеротетрамерних одиниць поряд з додатковим поліпептидом, що називається J ланцюг, і, отже, містить 10 антиген-зв'язувальних ділянок, в той час як секретовані IgA антитіла можуть полімеризуватися з утворенням полівалентних агрегатів, що містять 2-5 базових 4-ланцюжкових одиниць, нарівні з J ланцюгом). У випадку IgG, 4-ланцюжкова одиниця становить, як правило, приблизно 150000 Дальтон. Кожний L ланцюг зв'язаний з H ланцюгом за допомогою одного ковалентного дисульфідного зв'язку, в той час як двоє H ланцюги зв'язані один з одним за допомогою одного або більше дисульфідних зв'язків залежно від ізо типу H ланцюга. Кожен H і L ланцюг також має внутрішньоланцюжкові дисульфідні містки з регулярними інтервалами. Кожний H ланцюг має N-кінець, варіабельний домен (VH) з подальшими трьома константними доменами (CH) для кожного з α і γ ланцюгів і чотирма CH доменами для μ і ϵ ізо типів. Кожний L ланцюг має N-кінець, варіабельний домен (VL) з подальшим константним доменом (CL) по її іншому кінцю. VL вирівняний з VH, і CL вирівняний з першим константним доменом важкого ланцюга (CH1). Вважають, що конкретні амінокислотні залишки утворюють межа розділу фаз між варіабельними доменами з легким ланцюгом і з важким ланцюгом. Утворення пари VH і VL разом утворить одиничну антиген-зв'язувальну ділянку. По структурі і властивостям різних класів антитіл, див., наприклад, Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Trictram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

L ланцюг від будь-якого вигляду хребетних може бути віднесена до одного з двох чітко помітних типів, які називаються каппа і лямбда, на основі амінокислотних послідовностей їх константних доменів. Залежно від амінокислотної послідовності їх константних доменів з важким ланцюгом (CH), імуноглобуліни можуть бути віднесені до різних класів або ізо типів. Існують п'ять класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, що мають важкі ланцюги, позначені α , δ , ϵ , γ і μ , відповідно. γ і α класи додатково розділені на підкласи на основі відносно мінорних відмінностей в CH послідовності і функції, наприклад, люди експресують наступні підкласи: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2.

Термін "варіабельний" стосується того факту, що деякі сегменти варіабельних доменів відрізняються по послідовності між антитілами. V домен опосередковує зв'язування антигена і визначає специфічність конкретного антитіла для його конкретного антигена. Однак, варіабельність не однорідно розподілена протягом 110-амінокислотної протяжності варіабельних доменів. Замість цього, V області складаються з відносно інваріантних ділянок, які називаються каркасними областями (FR) з 15-30 амінокислот, розділених більш короткими областями крайньої варіабельності, які називаються "гіперваріабельними областями", які мають кожна 9-12 амінокислот по довжині. Варіабельні домени нативних важких і легких ланцюгів кожний містить чотири FR, що в основному приймають β -листову конфігурацію, з'єднаних за допомогою трьох гіперваріабельних областей, які утворюють петлі, які з'єднують, і в деяких випадках утворюють частину, структури β -листа. Гіперваріабельні області в кожному ланцюгу утримуються разом в тісній близькості за допомогою FR і, разом з гіперваріабельними областями від іншого ланцюга, сприяють утворенню антиген-зв'язувальної ділянки антитіла (див. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes Health, Bethesda, MD. (1991)). Константні домени не є включеними безпосередньо в зв'язування антитіла з антигеном, але виявляють різноманітні ефекторні функції, такі як участь антитіла в залежній від антитіла клітинній цитотоксичності (ADCC).

Термін "моноклональне антитіло" як використовують в даній заявці, стосується антитіла, отриманого від популяції по суті гомогенних антитіл, тобто, індивідуальні антитіла, що містяться в популяції, є ідентичними за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природі, які можуть бути присутніми в мінорних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, будучи направленими проти одиничної антигенної ділянки. Крім того, на протипагу препаратом поліклональних антитіл, які включають різні антитіла, направлені проти різних детермінантів (епітопів), кожне моноклональне антитіло направлене проти одиничного детермінанта на антигені. У доповнення до їх специфічності, моноклональні антитіла є переважними в тому, що вони можуть бути синтезовані незабрудненими іншими антитілами. Під визначенням

"моноклональний" не має на увазі, як вимагає продукування антитіла за допомогою будь-якого конкретного способу. Наприклад, моноклональні антитіла, застосовні в даному винаході, можуть бути отримані за допомогою гібридомної методології, уперше описаної Kohler et al, Nature, 256:495 (1975), або можуть бути отримані з використанням методів з рекомбінантної ДНК в бактерійних, еукаріотичних тварин або рослинних клітинах (див., наприклад, патент США № 4816567). "Моноклональні антитіла" можуть також бути виділені з бібліотек фагових антитіл, з використанням методів, описаних, наприклад, у Clackson et al, Nature, 352:624-628 (1991) і Marks et al, J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991).

Моноклональні антитіла в даній заявці включають "химерні" антитіла, в яких частина важкого і/або легкого ланцюга є ідентичною з або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, які походять від конкретних видів або належать конкретному класу або підкласу антитіла, в той час як частина ланцюга(ланцюгів), що залишилася, є ідентичною з або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, які походять від ще одного іншого виду або що належать до ще одного іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, оскільки вони виявляють бажану біологічну активність (див. патент США № 4816567; і Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Химерні антитіла, що представляють інтерес, в даній заявці включають "приматизовані" антитіла, що містять варіабельний домен антиген-зв'язувальних послідовностей, які походять від нелюдського примату (наприклад, мавпи Старого Світу, примату і т. д.), і константну область послідовностей людини.

"Інтактне" антитіло являє собою антитіло, яке містить антиген-зв'язувальну ділянку, а також CL і щонайменше константні домени важкого ланцюга, CH1, CH2 і CH3. Константні домени можуть являти собою константні домени нативної послідовності (наприклад, константні домени нативної послідовності людини) або їх варіант амінокислотної послідовності. Переважно, інтактне антитіло має одну або більше ефекторних функцій.

"Фрагменти антитіла" містять частину інтактного антитіла, переважно, антиген-зв'язувальну або варіабельну область інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіла включають Fab, Fab', F(ab')₂, і Fv фрагменти; діатіла; лінійні антитіла (див. патент США № 5641870, Приклад 2; Zapata et al, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); молекули антитіл з єдиним ланцюгом; і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

Розщеплення антитіл папаїном продукує два ідентичні антиген-зв'язувальні фрагменти, які називаються "Fab'фрагменти, і залишковий "Fc" фрагмент, позначення, що відображає здатність легко кристалізуватися. Fab фрагмент складається з повного L ланцюга нарівні з доменом варіабельної області H ланцюга (VH), і перший константний домен одного важкого ланцюга (CH1). Кожний Fab фрагмент є моновалентним по відношенню до зв'язування антигена, тобто, він має одиничну антиген-зв'язувальну ділянку. Обробка антитіла пепсином дає на виході одиничний великий F(ab')₂ фрагмент, який приблизно відповідає двом дисульфідно зв'язаним Fab фрагментам, що мають дивалентну антиген-зв'язувальну активність, і все ще здатним до зшивання з антигеном. Fab' фрагменти відрізняються від Fab фрагментів тим, що мають додаткові декілька залишків по карбоксикінцю домену CH1, що включає один або більше цистеїнів шарнірної області антитіла. Fab'-SH являє собою позначення, подане в даній заявці для Fab', в якому цистеїнові залишок(залишки) константних доменів несуть вільну тиольну групу. F(ab')₂ фрагменти антитіл спочатку були отримані як пари Fab' фрагментів, які мають шарнірні цистеїни між ними. Відомі також інші хімічні сполучення фрагментів антитіл.

Fc фрагмент містить карбоксикінцеві частини обох H ланцюгів, що втримуються разом за допомогою дисульфідів. Ефекторні функції антитіл визначаються послідовностями в Fc-області, яка також являє собою частину, розпізнавану Fc рецепторами (FcR), виявленими на деяких типах клітин.

"Fv" являє собою мінімальний фрагмент антитіла, який містить повну антиген-розпізнавальну і -зв'язувальну ділянку. Цей фрагмент складається з димера одного з важким ланцюгом і одного з легким ланцюгом доменів варіабельної області в щільній, нековалентній асоціації. Від вигинів цих двох доменів відбувається утворення шести гіперваріабельних петель (3 петлі від кожної з H і L ланцюгів), що сприяє зв'язуванню антигена амінокислотними залишками і додає специфічності зв'язуванню антигена з антитілом. Однак, навіть одиничний варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три CDR, специфічні для антигена) має здатність до розпізнавання і зв'язування антигена, хоч при більш низькій спорідненості, ніж для повної ділянки зв'язування.

"Одинично-ланцюжковий Fv", що також скорочується як "sFv" або "scFv", являє собою фрагменти антитіл, які містять VH і VL домени антитіл, з'єднані в одиничний поліпептидний ланцюг. Переважно, sFv поліпептид додатково містить поліпептидний лінкер між VH і VL

доменами, який дозволяє sFv утворювати бажані структури для зв'язування антигена. Огляд по sFv, див. Pluckthun in *Pharmacology Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, нижче.

Термін "діатіла" стосується невеликих фрагментів антитіл, отриманих за допомогою збирання sFv фрагментів (див. попередній параграф) з короткими лінкерами (приблизно 5-10 залишків) між VH і VL доменами, таким чином, що досягається міжланцюжкове, але не внутрішньоланцюжкове спарювання V доменів, що приводить в результаті до бівалентного фрагмента, тобто, фрагмента, що має дві антиген-зв'язувальні ділянки. Біспецифічні діатіла являють собою гетеродимери двох "перехресних" sFv фрагментів, в яких VH і VL домени двох антитіл присутні на різних поліпептидних ланцюгах. Діатіла описані більш повно в, наприклад, EP 404097; WO 93/11161; і Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

"Гуманізовані" форми нелюдських антитіл (наприклад, гризунів) являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, яка походить від нелюдського антитіла. Переважно, гуманізовані антитіла являють собою імунoglobуліни людини (реципієнтне антитіло), в яких залишки з гіперваріабельної області реципієнта замінені на залишки з гіперваріабельної області нелюдських видів (донорне антитіло), таких як миші, щури, кролики або примати, що не є людиною, що мають специфічність, спорідненість і здатність бажаного антитіла. У деяких випадках, залишки каркасної області (FR) імунoglobуліну людини замінені на відповідні нелюдські залишки. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не виявляються в реципієнтному антитілі або в донорному антитілі. Ці модифікації проробляють, щоб додатково поліпшити ефективність дії антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі зі щонайменше одного, і звичайно двох, варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі з гіперваріабельних петель відповідають петлям нелюдського імунoglobуліну, і всі або по суті всі з FR являють собою FR послідовності імунoglobуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде містити щонайменше частину константної області імунoglobуліну (Fc), звичайно з імунoglobуліну людини. Додаткові подробиці, див. Jones et al, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332:323-329 (1988); і Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

"Видозалежне антитіло", наприклад, антитіло ссавця проти IgE людини, являє собою антитіло, яке має більш високу спорідненість до зв'язування для антигена від першого виду ссавця, ніж воно має для гомолога цього антигена від другого виду ссавця. Звичайно, видозалежне антитіло "зв'язується специфічно" з антигеном людини (тобто, має значення спорідненості до зв'язування (Kd), яке дорівнює не більше ніж приблизно 1×10^{-7} M, переважно, не більше ніж приблизно 1×10^{-8} , і, найбільш переважно, не більше ніж приблизно 1×10^{-9} M), але має спорідненість зв'язування для гомолога антигена від другого нелюдського виду ссавця, яке щонайменше приблизно в 50 разів, або щонайменше приблизно в 500 разів, або щонайменше приблизно в 1000 разів, слабше, ніж його спорідненість зв'язування для антигена людини. Видозалежне антитіло може являти собою будь-який з різноманітних типів антитіл, як визначено вище, але, переважно, є гуманізованим антитілом або антитілом людини.

Термін "нумерація залишків варіабельного домену по Кабату" або "нумерація амінокислотного положення по Кабату", і їх варіації, стосується системи нумерації, що використовується для варіабельних доменів з важким ланцюгом або варіабельних доменів з легким ланцюгом з компіляції антитіл в Kabat et al., *Sequences Proteins Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes Health, Bethesda, MD. (1991). З використанням цієї системи нумерації, дійсна лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу кількість або додаткові амінокислоти, відповідні укороченню, або введенню в, FR або CDR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен з важким ланцюгом може включати одиничну амінокислотну вставку (залишок 52a відповідно до Кабат) після залишку 52 з H2 і введені залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c, і т. д., відповідно до Кабат) після залишку з важким ланцюгом FR 82. Нумерація залишків по Кабат може бути визначена для даного антитіла за допомогою вирівнювання в лінію в областях гомології послідовності антитіла зі "стандартною" пронумерованою по Кабат послідовності.

Фраза "по суті схожі" або "по суті такі ж", як використовують в даній заявці, означає досить високий ступінь схожості між двома числовими значеннями (звичайно, одним, пов'язаним з антитілом винаходу, і іншим, пов'язаним з референтним/для порівняння антитілом) таким чином, що кваліфікований фахівець в даній галузі буде вважати відмінність між двома значеннями маленьким або що не має біологічної і/або статистичної значущості в межах контексту біологічної характеристики, виміряної по вказаних значеннях (наприклад, значеннях Kd). Відмінність між вказаними двома значеннями, переважно, складає менше ніж приблизно 50 %, переважно, менше ніж приблизно 40 %, переважно, менше ніж приблизно 30 %, і

переважно, менше ніж приблизно 20 %, переважно, менше ніж приблизно 10 % як функція значення для референтного/для порівняння антитіла.

"Спорідненість зв'язування", загалом, стосується міцності загальної суми нековалентних взаємодій між одиничною ділянкою зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і його партнером зв'язування (наприклад, антигеном). Якщо не указано інакше, як використовують в даній заявці, "спорідненість зв'язування" стосується характеристичної спорідненості зв'язування, яка відображає 1:1 взаємодію між елементами пари зв'язування (наприклад, антитіла і антигена). Спорідненість молекули X до її партнера Y може, загалом, представлено за допомогою константи дисоціації (K_d). Спорідненість може бути виміряна за допомогою загальноприйнятих способів, відомих в даній галузі, що включають способи, описані в даній заявці. Низькоафінні антитіла, як правило, зв'язують антиген повільно і мають тенденцію легко дисоціювати, в той час як високоафінні антитіла, як правило, зв'язують антиген швидше і мають тенденцію залишатися зв'язаними довше. Різноманітні способи вимірювання спорідненості зв'язування відомі в даній галузі, будь-які з яких можуть застосовуватися для цілей даного винаходу. Конкретні ілюстративні варіанти здійснення описані далі.

У одному варіанті здійснення, " K_d " або "значення K_d " відповідно до даного винаходу вимірюють за допомогою аналізу зв'язування радіоактивно-міченого антигена (RIA), здійснюваного з Fab версією антитіла, що представляє інтерес, і його антигена, як описано за допомогою подальшого аналізу, який вимірює спорідненість зв'язування розчину Fab до антигену за допомогою урівноваження Fab з мінімальною концентрацією (125 I)-міченого антигена в присутності титрувального ряду неміченого антигена, потім захоплення зв'язаного антигена з планшетом, покритим антитілами проти-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Для встановлення умов для аналізу, титраційні мікропланшети (Dyplex) покривають протягом ночі 5 мкг/мл захоплюючого антитіла проти-Fab (Cappel Labs) в 50 mM карбонаті натрію (pH 9,6), і далі блокують 2 % (мас./об.) альбуміном бичачої сироватки в PBS протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc #269620), 100 pM або 26 pM [125 I]-антиген змішують з серійним розведенням Fab, що представляє інтерес (наприклад, відповідно до оцінки антитіла проти-VEGF, Fab-12, в Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Fab, що представляє інтерес, далі інкубують протягом ночі; однак, інкубація може продовжуватися протягом більш тривалого періоду (наприклад, 65 годин) для гарантії, що рівновага досягнута. Потім, суміші переносять в планшет для захоплення для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Розчин потім видаляють, і планшет видаляють вісім разів з 0,1 % Твін-20 в PBS. Коли планшети висушують, додають 150 мкл/ямку сцинтилятору (MicroScint-20; Packard), і планшети підраховують на гамма-лічильнику Topcount (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають менше ніж або дорівнюють 20 % від максимального зв'язування вибирають для застосування в аналізах з конкурентним зв'язуванням. Відповідно до ще одного іншого варіанту здійснення K_d або значення K_d вимірюють за допомогою використання аналізів поверхневого плазмонного резонансу, застосовуючи BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C з чипами з іммобілізованим антигеном CM5 при ~10 одиницях відгуку (RU). Коротко, біосенсорні чипи (CM5, BIAcore Inc.) з карбоксиметиллованим декстраном активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розбавляють 10 mM ацетатом натрію, pH 4,8, в 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед ін'єкційним введенням при швидкості потоку, яка дорівнює 5 мкл/хвилина для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигена, 1M етаноламін ін'єктують в блок-непрореагувавши групи. Для вимірювань кінетики, двократне серійне розведення Fab (0,78 nM до 500 nM) ін'єкційно вводять в PBS з 0,05 % Твін 20 (PBST) при 25 °C при швидкості потоку, яка дорівнює приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (kon) і швидкості дисоціації (koff) розраховують, використовуючи просту модель зв'язування один-до-одного Ленгмюра (BIAcore Evaluation Software version 3.2) за допомогою одночасної апроксимації сенсограми асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) розраховують як відношення koff/kon. Див., наприклад, Chen, Y., et al, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Якщо швидкість асоціації перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ за результатами аналізу поверхневого плазмонного резонансу, згаданого вище, потім швидкість асоціації може бути визначена за допомогою використання методу гасіння флуоресценції, який вимірює збільшення або зменшення інтенсивності емісії флуоресценції (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання = 16 нм) при 25 °C 20 nM антитіла проти-антигена (Fab форма) в PBS, pH 7,2, в присутності збільшеної концентрації антигена, як вимірюють спектрометром, таким як спектрофотометр, обладнаний зупинкою потоку (Aviv Instruments) або SLM-Aminco спектрофотометр 8000-серії (Thermo Spectronic) з перемішуваною кюветою.

"Швидкість асоціації" або "ступінь асоціації" або "асоціаційна швидкість" або "kon" відповідно до даного винаходу може також визначатися за допомогою того ж методу поверхневого плазмонного резонансу, описаного вище, з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 25 °C з чипами з іммобілізованим антигеном CM5 при ~10

5 одиницях відповіді (RU). Коротко, біосенсорні чипи (CM5, BIAcore Inc.) з карбоксиметилованим декстраном активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розбавляють 10

10 mM ацетатом натрію, pH 4,8, в 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед ін'єкційним введенням при швидкості потоку, яка дорівнює 5 мкл/хвилина для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигена, 1M етаноламін ін'єктують в блок-непрореагувавши групи. Для вимірювань кінетики, двократне серійне розведення Fab (0,78 нМ до 500 нМ) ін'єкційно вводить в PBS з 0,05 % Твін 20 (PBST) при 25 °C при швидкості потоку, яка дорівнює приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (kon) і швидкості дисоціації (koff) розраховують, використовуючи

15 просту модель зв'язування один-до-одного Ленгмюра (BIAcore Evaluation Software version 3.2) за допомогою одночасної апроксимації сенсограми асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (Kd) розраховують як відношення koff/kon. Див., наприклад, Chen, Y., et al, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Якщо швидкість асоціації перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ за результатами аналізу поверхневого плазмонного резонансу, згаданого вище, потім швидкість асоціації може бути визначена за допомогою використання методу гасіння флуоресценції, який вимірює збільшення

20 або зменшення інтенсивності емісії флуоресценції (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання = 16 нм) при 25 °C 20 нМ антитіла проти-антигена (Fab форма) в PBS, pH 7,2, в присутності збільшеної концентрації антигена, як вимірюють спектрометром, таким як спектрофотометр, обладнаний зупинкою потоку (Aviv Instruments) або SLM-Aminco спектрофотометр 8000-серії (Thermo Spectronic) з перемішуваною кюветою. "Kd" або "значення

25 Kd" відповідно до даного винаходу в одному варіанті здійснення вимірюють за допомогою аналізу зв'язування радіоактивно-міченого антигена (RIA), здійснюваного з Fab версією антитіла, що представляє інтерес, і його антигена, як описано за допомогою подальшого аналізу, який вимірює спорідненість зв'язування розчину Fab до антигену за допомогою урівноваження Fab з мінімальною концентрацією (^{125}I)-міченого антигена в присутності

30 титрувального ряду неміченого антигена, потім захоплення зв'язаного антигена з планшетом, покритим антитілами проти-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Для встановлення умов для аналізу, титраційні мікропланшети (Dynex) покривають протягом ночі 5 мкг/мл захоплюючого антитіла проти-Fab (Cappel Labs) в 50 mM карбонаті натрію (pH 9,6), і далі блокують 2 % (мас./об.) альбуміном бичачої сироватки в PBS протягом двох-п'яти годин при

35 кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc #269620), 100 пМ або 26 пМ [^{125}I]-антиген змішують з серійним розведенням Fab, що представляє інтерес (наприклад, відповідно до оцінки антитіла проти-VEGF, Fab-12, в Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Fab, що представляє інтерес, далі інкубують протягом ночі; однак, інкубація може продовжуватися протягом більш тривалого періоду (наприклад, 65 годин) для гарантії, що

40 рівновага досягнута. Потім, суміші переносять в планшет для захоплення для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Розчин потім видаляють, і планшет промивають вісім разів з 0,1 % Твін-20 в PBS. Коли планшети висушують, додають 150 мкл/ямку сцинтилятора (МікроScint-20; Packard), і планшети підраховують на гамма-лічильнику Topcount (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають менше ніж або

45 дорівнюють 20 % від максимального зв'язування, вибирають для застосування в аналізах з конкурентним зв'язуванням. Відповідно до ще одного іншого варіанту здійснення Kd або значення Kd вимірюють за допомогою використання аналізів поверхневого плазмонного резонансу, застосовуючи BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C з чипами з іммобілізованим антигеном CM5 при ~10 одиницях відгуку (RU). Коротко,

50 біосенсорні чипи (CM5, BIAcore Inc.) з карбоксиметилованим декстраном активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розбавляють 10 mM ацетатом натрію, pH 4,8, в 5мкг/мл (~0,2 мкМ) перед ін'єкційним введенням при швидкості потоку, яка дорівнює 5 мкл/хвилина для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції

55 антигена, 1M етаноламін ін'єктують в блок-непрореагувавши групи. Для вимірювань кінетики, двократне серійне розведення Fab (0,78 нМ до 500 нМ) ін'єкційно вводить в PBS з 0,05 % Твін 20 (PBST) при 25 °C при швидкості потоку, яка дорівнює приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (kon) і швидкості дисоціації (koff) розраховують, використовуючи просту модель зв'язування один-до-одного Ленгмюра (BIAcore Evaluation Software version 3.2) за допомогою

60 одночасної апроксимації сенсограми асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (Kd)

розраховують як відношення k_{off}/k_{on} . Див., наприклад, Chen, Y., et al, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Якщо швидкість асоціації перевищує 106 M⁻¹ S⁻¹ за результатами аналізу поверхневого плазмонного резонансу, згаданого вище, потім швидкість асоціації може бути визначена за допомогою використання методу гасіння флуоресценції, який вимірює збільшення або зменшення інтенсивності емісії флуоресценції (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, 16 нм смуга пропускання) при 25 °C 20 нМ антитіла проти-антигена (Fab форма) в PBS, pH 7,2, в присутності збільшеної концентрації антигена, як вимірюють спектрометром, таким як спектрофотометр, обладнаний зупинкою потоку (Aviv Instruments) або SLM-Aminco спектрофотометр 8000-серії (Thermo Spectronic) з перемішуваною кюветою.

У одному варіанті здійснення, "швидкість асоціації" або "ступінь асоціації" або "асоціаційна швидкість" або "кон" відповідно до даного винаходу може також визначатися за допомогою того ж методу поверхневого плазмонного резонансу, описаного вище, з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 25 °C з чипами з іммобілізованим антигеном CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). Коротко, біосенсорні чипи (CM5, BIAcore Inc.) з карбоксиметильованим декстраном активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду (EDC) і N-гідрокисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розбавляють 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, в 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед ін'єкційним введенням при швидкості потоку, яка дорівнює 5 мкл/хвилина для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигена, 1М етаноламін ін'єктують в блок-непрореагувавши групи. Для вимірювань кінетики, двократне серійне розведення Fab (0,78 нМ до 500 нМ) ін'єкційно вводять в PBS з 0,05 % Твін 20 (PBST) при 25 °C при швидкості потоку, яка дорівнює приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) розраховують, використовуючи просту модель зв'язування один-до-одного Ленгмюра (BIAcore Evaluation Software version 3.2) за допомогою одночасної апроксимації сенсограми асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) розраховують як відношення k_{off}/k_{on} . Див., наприклад, Chen, Y., et al, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Якщо швидкість асоціації перевищує 106 M⁻¹ S⁻¹ за результатами аналізу поверхневого плазмонного резонансу, згаданого вище, потім швидкість асоціації може бути визначена за допомогою використання методу гасіння флуоресценції, який вимірює збільшення або зменшення інтенсивності емісії флуоресценції (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання = 16 нм) при 25 °C 20 нМ антитіла проти-антигена (Fab форма) в PBS, pH 7,2, в присутності збільшеної концентрації антигена, як вимірюють спектрометром, таким як спектрофотометр, обладнаний зупинкою потоку (Aviv Instruments) або SLM-Aminco спектрофотометр 8000-серії (Thermo Spectronic) з перемішуваною кюветою.

Фраза "значно знижені" або "значно відмінні", як використовують в даній заявці, означає досить високий ступінь відмінності між двома числовими значеннями (як правило, одного, пов'язаного з антитілом винаходу і іншого, пов'язаного з референтним/для порівняння антитілом), таким чином, що кваліфікований фахівець в даній галузі буде розглядати відмінність між двома значеннями, як що має статистичну значущість в межах контексту біологічної характеристики, вимірюваної по вказаних значеннях (наприклад, значення K_d , відгук НАМА). Відмінність між вказаними двома значеннями є, переважно, вищою ніж приблизно 10 %, переважно, вищою ніж приблизно 20 %, переважно, вищою ніж приблизно 30 %, переважно, вищою ніж приблизно 40 %, переважно, вищою ніж приблизно 50 % як функція значення для референтного/для порівняння антитіла.

"Антиген" являє собою попередньо визначений антиген, з яким антитіло може селективно зв'язуватися. Цільовий антиген може являти собою поліпептид, вуглевод, нуклеїнову кислоту, ліпід, гаптен або іншу сполуку, що зустрічається в природі, або синтетичну сполуку. Переважно, цільовий антиген є поліпептидом. "Акцепторний каркас людини" для цілей в даній заявці являє собою каркас, що містить амінокислотну послідовність каркаса VL або VH, який походить від каркаса імуноглобуліну людини або від консенсусного каркаса людини. Акцепторний каркас людини, "який походить від" каркаса імуноглобуліну людини, або консенсусний каркас людини можуть містити однакову їх амінокислотну послідовність або можуть містити попередньо існуючі зміни амінокислотної послідовності. Там, де присутні попередньо існуючі амінокислотні зміни, переважно, не більше ніж 5 і, переважно, 4 або менше, або 3 або менше, попередньо існуючі амінокислотні зміни присутні. Там, де попередньо існуючі амінокислотні зміни присутні в VH, переважно, ці зміни присутні тільки по трьох, двох або одному з положень 71H, 73H і 78H; наприклад, амінокислотні залишки по цих положеннях можуть бути 71A, 73T і/або 78A. У одному варіанті здійснення, VL акцепторний каркас людини є ідентичним по послідовності з каркасною послідовністю VL імуноглобуліну людини або консенсусною каркасною послідовністю людини.

Антитіла даного винаходу можуть мати здатність до конкуренції за зв'язування з одним і тим же епітопом, зв'язаним з другим антитілом. Вважають, що моноклональні антитіла ділять "один і той же епітоп", якщо кожне блокує зв'язування іншого на 40 % або вище при такій же концентрації антитіла в стандартному аналізі *in vitro* конкурентного зв'язування антитіл.

"Консенсусний каркас людини" являє собою каркас, який представляє собою амінокислотний залишок, що найчастіше зустрічається, при виборі VL або VH каркасних послідовностей імуноглобуліну людини. Загалом, вибір VL або VH послідовностей імуноглобуліну людини походить з підгрупи послідовностей варіабельного домену. Загалом, підгрупи послідовностей є підгрупами, як приведено у Kabat et al. У одному варіанті здійснення, для VL, підгрупа є підгрупою каппа I, як у Kabat et al. У одному варіанті здійснення, для VH, підгрупа є підгрупою III як у Kabat et al.

"Консенсусний каркас VH підгрупи III" містить консенсусну послідовність, отриману з амінокислотних послідовностей у варіабельній важкій підгрупі III по Kabat et al.

"Консенсусний каркас VL підгрупи I" містить консенсусну послідовність, отриману з амінокислотних послідовностей у варіабельній легкій каппа підгрупі I по Kabat et al.

"Немодифікований каркас людини" представляє каркас людини, який має таку ж амінокислотну послідовність, як і акцепторний каркас людини, наприклад, без від людських до нелюдських амінокислотних замін в акцепторному каркасі людини.

"Змінена гіперваріабельна область" для цілей даного винаходу являє собою гіперваріабельну область, що містить одну або більше (наприклад, від однієї до приблизно 16) амінокислотних замін в них.

"Немодифікована гіперваріабельна область" для цілей даного винаходу являє собою гіперваріабельну область, що має таку ж амінокислотну послідовність, як і нелюдське антитіло, з якого вона була отримана, тобто область, в якій відсутні одна або більше амінокислотних замін.

Термін "гіперваріабельна область", "HVR", "HV" або "CDR", коли використовують в даній заявці, стосується областей варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними по послідовності і/або утворюють структурно визначені петлі. Загалом, антитіла містять шість гіперваріабельних областей; три в VH (H1, H2, H3), і три в VL (L1, L2, L3). Ряд розмежування гіперваріабельних областей знаходяться в застосуванні і охоплені в даній заявці. Области визначення комплементарності по Кабат (CDR) основані на варіабельності послідовності і використовуються найчастіше (Kabat et al., *Sequences Proteins Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia дає замість цього посилання на розташування структурних петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). "Контактні" гіперваріабельні області основані на аналізі доступних комплексних кристалічних структур. Залишки від кожної з цих гіперваріабельних областей відмічені нижче. Якщо не визначено інакше, буде використана нумерація по Кабат. Розташування гіперваріабельної області, як правило, є наступним: амінокислоти 24-34 (HVR-L1), амінокислоти 49-56 (HVR-L2), амінокислоти 89-97 (HVR-L3), амінокислоти 26-35A (HVR-H1), амінокислоти 49-65 (HVR-H2) і амінокислот 93-102 (HVR-H3).

Гіперваріабельні області можуть також містити "розширені гіперваріабельні області" таким чином: амінокислоти 24-36 (L1), і амінокислоти 46-56 (L2) в VL. Залишки варіабельного домену нумеруються відповідно до Kabat et al, вище для кожного з цих визначень.

"Каркасні" або "FR" залишки являють собою такі залишки варіабельного домену, відмінні від залишків гіперваріабельної області, як в даній заявці визначено.

"Антитіло людини" являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, продукованій людиною, і/або була отримана з використанням будь-якого з методів для отримання антитіл людини, як описано в даній заявці. Це визначення антитіла людини конкретно виключає гуманізоване антитіло, що містить нелюдські антиген-зв'язувальні залишки.

Антитіло "зрілої афінності" являє собою антитіло з однією або більше змінами в одній або більше їх CDR, які приводять до поліпшення спорідненості антитіла до антигену, в порівнянні з батьківським антитілом, яке не має цих змін. Переважні антитіла зрілої афінності будуть мати наномольні або навіть пікомольні значення спорідненості до цільового антигену. Антитіла зрілої афінності отримують за допомогою методик, відомих в даній галузі. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описує зрілу афінність за допомогою перетасовування VH і VL доменів. Статистичний мутагенез CDR і/або каркасних залишків описаний в: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); і Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Блокуюче" антитіло або "антагоністичне" антитіло являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність антигена, з яким воно зв'язується. Переважні блокуючі антитіла або антагоністичні антитіла по суті або повністю інгібують біологічну активність антигена.

"ТАТ-зв'язувальний олігопептид" являє собою олігопептид, який зв'язується, переважно, специфічно, з поліпептидом ТАТ, як описано в даній заявці. ТАТ-зв'язувальні олігопептиди можуть бути синтезовані хімічно з використанням відомої методології синтезу олігопептидів або можуть бути отримані і очищені з використанням рекомбінантної технології. ТАТ-зв'язувальні олігопептиди містять звичайно щонайменше приблизно 5 амінокислот по довжині, альтернативно щонайменше приблизно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 амінокислот по довжині або більше, де такі олігопептиди мають здатність до зв'язування, переважно, конкретно, з поліпептидом ТАТ, як описано в даній заявці. ТАТ-зв'язувальні олігопептиди можуть бути ідентифіковані без зайвого експериментування з використанням добре відомих методів. У цьому відношенні зазначають, що методи скринінгу бібліотек олігопептидів для олігопептидів, що мають здатність специфічно зв'язуватися з поліпептидною мішенню, є добре відомими в даній галузі (див., наприклад, патенти США №№ 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; Публікацію заявок РСТ №№ WO 84/03506 і WO84/03564; Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al, в Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al, J. Immunol, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol, 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, і Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol, 2:668).

"ТАТ-зв'язувальна органічна молекула" являє собою органічну молекулу, відмінну від олігопептиду або антитіла, як визначено в даній заявці, яка зв'язується, переважно, специфічно, з поліпептидом ТАТ, як описано в даній заявці. ТАТ-зв'язувальна органічна молекула може бути ідентифікована і хімічно синтезована з використанням відомої методології (див., наприклад, Публікацію заявок РСТ №№ WO00/00823 і WO00/39585). ТАТ-зв'язувальні органічні молекули звичайно складають менше ніж приблизно 2000 Дальтон по розміру, альтернативно, менше ніж приблизно 1500, 750, 500, 250 або 200 Дальтон по розміру, де такі органічні молекули, які мають здатність до зв'язування, переважно, специфічно, з поліпептидом ТАТ, як описано в даній заявці, можуть бути ідентифіковані без зайвого експериментування з використанням добре відомих методів. У цьому відношенні, зазначають, що методи скринінгу бібліотек органічних молекул для молекул, які мають здатність до зв'язування з поліпептидною мішенню, є добре відомими в даній галузі (див., наприклад, Публікації заявок РСТ №№ WO00/00823 і WO00/39585).

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, "яка зв'язується" з антигеном, що представляє інтерес, наприклад, мішенню пухлино-зв'язаного поліпептидного антигена, являє собою молекулу, яка зв'язується з антигеном з достатньою спорідненістю, таким чином, що антитіло, олігопептид або інша органічна молекула є застосовною як діагностичний і/або терапевтичний агент при направленому впливі на клітину або тканину, які експресують антиген, і не мають істотної перехресної взаємодії з іншими білками. У таких варіантах здійснення, ступінь зв'язування антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули з "нецільовим" білком буде складати менше ніж приблизно 10 % від зв'язування антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули з їх конкретним цільовим білком, як визначають за допомогою аналізу сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS) або радіоімунореципітації (RIA). По відношенню до зв'язування антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули з цільовою молекулою, термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язується з" або є "специфічним для" конкретного поліпептиду або епітопа на конкретній поліпептидній мішені означає зв'язування, яке є вимірювано відмінним від неспецифічної взаємодії. Специфічне зв'язування може бути виміряне, наприклад, за допомогою визначення зв'язування молекули в порівнянні зі зв'язуванням контрольної молекули, яка, звичайно є молекулою схожої структури, яка не має активності зв'язування. Наприклад, специфічне зв'язування може бути визначене за допомогою конкуренції з контрольною молекулою, яка є схожою з мішенню, наприклад, надлишком неміченої мішені. У цьому випадку, специфічне зв'язування виявляється, якщо зв'язування міченої мішені із зондом конкурентно інгібується надлишком неміченої мішені. Термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язується з" або є "специфічним для" конкретного

поліпептиду або епітопа на конкретній поліпептидній мішені, як використовують в даній заявці, може бути продемонстрований, наприклад, молекулою, що має K_d для мішені, яка дорівнює щонайменше приблизно 10^{-4} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-5} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-6} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-7} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-8} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-9} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-10} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-11} М, альтернативно щонайменше приблизно 10^{-12} М, або вище. У одному варіанті здійснення, термін "специфічне зв'язування" стосується зв'язування, де молекула зв'язується з конкретним поліпептидом або епітопом на конкретному поліпептиді без істотного зв'язування з будь-яким іншим поліпептидом або поліпептидним епітопом.

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, які "інгібують ріст пухлинних клітин, які експресують поліпептид ТАТ" або "інгібуючі ріст" антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, являють собою молекулу, яка приводить в результаті до вимірюваного інгібування росту ракових клітин, які експресують або надекспресують відповідний поліпептид ТАТ. Поліпептид ТАТ може являти собою трансмембранний поліпептид, який експресується на поверхні ракової клітини, або може являти собою поліпептид, який продукується і секретується раковою клітиною. Переважні інгібуючі ріст антитіла проти ТАТ, олігопептиди або органічні молекули інгібують ріст ТАТ-експресуючих пухлинних клітин на більше ніж 20 %, переважно, від приблизно 20 % до приблизно 50 %, і навіть більш переважно, на більше ніж 50 % (наприклад, від приблизно 50 % до приблизно 100 %) в порівнянні з відповідним контролем, контролем звичайно є пухлинні клітини, не оброблені тестованим антитілом, олігопептидом або іншою органічною молекулою. У одному варіанті здійснення, інгібування росту може бути виміряно при концентрації антитіла, яка дорівнює приблизно від 0,1 до 30 мкг/мл або приблизно від 0,5 нМ до 200 нМ в культурі клітин, де інгібування росту визначають через 1-10 днів після піддавання пухлинних клітин впливу антитіла. Інгібування росту пухлинних клітин *in vivo* може бути визначено різноманітними шляхами, такими, як описано в розділі Експериментальні Приклади нижче. Антитіло є інгібуючим ріст *in vivo*, якщо введення антитіла проти ТАТ при приблизно 1 мкг/кг до приблизно 100 мкг/кг маси тіла приводить в результаті до зменшення розміру пухлини або проліферації пухлинних клітин в межах приблизно від 5 днів до 3 місяців від першого введення антитіла, переважно, в межах приблизно від 5 до 30 днів.

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, які "індукують апоптоз", являють собою молекулу, яка індукує програмовану смерть клітин як визначають за допомогою зв'язування анексину V, фрагментації ДНК, стиснення клітин, дилатації ендоплазматичної мережі, фрагментації клітин і/або утворення мембранних везикул (які називаються апоптозними тільцями). Клітина звичайно являє собою клітину, яка надекспресує поліпептид ТАТ. Переважно, клітина являє собою пухлинну клітину, наприклад, клітину простати, молочної залози, яєчника, шлунка, ендометрія, легені, нирки, товстої кишки, сечового міхура. Різноманітні методи є доступними для оцінки клітинних подій, пов'язаних з апоптозом. Наприклад, транслокація фосфатидилсерину (ФС) може бути виміряна за допомогою зв'язування з анексином; фрагментація ДНК може бути оцінена за допомогою електрофоретичного розщеплення ДНК; і ядерна/хроматинова конденсація нарівні з фрагментацією ДНК може бути оцінена по будь-якому збільшенню гіподиплоїдних клітин. Переважно, антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, які індукують апоптоз, являють собою молекулу, яка приводить в результаті до приблизно 2-50 кратної, переважно, приблизно 5-50 кратної, і найбільш переважно, приблизно 10-50 кратної, індукції зв'язування анексину відносно необроблених клітин в аналізі зв'язування анексину.

"Ефекторні функції" антитіла стосуються біологічної активності, характерної для Fc-області (Fc-область нативної послідовності або варіантна Fc-область амінокислотної послідовності) антитіла, і змінюються разом з ізотипом антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: C1q зв'язування і комплементзалежна цитотоксичність; зв'язування з Fc рецептором; антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; заперечна негативна модуляція рецепторів поверхні клітини (наприклад, рецептора В клітин); і активація В клітин.

"Антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність" або "ADCC" стосується форми цитотоксичності, в якій секретований Ig, зв'язаний на Fc рецепторах (FcR), присутній на певних цитотоксичних клітинах (наприклад, природних кілерних (NK) клітинах, нейтрофілах і макрофагах) роблять можливим для цих цитотоксичних ефекторних клітин зв'язуватися специфічно з антиген-несучою цільовою клітиною і в подальшому знищувати цільову клітину цитотоксинами. Антитіла "озброюють" цитотоксичні клітини, і абсолютно потрібні для такого знищення. Первинні клітини для опосередкування ADCC, клітини NK, експресують тільки

FcγRIII, в той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гемопоетичних клітинах представлена в узагальненому вигляді в Таблиці 3 на сторінці 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Для оцінки ADCC активності молекул, що представляють інтерес, може здійснюватися аналіз ADCC *in vitro*, такий як описаний в патенті США № 5500362 або 5821337. Застосовні ефекторні клітини для таких аналізів включають моноядерні клітини периферичної крові (PBMC) і природні кілерні (NK) клітини. Альтернативно, або додатково, ADCC активність молекул, що представляють інтерес, може бути оцінена *in vivo*, наприклад, на тваринній моделі, такий як розкрита в Clynes et al. (USA) 95:652-656 (1998).

"Fc рецептор" або "FcR" описує рецептор, який зв'язується з Fc-областю антитіла. Переважний FcR являє собою нативну послідовність FcR людини. Крім того, переважний FcR є рецептором, який зв'язується з IgG антитілом (гамма рецептор) і включає рецептори підкласів FcγRI, FcγRII і FcγRIII, що включають алельні варіанти і альтернативно сплайсовані форми цих рецепторів. FcγRII рецептори включають FcγRIIA ("активуючий рецептор") і FcγRIIB ("інгібуючий рецептор"), які мають схожі амінокислотні послідовності, які відрізняються передусім по їх цитоплазматичних доменах. Активуючий рецептор FcγRIIA містить імунорецепторний тирозиновий активуючий мотив (ITAM) в його цитоплазматичному домені. Інгібуючий рецептор FcγRIIB містить імунорецепторний тирозиновий інгібуючий мотив (ITIM) в його цитоплазматичному домені, (див. огляд М. в Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR оглядово розглянуті в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); i de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Інші FcR, що включають ті, що будуть ідентифіковані в майбутньому, охоплені в даній заявці терміном "FcR". Термін також включає неонатальний рецептор, FcRn, який є відповідальним за перенесення материнських IgG до плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) і Kim et al, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Ефекторні клітини людини" являють собою лейкоцити, які експресуються одним або більше з FcR і здійснюють ефекторні функції. Переважно, клітини експресують щонайменше FcγRIII і здійснюють ADCC ефекторну функцію. Приклади лейкоцитів людини, які опосередковують ADCC, включають моноядерні клітини периферичної крові (PBMC), природні кілерні (NK) клітини, моноцити, цитотоксичні Т клітини і нейтрофіли; причому клітини PBMC і NK є переважними. Ефекторні клітини можуть бути виділені з природного джерела, наприклад, з крові.

"Комплементзалежна цитотоксичність" або "CDC" стосується лізису цільових клітин в присутності комплементу. Активація класичного шляху комплементу ініціюється за допомогою зв'язування першого компонента системи комплементу (C1q) з антитілами (відповідного підкласу), які зв'язані з їх когнатним антигеном. Для оцінки активації комплементу, може здійснюватися аналіз CDC, наприклад, як описаний в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Терміни "рак" і "ракові" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який типово характеризується за допомогою нерегульованого росту клітин. Приклади раку включають, але не обмежені лише ними, злоякісні стани карциноми, лімфоми, бластоми, саркоми і лейкомія або лімфоїдні. Більш конкретні приклади таких раків включають рак сквамозних клітин (наприклад, рак епітеліальних сквамозних клітин), рак легень, що включає дрібноклітинний рак легень, недрібноклітинний рак легень, аденокарциному легень і сквамозну карциному легень, рак черевної порожнини, гепатоклітинний рак, шлунковий або рак шлунка, що включає шлунково-кишковий рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, рак сечовивідних шляхів, гепатому, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак прямої кишки, колоректальний рак, карциному ендометрія або матки, карциному слинних залоз, рак нирки або ренальний рак, рак простати, вульварний рак, рак щитовидної залози, карциному печінки, анальну карциному, пенільну карциному, меланому, множинна мієлому і В-клітинну лімфому, рак мозку, а також рак голови і шиї і пов'язані метастази.

Терміни "клітинне проліферативне порушення" і "проліферативне порушення" стосуються порушень, які пов'язані з деякою мірою проліферації аномальних клітин. У одному варіанті здійснення, клітинне проліферативне порушення являє собою рак.

"Пухлина", як використовують в даній заявці, стосується росту і проліферації всіх неопластичних клітин, або злоякісних або доброякісних, і всіх передракових і ракових клітин і тканин.

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, яка "індукує смерть клітин" являє собою молекулу, яка викликає перетворення життєздатних клітин в нежиттєздатні. Клітина являє

собою клітину, яка експресує поліпептид ТАТ, переважно, клітину, яка надекспресує поліпептид ТАТ, в порівнянні з нормальною клітиною такого ж типу тканини. Поліпептид ТАТ може являти собою трансмембранний поліпептид, який експресується на поверхні ракових клітин або може являти собою поліпептид, який продукується і секретується раковою клітиною. Переважно, клітина являє собою ракову клітину, наприклад, клітину молочної залози, яєчника, шлунку, ендометрія, слинної залози, легені, нирки, товстої кишки, щитовидної залози, підшлункової залози або сечової міхура. Смерть клітин *in vitro* може бути визначена за відсутності комплементних і імунних ефекторних клітин, щоб розрізнити смерть клітин, яка індукується антитіло-залежною клітинно-опосередкованою цитотоксичністю (ADCC) або комплементзалежною цитотоксичністю (CDC). Таким чином, аналіз на смерть клітин може здійснюватися з використанням сироватки, інактивованої нагріванням (тобто, за відсутності комплементу) і за відсутності імунних ефекторних клітин. Щоб визначити, чи здатні антитіло, олігопептид або інша органічна молекула індукувати смерть клітин, втрата цілісності мембрани, як оцінюють за допомогою поглинання пропідіййодиду (PI), трипанового синього (див. Moore et al. *Cytotechnology* 17: 1-11 (1995)) або 7AAD може оцінюватися по відношенню до необроблених клітин. Переважні антитіла, олігопептиди або інші органічні молекули, що індукують смерть клітин, являють собою молекули, які індукують поглинання PI в аналізі поглинання PI клітинами BT474.

"ТАТ-експресуюча клітина" являє собою клітину, яка експресує ендегенний або трансфікований поліпептид ТАТ або на клітинній поверхні або в секретованій формі. "ТАТ-експресуючий рак" являє собою рак, що містить клітини, які мають поліпептид ТАТ, присутній на клітинній поверхні або які продукують і секретують поліпептид ТАТ. "ТАТ-експресуючий рак" необов'язково продукує достатні рівні поліпептиду ТАТ на поверхні його клітин, таким чином, що антитіло проти ТАТ, олігопептид або інша органічна молекула можуть зв'язуватися з ним і мати терапевтичний ефект по відношенню до раку. У ще одному варіанті здійснення, "ТАТ-експресуючий рак" необов'язково продукує і секретує достатні рівні поліпептиду ТАТ, таким чином, що антитіло проти ТАТ, олігопептид або антагоністична інша органічна молекула можуть зв'язуватися з ним і мати терапевтичний ефект по відношенню до раку. Відносно останнього, антагоніст може являти собою антисмисловий олігонуклеотид, який знижує, інгібує або запобігає виробленню і секретії секретованого поліпептиду ТАТ пухлинними клітинами. Рак, який "надекспресує" поліпептид ТАТ, являє собою рак, який має істотно більш високі рівні поліпептиду ТАТ на поверхні його клітин або продукує і секретує, в порівнянні з нераковою клітиною такого ж типу тканини. Така надекспресія може бути викликана ампліфікацією гена або за допомогою збільшеної транскрипції або трансляції. Надекспресія поліпептиду ТАТ може бути визначена в діагностичному або прогностичному аналізі за допомогою оцінки збільшених рівнів ТАТ білка, присутнього на поверхні клітини, або секретованого клітиною (наприклад, за допомогою імуногістохімічного аналізу з використанням антитіл проти ТАТ, отриманих проти виділеного поліпептиду ТАТ, який може бути отриманий з використанням технології рекомбінантної ДНК з виділеної нуклеїнової кислоти кодуючої поліпептид ТАТ; аналізу FACS, і т.д.). Альтернативно, або додатково, можна виміряти рівні поліпептид ТАТ-кодуючої нуклеїнової кислоти або мРНК в клітині, наприклад, за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* з використанням зонда на основі нуклеїнової кислоти, відповідного ТАТ-кодуючій нуклеїновій кислоті або її комплементу; (FISH; див. W098/45479, публікація жовтень, 1998), саузерн-блотинга, нозерн-блотинга або методів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), таких як кількісна ПЛР в реальному часі (RT-ПЛР). Можна також дослідити надекспресію поліпептиду ТАТ за допомогою вимірювання "злуценого" антигена в біологічній рідині, такий як сироватка, наприклад, з використанням аналізів на основі антитіл (див. також, наприклад, патент США № 4933294, виданий 12 червня, 1990; WO91/05264, опублікований 18 квітня, 1991; патент США № 5401638, виданий 28 березня 28, 1995; і Sais et al, *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). Крім вказаних вище аналізів, різноманітні аналізи *in vivo* є доступними для кваліфікованого практика. Наприклад, можна піддати клітини в організмі пацієнта впливу антитіла, який необов'язково мітять міткою, що виявляється, наприклад, радіоактивним ізотопом, і зв'язування антитіла з клітинами у пацієнта можна оцінити, наприклад, за допомогою зовнішнього сканування радіоактивності або за допомогою аналізу біопсійної проби, взятої від пацієнта, раніше підданому впливу антитіла.

Як використовують в даній заявці, термін "імуноадгезин" означає антитіло-подібну молекулу, яка поєднує специфічність зв'язування гетерологічного білка ("адгезину") з ефекторними функціями постійних доменів імуноглобуліну. Структурно, імуноадгезини містять злиття амінокислотної послідовності з бажаною специфічністю зв'язування, яка є іншою, ніж розпізнавання антигена і ділянка зв'язування антитіла (тобто, є "гетерологічною"), і

послідовності постійного домену імуноглобуліну. Адгезинова частина молекули імуноадгезину звичайно накладається на амінокислотну послідовність, що містить щонайменше ділянку зв'язування рецептора або ліганду. Послідовність постійного домену імуноглобуліну в імуноадгезині може бути отримана від будь-якого імуноглобуліну, такого як підтипи IgG-1, IgG-2, IgG-3 або IgG-4, IgA (включаючи IgA-1 і IgA-2), IgE, IgD або IgM.

Слово "мітка", коли використовується в даній заявці, стосується виявлюваних сполуки або композиції, які є кон'югованими безпосередньо або опосередковано з антитілом, олігопептидом або іншою органічною молекулою, так, щоб генерувати "мічені" антитіло, олігопептид або іншу органічну молекулу. Мітка може бути такою, що виявляється сама по собі (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або, у разі ферментативної мітки, може каталізувати хімічну зміну субстратної сполуки або композиції, яка є такою, що виявляється.

Термін "цитотоксичний агент", як використовують в даній заявці, стосується речовини, яка інгібує або запобігає функції клітини і/або викликає деструкцію клітини. Мають на увазі, що термін включає радіоактивні ізотопи (наприклад, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні агенти, ферменти і їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти, антибіотики і токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактерійного, грибового, рослинного або тваринного походження, що включають фрагменти і/або їх варіанти, і різноманітні протипухлинні або протиракові агенти, розкриті нижче. Інші цитотоксичні агенти описані нижче. Туморицидний агент викликає деструкцію пухлинної клітини.

"Хіміотерапевтичний агент" являє собою хімічну сполуку, застосовну для лікування раку. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілюючі агенти, такі як тіотепа і CYTOXAN® циклофосфамід; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодоба, карбоквон, метуредоба і уредоба; етиленіміни і метиламеламіни, що включають алтретамін, триетилномеламін, триетилномфосфамід, триетилентіофосфамід і триметилломеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацинон); дельта-9-тетрагідроканабінол (дронабінол, MARINOL®); бета-лапакон; лапакон; колхіцини; бетулінова кислота; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин, і 9-амінокамптотецин); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); подофілотоксин; подофілінову кислоту; теніпозид; криптофіцини (особливо, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктіїн; спонгістатин; мустаргени, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміну, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урацильний мустард; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динеміцин, включаючи динеміцин А; еспераміцин; а також неокарзиностатинний хромофор і споріднені хромопротеїнові хромофори енедіїнових антибіотиків), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карминоміцин, карзинофілін, хромоміциніс, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, АДРІАМІЦИН® доксорубіцин (включаючи морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин і деоксидоксорубіцин), епірубіцин, есорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини такі як мітоміцин С, мікофенольна кислота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; анти-метаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринів, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміпурин, тіогуанін; аналоги піримідинів, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, пропіонат дромостанолону, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; проти-адреналіни, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; компенсатор фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; глікозид альдофосфаміду; амінолевулінова кислота; енілурацил; амсакрин; бетрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітин; еліптініуму ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідаїн; майтансіноїди, такі як майтансин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; 2-етилгідрозид; прокарбазин; PSK® полісахаридний комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій;

тєнуазонова кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (особливо T-2 токсин, веракурин А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); тіотеапа; таксоїди, наприклад, TAXOL® паклітаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ без Кремофор, сконструйована з альбуміну лікарська форма наночастинок паклітакселу (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) і TAXOTERE® доцетаксел (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабін (GEMZAR®); 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин (VELBAN®); платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрисдин (ONCOVIN®); оксаліплатин; лейкововин; вінорелбін (NAVELBINE®); новантрон; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; диформетилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноєва кислота; капецитабін (XELODA®); фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з приведених вище; а також комбінації двох або більше з приведених вище, такі як CHOP, аббревіатура для комбінованої терапії циклофосфаміду, доксорубіцину, вінкрисдину і преднізолону, і FOLFOX, аббревіатура для режиму лікування оксаліплатином (ELOXATIN™), комбінованого з 5-ФУ і лейкововином.

Також включеними в це визначення є антигормональні агенти, які діють, щоб регулювати, знижувати, блокувати або інгібувати ефекти гормонів, які можуть сприяти росту раку, і часто знаходяться в формі системного лікування або лікування всього організму. Вони самі можуть бути гормонами. Приклади включають антиестрогени і селективні модулятори рецепторів естрогенів (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи NOLVADEX® тамоксифен), EVISTA® ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, і FARESTON® тореміфен; антипрогестерони; знижувальні регулятори рецепторів естрогенів (ERD); агенти, які функціонують, щоб придушити або зупинити роботу яєчників, наприклад, агоністи лютеїнізуючого гормону-вивільняючого гормону (LHRH), такі як LUPRON® і ELIGARD® леупроліду ацетат, гoserеліну ацетат, бусереліну ацетат і триптерелін; інші антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід і бікалутамід; і інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, який регулює вироблення естрогенів в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглютетимід, MEGASE® мегестролу ацетат, AROMASIN® екземестан, форместани, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол, і ARIMIDEX® анастрозол. Додатково, таке визначення хімотерапевтичних агентів включає бысфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS® або OSTAC®), DIDROCAL® етидронат, NE-58095, ZOMETA® золедронову кислоту/золедронат, FOSAMAX® алендронат, AREDIA® памідронат, SKELID® тилудронат, або ACTONEL® ризедронат; а також троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, особливо ті, які інгібують експресію генів в сигнальних шляхах, залучених в проліферації аберантних клітин, такі як, наприклад, PKC-альфа, Raf, H-Ras, і рецептор епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як THERATOPE® вакцина і вакцини генної терапії, наприклад, ALLOVECTIN® вакцина, LEUVECTIN® вакцина, і VAXID® вакцина; LURTOTECAN® інгібітор топоізомерази 1; ABARELIX® gmRH; лапатинібу дитозилат (ErbB-2 і EGFR подвійний низькомолекулярний інгібітор тирозинкінази, також відомий як GW572016); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з приведених вище.

"Агент, який інгібує ріст", коли використовують в даній заявці, стосується сполуки або композиції, які інгібують росту клітини, особливо TAT-експресуючої ракової клітини, або in vitro або in vivo. Таким чином, агент, інгібуючий ріст, може являти собою агент, який значно знижує процентний вміст TAT-експресуючих клітин в S фазі. Приклади агентів, які інгібують ріст, включають агенти, які блокують розвиток клітинного циклу (в місці, відмінному від S фази), такі як агенти, які індують блокування G1 і M-фази. Класичні блокатори M-фази включають алкалоїди барвінку (вінкрисдин і вінбластин), таксани і інгібітори топоізомерази II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Такі агенти, які блокують G1, також виходять за межі в блокуванні S-фази, наприклад, ДНК-алкілюючі агенти, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил, і ара-С. Додаткову інформацію можна знайти в Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, "entitled Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особливо р. 13. Таксани (паклітаксел і доцетаксел) являють собою протиракові лікарські засоби, обидва з яких отримують з тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), отриманий з Європейського тису, являє собою напівсинтетичний аналог паклітакселу (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклітаксел і доцетаксел ініціюють збирання мікротрубочок з димерів тубуліну і стабілізують мікротрубочки за допомогою запобігання деполімеризації, яке приводить в результаті до інгібування мітозу в клітинах.

"Доксорубіцин" являє собою антрацикліновий антибіотик. Повне хімічне найменування доксорубіцину являє собою (8S-cis)-10-[(3-аміно-2,3,6-тридезоксид- α -L-ліксогексапіранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагідро-6,8,11-тригідрокси-8-(гідроксіацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендіон.

Термін "цитокін" являє собою родовий термін для білків, що вивільняються, однієї клітинної популяції, які діють на ще одну іншу клітину як міжклітинні медіатори. Прикладами таких цитокінів є лімфокіни, монокіни і традиційні поліпептидні гормони. Включеними в ряд цитокінів є гормон росту, такий як гормон росту людини, N-метіонільний гормон росту людини і бичачий гормон росту; гормон парашитовидної залози; тироксин; інсулін; проінсулін; релаксин; прорелаксин; глікопротеїнові гормони, такі як фолікулостимулюючий гормон (FSH), стимулюючий гормон щитовидної залози (TSH) і лютеїнізуючий гормон (LH); печінковий фактор росту; фібробластний фактор росту; пролактин; плацентарний лактоген; фактор некрозу пухлини- α і - β ; міллерівська інгібуюча субстанція; мишачий гонадотропін-зв'язаний пептид; інгібін; активін; судинний ендотеліальний фактор росту; інтегрин; тромбопоетин (TPO); фактори росту нервів, такі як NGF- β ; тромбоцитарний фактор росту; трансформуючі фактори росту (TGF), такі як TGF- α і TGF- β ; інсуліноподібний фактор росту-I і -II; еритропоетин (EPO); остеоіндуктивні фактори; інтерферони, такі як інтерферон- α , - β і - γ ; колонієстимулюючі фактори (CSF) такі як макрофаг-CSF (M-CSF); гранулоцит-макрофаг-CSF (GM-CSF); і гранулоцит-CSF (G-CSF); інтерлейкіни (IL), такі як IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; фактори некрозу пухлини, такі як TNF- α або TNF- β ; і інші поліпептидні фактори, включаючи LIF і набірний ліганд (KL). Як використовують в даній заявці, термін цитокін включає білки з природних джерел або культури рекомбінантних клітин і біологічно активних еквівалентів нативних послідовностей цитокінів.

Термін "листок-вкладиш" застосовують для позначення інструкцій, звичайним чином включені в промислові упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про дані, застосування, дозування, введення, протипоказання і/або застереження, що стосуються застосування таких терапевтичних продуктів.

II. Композиції і способи винаходу

A. Антитіла проти ТАТ

У одному варіанті здійснення, даний винахід надає антитіла проти ТАТ, які можуть знайти застосування в даній заявці як терапевтичні і/або діагностичні агенти. Зразкові антитіла включають поліклональні, моноклональні, гуманізовані, біспецифічні і гетерокон'югатні антитіла.

1. Поліклональні антитіла

Поліклональні антитіла, переважно, індукуються у тварин за допомогою множинних підшкірних (sc) або внутрішньочеревинних (ip) ін'єкцій відповідного антигена і ад'юванта. Може бути застосовним кон'югувати відповідний антиген (особливо, коли застосовують синтетичні пептиди) з білком, який є імуногенним у вида, що підлягає імунізації. Наприклад, антиген може бути кон'югований з гемоціаніном лімфи равлика (KLH), альбуміном сироватки, бичачим тироглобуліном або соєвим трипсиновим інгібітором, з використанням біфункціонального або дериватизуючого агента, наприклад, малеїмідобензоїлсульфосукцинімідного складного ефіру (кон'югація через цистеїнові залишки), N-гідроксисукциніміду (через лізинові залишки), глютаральдегіду, ангідриду бурштинової кислоти, SOCl_2 або $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, де R і R_1 є різними алкільними групами.

Тварин імунізують проти антигена, імуногенних кон'югатів або похідних за допомогою комбінування, наприклад, 100 мкг або 5 мкг білка або кон'югата (для кроликів або мишей, відповідно) з 3 об'ємами повного ад'юванта Фрейнда і ін'єкції розчину внутрішньошкірно у множину ділянок. Через один місяць, тварин повторно імунізують від 1/5 до 1/10 вихідної кількості пептиду або кон'югата в повному ад'юванті Фрейнда за допомогою підшкірної ін'єкції у множину ділянок. Через сім - 14 днів, у тварин проводять відбір крові і сироватку аналізують на титр антитіл. Тварин повторно імунізують, поки не досягають плато титру. Кон'югати також можуть бути отримані в рекомбінантній клітинній культурі як гібриди білків. Також, агрегуючі агенти, такі як галуни, відповідним чином застосовують для посилення імунної відповіді.

2. Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла можуть бути отримані з використанням гібридомного методу, уперше описаного Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), або можуть бути отримані за допомогою методів рекомбінантних ДНК (патент США № 4816567).

У гібридомному методі, мишу або іншу відповідну тварину-хазяїна, таку як хом'як, імунізують, як описано вище, щоб активувати лімфоцити, які продукують або мають здатність продукувати антитіла, які будуть специфічно зв'язуватися з білком, що застосовується для імунізації. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*. Після імунізації,

лімфоцити виділяють і потім гібридизують з лінією клітин мієломи з використанням відповідного агента злиття, такого як поліетилєнглїколь, з утворенням гібридомної клітини (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Гібридомні клітини, отримані таким чином, висівають і вирощують у відповідному культуральному середовищі, причому середовище, переважно, містить одну або більше речовин, які інгібують ріст або виживання негібридизованих, батьківських клітин мієломи (що також називаються партнером злиття). Наприклад, якщо батьківські клітини мієломи не мають ферменту гіпоксантингуанїнфосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), селективне культуральне середовище для гібридом звичайно буде включати гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (HAT середовище), речовини, які перешкоджають росту HGPRT-дефіцитних клітин.

Переважні партнерські клітини мієломи для злиття являють собою клітини, які ефективно гібридизуються, підтримують стабільне на високому рівні вироблення антитіл за допомогою вибраних антитіло-продукуючих клітин, і є чутливими до селективного середовища, яке направлене проти негібридизованих батьківських клітин. Переважні лінії клітин мієломи являють собою лінії мишачої мієломи, такі як лінії, які походять від мишачих пухлин MOPC-21 і MPC-11, доступних від Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, і SP-2 і походять від, наприклад, клітин X63-Ag8-653, доступних від Американської Колекції Типових Культур, Manassas, Virginia, USA. Лінії клітин мієломи людини і клітин миші-людини також були описані для вироблення моноклональних антитіл людини (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); і Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральне середовище, в якому гібридомні клітини ростуть, аналізується на предмет вироблення моноклональних антитіл, направлених проти антигена. Переважно, специфічність зв'язування моноклональних антитіл, які продукуються гібридомними клітинами, визначають за допомогою імунопреципітації або за допомогою аналізу зв'язування *in vitro*, такого як радіоімуноаналіз (RIA) або фермент-зв'язаний імуносорбентний аналіз (ELISA).

Спорідненість зв'язування моноклонального антитіла може, наприклад, бути визначена за допомогою аналізу Скетчарда, описаного в Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Як тільки гібридомні клітини, які продукують антитіла з бажаними специфічністю, спорідненістю і/або активністю ідентифікують, клони можуть бути субклоновані за допомогою методик обмежуючого розбавлення і вирощені за допомогою стандартних способів (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Відповідні культуральні середовища для цієї мети включають, наприклад, середовища D-MEM або RPMI-1640. Додатково, гібридомні клітини можуть бути вирощені *in vivo* у вигляді асцитів пухлин в тварині наприклад, за допомогою і.р. ін'єкції клітин в мишу.

Моноклональні антитіла, секретовані субклонами, відповідним чином відділяють від культурального середовища, асцитної рідини або сироватки за допомогою загальноприйнятих методик очищення антитіл, таких як, наприклад, афінна хроматографія (наприклад, з використанням білка А- або білка G-Сефарози) або іонообмінної хроматографії, хроматографії на гідроксіпатиті, гель-електрофорезу, діалізу і т.д.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, легко виділяють і секвенують з використанням загальноприйнятих методик (наприклад, за допомогою використання олігонуклеотидних зондів, які мають здатність зв'язуватися специфічно з генами, що кодують важкі і легкі ланцюги мишачих антитіл). Гібридомні клітини служать як переважне джерело такої ДНК. Як тільки її виділяють, ДНК можна вмістити в експресійні вектора, які потім трансфікують в клітини-хазяї, такі як клітини *E. coli*, клітини мавпячої COS, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), або клітини мієломи, які не продукують іншим чином білок антитіл, щоб отримати синтез моноклональних антитіл в рекомбінантних клітинах-хазяях. Оглядові статті по рекомбінантній експресії в бактеріях ДНК, що кодують антитіло, включають Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) і Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

У додатковому варіанті здійснення, моноклональні антитіла або фрагменти антитіл можуть бути виділені з бібліотек фагових антитіл, що генеруються з використанням методів, описаних у McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al, *Nature*, 352:624-628 (1991) і Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) описують виділення антитіл миші і людини, відповідно, з використанням бібліотек фагів. Подальші публікації описують вироблення антитіл людини з високою спорідненістю (нМ діапазон) за допомогою перетасовування ланцюгів (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а також комбінаторної інфекції і рекомбінації *in vivo* як стратегії для конструювання дуже великих бібліотек фагів (Waterhouse et al, *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). Таким чином, ці методи є життєздатними альтернативами традиційним

гібридомним методам отримання моноклональних антитіл для виділення моноклональних антитіл.

ДНК, яка кодує антитіло, може бути модифікована для вироблення химерних або гібридних поліпептидів антитіла, наприклад, за допомогою заміни послідовностей людини константних доменів з важким ланцюгом і з легким ланцюгом (CH і CL) на гомологічні мишачі послідовності (патент США № 4816567; і Morrison, et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), або за допомогою гібридизації послідовності, яка кодує імуноглобулін зі всією кодуючою послідовністю для неімуноглобулінового поліпептиду (гетерологічного поліпептиду) або її частиною. Послідовності неімуноглобулінового поліпептиду можуть замінювати константну домени антитіла, або їх замінюють на варіабельні домени однієї антиген-комбінуючої ділянки антитіла для створення химерного бівалентного антитіла, що містить одну антиген-комбінуючу ділянку, що має специфічність для антигена, і ще одну іншу антиген-комбінуючу ділянку, що має специфічність для відмінного антигена.

3. Антитіла людини і гуманізовані антитіла

Антитіла проти ТАТ даного винаходу можуть додатково містити гуманізовані антитіла або антитіла людини. Гуманізовані форми нелюдських (наприклад, мишачих) антитіл являють собою химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ або інші антиген-зв'язувальні субпослідовності антитіл), які містять мінімальну послідовність, яка походить від нелюдського імуноглобуліну. Гуманізовані антитіла включають імуноглобуліни людини (реципієнтне антитіло), в якій залишки від області, що визначає комплементарність, (CDR) реципієнта замінені на залишки з CDR нелюдського виду (донорне антитіло), такого як миша, щур або кролик, що має бажану специфічність, спорідненість і потенціал. У деяких випадках, Fv каркасні залишки імуноглобуліну людини замінені на відповідні нелюдські залишки. Гуманізовані антитіла можуть також містити залишки, які не виявлені ні в реципієнтному антитілі, ні в імпортованих CDR або каркасних послідовностях. У загальному випадку, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі з щонайменше одного, і звичайно двох, варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі з CDR областей відповідають областям нелюдського імуноглобуліну і всі або по суті всі з FR областей є областями консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло оптимально також буде містити щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), звичайно області імуноглобуліну людини [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature, 332:323-329 (1988); і Presta, Curr. Op. Struct. Biol, 2:593-596 (1992)].

Способи гуманізації нелюдських антитіл є добре відомими в даній галузі. Звичайно, гуманізоване антитіло має один або більше амінокислотних залишків, введених в нього з джерела, яке є нелюдським. Ці нелюдські амінокислотні залишки часто називають "імпортними" залишками, які звичайно беруться з "імпортного" варіабельного домену. Гуманізація може бути по суті виконана, слідуючи способу Winter і сотр. [Jones et al, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al, Science, 239: 1534-1536 (1988)], за допомогою заміни послідовностей CDR або CDR гризунів на відповідні послідовності антитіла людини. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла являють собою химерні антитіла (патент США № 4816567), де значно менше, ніж інтактний варіабельний домен людини був замінений на відповідну послідовність від нелюдського виду. На практиці, гуманізовані антитіла являють собою типово антитіла людини, в яких деякі CDR залишки і можливо деякі FR залишки є заміненими на залишки з аналогічних ділянок в антитілах гризунів.

Вибір варіабельних доменів людини, як легких, так і важких, для застосування в отриманні гуманізованих антитіл є дуже важливим для зниження антигенності і НАМА відповіді (антитіла людини проти миші), коли антитіло призначене для людського терапевтичного застосування. Відповідно до так званого "найкращим чином підбраного" способу, послідовність варіабельного домену антитіл гризуна скринують проти повної бібліотеки відомих послідовностей варіабельних доменів людини. V домен людини, послідовність якого є найбільш близькою до послідовності гризуна, ідентифікований і каркасна область (FR) людини всередині нього прийнята для гуманізованого антитіла (Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia et al, J. Mol. Biol, 196:901 (1987)). У ще одному іншому способі застосовують конкретну каркасну область, яка походить від консенсусної послідовності всіх антитіл людини конкретної підгрупи легких або важких ланцюгів. Такий же каркас може застосовуватися для декількох різних гуманізованих антитіл (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al, J. Immunol. 151: 2623 (1993)).

Додатково є важливим, що антитіла були гуманізовані із збереженням високої спорідненості зв'язування для антигена і інших сприятливих біологічних властивостей. Для досягнення цієї мети, відповідно до переважного способу, гуманізовані антитіла отримують за допомогою

процесу аналізу батьківських послідовностей і різноманітних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей батьківських і гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імуноглобулінів є загальнодоступними і знайомі кваліфікованим фахівцям в даній галузі. Доступними є комп'ютерні програми, які ілюструють і візуалізують ймовірні

5 тривимірні конформаційні структури вибраних кандидатних послідовностей імуноглобулінів. Розгляд цих візуалізацій дозволяє провести аналіз ймовірної ролі залишків в функціонуванні кандидатних послідовностей імуноглобулінів, тобто, аналіз залишків, які впливають на здатність кандидатного імуноглобуліну зв'язувати його антиген. Таким чином, FR залишки можуть бути вибрані і об'єднані з реципієнтної і імпортної послідовностей так, щоб досягалася бажана

10 характеристика антитіла, така як збільшена спорідненість до цільового антигену(антигенів). У загальному випадку, залишки гіперваріабельної області є безпосередньо і найбільш значно залучені до впливу на зв'язування антигена.

Розглядаються різноманітні форми гуманізованих антитіл проти ТАТ. Наприклад, гуманізоване антитіло може являти собою фрагмент антитіла, такий як Fab, який є

15 необов'язково кон'югованим з одним або більше цитотоксичним агентом(агентами), щоб генерувати імунокон'югат. Альтернативно, гуманізоване антитіло може являти собою інтактне антитіло, таке як інтактне антитіло IgG1.

Як альтернатива гуманізації, можуть бути генеровані антитіла людини. Наприклад, в цей час можливо отримувати трансгенних тварин (наприклад, мишей), які здатні, при імунізації, до

20 продукування повного набору антитіл людини за відсутності вироблення ендогенних імуноглобулінів. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена з'єднуючої області з важким ланцюгом антитіла (JH) в химерних і мутантних мишах зародкової лінії приводить в результаті до повного інгібування ендогенного вироблення антитіл. Перенесення генної матриці імуноглобуліну людини зародкової лінії у таких мутантних мишей зародкової лінії буде

25 приводити в результаті до вироблення антитіл людини при стимуляції антигеном. Див., наприклад, Jakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al, Year в Immuno. 7:33 (1993); патенти США №№ 5545806, 5569825, 5591669 (всі від GenPharm); 5545807; і WO 97/17852.

Альтернативно, технологія фагового відображення (McCafferty et al, Nature 348:552-553

30 [1990]) може застосовуватися для вироблення антитіл людини і фрагментів антитіл in vitro, з наборів генів варіабельного (V) домену імуноглобуліну від неімунізованих донорів. Відповідно до цього методу, гени домену V антитіла клонують всередині рамки в або основний або мінорний ген покриваючого білка ниткоподібного бактеріофага, такого як M13 або fd, і відображаються у вигляді функціональних фрагментів антитіла на поверхні частинок фагу. Оскільки ниткоподібна частинка містить одониткову копію ДНК генома фагу, селекції на основі

35 функціональних властивостей антитіл також приводять в результаті до селекції гена, що кодує антитіло, що виявляє ці властивості. Таким чином, фаг імітує деякі з властивостей В-клітини. Відображення фагу може здійснюватися в різноманітних форматах, розглянутих в огляді, наприклад, у Johnson, Kevin S. і Chiswell, David J., Current Opinion в Structural Biology 3:564-571

40 (1993). Деякі джерела сегментів V-гена можуть застосовуватися для відображення фагу. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) виділив різноманітний повтор антитіл проти оксазолону з невеликої статистичної комбінаторної бібліотеки V генів, отриманих з селезінок імунізованих мишей. Може бути побудований набір V генів від неімунізованих донорів людини, і антитіла до різноманітного повтору антигенів (включаючи само-антигени) може бути виділений,

45 по суті слідуючи методам, описаним Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), або Griffith et al, EMBO J. 12:725-734 (1993). Див., також, патенти США №№ 5565332 і 5573905.

Як обговорюється вище, антитіла людини також можуть генеруватися за допомогою активованих in vitro В клітин (див. патенти США №№ 5567610 і 5229275).

4. Фрагменти антитіл

50 При деяких обставинах існують переваги використання фрагментів антитіл, в більшій мірі, ніж цілих антитіл. Більш дрібний розмір фрагментів забезпечує швидке виведення, і може приводити до поліпшеного доступу до солідних пухлин.

Різнманітні методи були розроблені для отримання фрагментів антитіл. Традиційно, ці

55 фрагменти проводили за допомогою протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto et al., Journal Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); і Brennan et al, Science, 229:81 (1985)). Однак, ці фрагменти в цей час можуть бути отримані безпосередньо за допомогою рекомбінантних клітин-хазяїв. Fab, Fv і ScFv фрагменти антитіл можуть всі експресуватися в і секретуватися з E. coli, таким чином, забезпечуючи просте отримання великих кількостей цих фрагментів. Фрагменти антитіл можуть бути виділені з

60 фагових бібліотек антитіл, що обговорюється вище. Альтернативно, Fab'-SH фрагменти можуть

бути безпосередньо витягнуті з *E. coli* і хімічно зв'язані з утворенням фрагментів $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Відповідно до ще одного підходу, $F(ab')_2$ фрагменти можуть виділятися безпосередньо з культури рекомбінантних клітин-хазяїв. Фрагмент Fab і $F(ab')_2$ із збільшеним періодом напівжиття *in vivo*, що містить залишки епітопа зв'язування рецептора порятунку, описаний в патенті США № 5869046. Інші методи отримання фрагментів антитіла будуть очевидними для досвідченого практика. У інших варіантах здійснення, антитіло вибору являє собою одноланцюжковий Fv фрагмент (scFv). Див. WO 93/16185; патент США № 5571894; і патент США № 5587458. Fv і sFv є єдиним видом з інтактними комбінуючими ділянками, які позбавлені константної області; таким чином, вони є відповідними для зниженого неспецифічного зв'язування під час застосування *in vivo*. Гібридні білки sFv можуть бути побудовані, щоб давати на виході гібридизацію ефекторного білка по або аміно- або карбоксикінцю sFv. Див. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, вище. Фрагмент антитіла також може являти собою "лінійне антитіло", наприклад, як описано в патенті США № 5641870, наприклад. Такі лінійні фрагменти антитіла можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

5. Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла являють собою антитіла, які мають специфічність зв'язування для щонайменше двох різних епітопів. Зразкові біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами TAT білка, як описано в даній заявці. Інші такі антитіла можуть поєднувати TAT-зв'язувальну ділянку з ділянкою зв'язування для ще одного іншого білка. Альтернативно, плече проти TAT може сполучатися з плечем, яке зв'язується з ініціюючою молекулою на лейкоциті, такою як молекула рецептора T-клітини (наприклад CD3), або Fc рецептори для IgG (FcγR), такі як FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) і FcγRIII (CD16), так, щоб сфокусувати і локалізувати клітинні захисні механізми по відношенню до TAT-експресуючої клітини. Біспецифічні антитіла також можуть застосовуватися для локалізації цитотоксичних агентів до клітин, яких експресують TAT. Ці антитіла мають плече TAT-зв'язування і плече, яке зв'язує цитотоксичний агент (наприклад, сапорин, анти-інтерферон-α, алкалоїд барвінку, ланцюг рицину A, метотрексат або гаптен з радіоактивним ізотопом). Біспецифічні антитіла можуть бути отримані як первинні антитіла або фрагменти антитіла (наприклад, $F(ab')_2$ біспецифічні антитіла).

WO 96/16673 описує біспецифічне антитіло проти-ErbB2/проти-FcγRIII і патент США № 5837234 розкриває біспецифічне антитіло проти-ErbB2/проти-FcγRI. Біспецифічне антитіло проти-ErbB2/Fcα показано в WO98/02463. Патент США № 5821337 викладає біспецифічне антитіло проти-ErbB2/проти-CD3.

Способи отримання біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Традиційне отримання первинних біспецифічних антитіл ґрунтується на со-експресії двох пар важкий ланцюг-легкий ланцюг імунoglobуліну, де два ланцюги мають різну специфічність (Millstein et al., *Nature* 305:537-539 (1983)). Внаслідок статистичного розподілу важких і легких ланцюгів імунoglobуліну, ці гібридами (квадроми) продукують потенційну суміш з 10 різних молекул антитіл, з яких тільки одна має коректні біспецифічні структури. Очищення коректної молекули, яке звичайно проводять за допомогою стадій афінного хроматографії, є досить трудомістким, і виходи продукту є низькими. Аналогічні методи розкриті в WO 93/08829, і в Traunecker et al, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

Відповідно до відмінного підходу, варіабельні домени антитіла з бажаною специфічністю зв'язування (комбінуючі ділянки антитіло-антиген) є рекомбінованими з послідовностями константного домену імунoglobуліну. Переважно, гібридизація протікає з константним доменом важкого ланцюга Ig, що містить щонайменше частину шарнірної, областей CH_2 і CH_3 . Є переважним мати першу константну область з важким ланцюгом (CH_1), що містить ділянку, необхідну для зв'язування легкого ланцюга, присутнього в щонайменше одному з гібридів. ДНК, що кодують гібриди важкого ланцюга імунoglobуліну, і, якщо бажано, легкий ланцюг імунoglobуліну, вводять в окремі експресійні вектори, і со-трансфікують у відповідну клітину-хазяя. Це надає значно більшу гнучкість при регулюванні взаємних пропорцій трьох поліпептидних фрагментів у варіантах здійснення, коли неоднакові співвідношення трьох поліпептидних ланцюгів, що використовуються в конструкції, забезпечують оптимальний вихід бажаного біспецифічного антитіла. Можливим, однак, є ввести кодуючі послідовності для двох або всіх трьох поліпептидних ланцюгів в одиничний експресійний вектор, коли експресія щонайменше двох поліпептидних ланцюгів в однакових співвідношеннях приводить в результаті до високих виходів, або, коли співвідношення не мають значного впливу на вихід бажаної комбінації ланцюгів.

У переважному варіанті здійснення цього підходу, біспецифічні антитіла складені з важкого ланцюга гібридного імунoglobуліну з першою специфічністю зв'язування в одному плечі, і пари

важкий ланцюг-легкий ланцюг гібридного імуноглобуліну (що надає другу специфічність зв'язування) в іншому плечі. Було виявлено, що ця асиметрична структура полегшує відділення бажаної біспецифічної сполуки від небажаних комбінацій ланцюгів імуноглобуліну, оскільки присутність легкого ланцюга імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули надає легкий шлях розділення. Цей підхід розкритий в WO 94/04690. Додаткові подробиці по генерації біспецифічних антитіл див., наприклад, Suresh et al, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

Відповідно до ще одного підходу, описаного в патенті США № 5731168, межа розділу між парою молекул антитіла може бути сконструйована для максимізації процентного вмісту гетеродимерів, які витягують з рекомбінантної клітинної культури. Переважна межа розділення містить щонайменше частину CH_3 домену. У цьому способі, один або більше невеликих амінокислотних бічних ланцюгів від межі розділення першої молекули антитіла замінюють ланцюгами більш великого розміру (наприклад, тирозин або триптофан). Компенсаторні "порожнини" ідентичного або схожого розміру до великого бічного ланцюга(ланцюгам) створюються на межі розділення другої молекули антитіла за допомогою заміни великих амінокислотних бічних ланцюгів на більш дрібні (наприклад, аланін або треонін). Це надає механізм для збільшення виходу гетеродимера в порівнянні з іншими небажаними кінцевими продуктами, такими як гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають зшиті або "гетерокон'югатні" антитіла. Наприклад, одне з антитіл в гетерокон'югаті може сполучатися з авідіном, інше з біотином. Такі антитіла були, наприклад, запропоновані для націлювання клітин імунної системи на небажані клітини (патент США № 4676980), і для лікування інфекції ВІЛ (WO 91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Гетерокон'югатні антитіла можуть бути отримані з використанням будь-яких загальноприйнятих способів зшивання. Відповідні зшиваючі агенти є добре відомими в даній галузі і розкриті в патенті США № 4676980, нарівні з рядом способів зшивання.

Методи генерації біспецифічних антитіл з фрагментів антитіл також були описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути отримані з використанням хімічного зв'язування. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) описують методику, де інтактні антитіла протеолітично розщеплюються для генерації фрагментів F(ab')_2 . Ці фрагменти відновлюють в присутності дитіольного комплексотвірного агента, арсеніту натрію, щоб стабілізувати віцинальні дитіоли і запобігти утворенню міжмолекулярного дисульфіду. Генеровані Fab' фрагменти, потім перетворюють в тіонітробензоатні (TNB) похідні. Одне з Fab' -TNB похідних потім повторно перетворюють в Fab' -тіол за допомогою відновлення меркаптоетиламіном і змішують з еквімолярною кількістю іншого Fab' -TNB похідного з утворенням біспецифічного антитіла. Отримані біспецифічні антитіла можуть застосовуватися як агенти для селективної іммобілізації ферментів.

Нещодавній прогрес полегшив пряме витягання Fab' -SH фрагментів з *E. coli*, які можуть хімічно сполучатися з утворенням біспецифічних антитіл. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) описує отримання молекули повністю гуманізованого біспецифічного антитіла F(ab')_2 . Кожний Fab' фрагмент окремо секретувався з *E. coli* і піддавався направленому хімічному сполученню *in vitro* з утворенням біспецифічного антитіла. Біспецифічне антитіло, таким чином отримане, було здатне до зв'язування з клітинами, надекспресуючими рецептор ErbB2, і нормальними Т клітинами людини, а також ініціювати літичну активність цитотоксичних лімфоцитів людини проти мішеней пухлин молочної залози людини. Різноманітні методи отримання і виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з рекомбінантних клітинних культур також були описані. Наприклад, біспецифічні антитіла отримували з використанням лейцинових "блискавок". Kostelny et al, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Лейцинові пептидні "блискавки" з білків Fos і Jun зв'язували з Fab' частинами двох різних антитіл за допомогою злиття генів. Гомодимери антитіла відновлювали по шарнірній області з утворенням мономерів і потім повторно окислювали з утворенням гетеродимерів антитіла. Цей спосіб може також застосовуватися для отримання гомодимерів антитіл. Технологія "діатіла", описана Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), надала альтернативний механізм для отримання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти містять VH, з'єднаний з VL за допомогою лінкера, який є дуже коротким, щоб забезпечити утворення пар між двома доменами на одному і тому ж ланцюгу. Відповідно, VH і VL домени одного фрагмента примушуються утворювати пару з комплементарними VL і VH доменими ще одного фрагмента, за допомогою цього утворюючи дві антиген-зв'язувальні ділянки. Також повідомляється про ще одну стратегію отримання фрагментів біспецифічних антитіл за допомогою застосування одноланцюжкових Fv (sFv) димерів. ДІВ. Gruber et al, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Розглядаються антитіла з більше ніж двома валентностями. Наприклад, можуть бути отримані триспецифічні антитіла. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Гетерокон'югатні антитіла

Гетерокон'югатні антитіла також знаходяться в межах об'єму даного винаходу.

- 5 Гетерокон'югатні антитіла складені з двох ковалентно сполучених антитіл. Такі антитіла були, наприклад, запропоновані для націлювання клітин імунної системи клітини на небажані клітини [Патент США № 4676980], і для лікування ВІЛ-інфекції [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Передбачається, що антитіла можуть бути отримані *in vitro* з використанням відомих способів в синтетичній хімії білка, включаючи способи, що включають в себе зшиваючі агенти. Наприклад, імунотоксини можуть бути побудовані з використанням реакції дисульфідного обміну або за допомогою утворення зв'язку. Приклади відповідних реагентів для даної мети включають імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат і реагенти, розкриті, наприклад, в патенті США № 4676980.

7. Полівалентні антитіла

- 15 Полівалентне антитіло може бути інтерналізоване (і/або катаболізоване) швидше, ніж бівалентне антитіло клітиною, яка експресує антиген, з якою антитіла зв'язуються. Антитіла даного винаходу можуть являти собою полівалентні антитіла (які відрізняються від класу IgM) трьома або більше антиген-зв'язувальними ділянками (наприклад, тетравалентні антитіла), які можуть бути легко отримані за допомогою рекомбінантної експресії нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидні ланцюги антитіла. Полівалентне антитіло може містити домен димеризації і три або більше антиген-зв'язувальні ділянки. Переважний домен димеризації містить (або складається з) Fc-області або шарнірної області. По цьому сценарію, антитіло буде містити Fc-область і три або більше антиген-зв'язувальних ділянок аміно-кінцевих по відношенню до Fc-області. Переважне полівалентне антитіло в даній заявці містить (або складається з) від трьох до приблизно восьми, але, переважно, чотирьох, антиген-зв'язувальних ділянок. Полівалентне антитіло містить щонайменше один поліпептидний ланцюг (і, переважно, два поліпептидних ланцюги), де поліпептидні ланцюг(ланцюги) містять два або більше варіабельні домени. Наприклад, поліпептидні ланцюг(ланцюги) можуть містити VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, де VD1 є першим варіабельним доменом, VD2 є другим варіабельним доменом, Fc є одним поліпептидним ланцюгом Fc-області, X1 і X2 представляють амінокислоту або поліпептид, і n дорівнює 0 або 1. Наприклад, поліпептидні ланцюг(ланцюги) можуть містити: VH-CH1-гнучкий ланцюг лінкер-VH-CH1-Fc-області; або ланцюг VH-CH1-VH-CH1-Fc-області. Полівалентне антитіло в даній заявці, переважно, додатково містить щонайменше два (і, переважно, чотири) поліпептиди варіабельного домену з легким ланцюгом. Полівалентне антитіло в даній заявці може, наприклад, містити від приблизно двох до приблизно восьми поліпептидів варіабельного домену з легким ланцюгом. Поліпептиди варіабельного домену з легким ланцюгом, передбачені в даній заявці, містять варіабельний домен з легким ланцюгом і, необов'язково, додатково містять CL домен.

8. Конструювання ефекторної функції

- 40 Може бути бажаним модифікувати антитіло винаходу по відношенню до ефекторної функції, наприклад, таким чином, щоб посилити антиген-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC) і/або комплемент-залежну цитотоксичність (CDC) антитіла. Це може досягатися за допомогою введення однієї або більше амінокислотних замін в Fc-області антитіла. Альтернативно або додатково, цистеїнові залишок(залишки) можуть бути введені в Fc-область, за допомогою цього забезпечуючи утворення міжланцюгового дисульфідного зв'язку в цій області. Гомодимерне антитіло, що таким чином генерується, може мати поліпшену здатність до інтерналізації і/або збільшені комплемент-опосередковане знищення клітин і антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (ADCC). Див. Caron et al, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) і Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерні антитіла з посиленою протипухлинною активністю також можуть бути отримані з використанням гетеробіфункціональних крос-лінкерів, як описано у Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Альтернативно, може бути сконструйоване антитіло, яке має подвійні Fc-області і може за допомогою цього мати посилений лізис комплементу і здатності ADCC. Див. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Щоб збільшити період напівжиття антитіла в сироватці, можна ввести епітоп, який зв'язує рецептор реутилізації в антитіло (особливо, фрагмент антитіла), як описано в патенті США 5739277, наприклад. Як використовують в даній заявці, термін "епітоп, який зв'язує рецептор реутилізації" стосується епітопу Fc-області молекули IgG (наприклад, IgG1, IgG2 IgG3 або IgG4) який відповідає за збільшення періоду напівжиття в сироватці молекули IgG.

9. Імунокон'югати

Винахід також стосується імунокон'югатів, що містять антитіло, кон'юговане з цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичний агент, агент, який інгібує ріст, токсин (наприклад, ферментативно активний токсин бактерійного, грибового, рослинного або тваринного походження або їх фрагменти) або радіоактивний ізотоп (тобто, радіокон'югат).

Хіміотерапевтичні агенти, застосовні в генерації таких імунокон'югатів, були описані вище. Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які можуть застосовуватися, включають ланцюг дифтерії А, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг екзотоксину А (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг рицину А, ланцюг абрину А, ланцюг модесину А, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор момордики харантської, курцин, кротин, інгібітор *sapaonaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Різноманітні радіонукліди є доступними для отримання радіокон'югованих антитіл. Приклади включають ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y і ^{186}Re . Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента отримують з використанням різноманітних біфункціональних агентів сполучення білків, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол)пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс(п-азидобензоїл) гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин може бути отриманий, як описано у Vitetta et al, Science, 238: 1098 (1987). Вуглець-14-мічена 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилен триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) являє собою зразковий хелатуючий агент для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом. Див. W094/11026.

Кон'югати антитіла і одного або більше низькомолекулярних токсинів, таких як каліхеаміцин, майтансиноїди, трихотен і CC1065, і похідних цих токсинів, які мають активність токсину, також розглядаються в даній заявці.

Майтансин і майтансиноїди

У одному переважному варіанті здійснення, антитіло проти ТАТ (первинне або фрагменти) винаходу є кон'югованими з однією або більше молекулами майтансиноїду.

Майтансиноїди являють собою мітотичні інгібітори, які діють за допомогою інгібування полімеризації тубуліну. Майтансин був уперше виділений східно-Африканського чагарника *tenus serrata* (патент США № 3896111). Згодом, було виявлено, що деякі мікроби також продукують майтансиноїди, такі як майтансинол і С-3 складні ефіри майтансинолу (патент США № 4151042). Синтетичний майтансинол і його похідні і аналоги розкриті, наприклад, в патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; і 4371533, розкриття яких включені в даній заявці навмисно за допомогою посилання.

Кон'югати майтансиноїд-антитіло

У спробі поліпшити їх терапевтичний показник, майтансин і майтансиноїди були кон'юговані антитілами, що специфічно зв'язуються з антигенами пухлинних клітин. Імунокон'югати, що містять майтансиноїди, і їх терапевтичне застосування, розкриті, наприклад, в патентах США №№ 5208020, 5416064 і Європейському патенті EP 0425235 B1, розкриття яких включені в даній заявці навмисно за допомогою посилання. Liu et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) описав імунокон'югати, що містять майтансиноїд, позначений DM1, зв'язаний з моноклональним антитілом C242, направленим проти колоректального раку людини. Було виявлено, що кон'югат є високоцитотоксичним по відношенню до культивованих клітин раку товстої кишки, і демонструє протипухлинну активність при аналізі пухлинного росту *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) описують імунокон'югати, в яких майтансиноїд був кон'югований через дисульфідний лінкер з мишачим антитілом A7, що зв'язується з антигеном клітинних ліній раку товстої кишки людини, або з ще одним мишачим моноклональним антитілом, ТА.1, яке зв'язує онкоген HER-2/neu. Цитотоксичність кон'югата ТА.1-майтансиноїд тестували *in vitro* на клітинних лініях раку молочної залози людини SK-BR-3, які експресують 3×10^5 поверхневих антигенів HER-2 на клітину. Лікарський кон'югат досягав ступеня цитотоксичності, схожого з незв'язаним майтансиноїдним лікарським засобом, який може бути збільшений за допомогою збільшення числа молекул майтансиноїду на молекулу антитіла. А7-майтансиноїдний кон'югат показав низьку системну цитотоксичність у мишей.

Кон'югати антитіло проти поліпептиду ТАТ-майтансиноїд (імунокон'югати)

Кон'югати антитіло проти ТАТ-майтансиноїд отримують за допомогою хімічного зв'язування антитіла проти-ТАТ з молекулою майтансиноїду без істотного зниження біологічної активності або антитіла або молекул майтансиноїду. У середньому 3-4 молекули майтансиноїду,

кон'юговані на молекулу антитіла показали ефективність при посиленні цитотоксичності для цільових клітин без негативного впливу на функцію або розчинність антитіла, незважаючи на те, що навіть від однієї молекули токсину/антитіла можна було б чекати посилення цитотоксичності в порівнянні із застосуванням оголеного антитіла. Майтансиноїди є добре відомими в даній

галузі і можуть бути синтезовані відомими методами або виділені з природних джерел. Відповідні майтансиноїди розкриті, наприклад, в патенті США № 5208020 і в інших патентах і непатентних публікаціях, на які в даній заявці посилаються вище. Переважні майтансиноїди являють собою майтансинол і аналоги майтансинолу, модифіковані в ароматичному кільці або по інших положеннях молекули майтансинолу, такі як різноманітні складні ефіри майтансинолу.

Існує багато зв'язувальних груп, відомих в даній галузі, для отримання кон'югатів антитіло-майтансиноїд, що включають, наприклад, групи, розкриті в патенті США № 5208020 або ЕР Патенті 0425235B1, Chari et al, Cancer Research 52: 127-131 (1992), і Заявці на патент США № 10/960,602, поданій 8 жовтня 2004 р., розкриття яких включені в даній заявці навмисно за допомогою посилання. Кон'югати антитіло-майтансиноїд, що містять лінкерний компонент SMCC, можуть бути отримані як розкрито в Заявці на патент США № 10/960602, поданій 8 жовтня 2004 р. Зв'язувальні групи включають дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотолабільні групи, фотолабільні групи, групи, лабільні до дії пептидази, або групи, лабільні до дії естерази, як розкрито в ідентифікованих вище патентах, причому дисульфідні і тіоефірні групи є переважними. Додаткові зв'язувальні групи в даній заявці описані і приведені як приклади.

Кон'югати антитіла і мایتансиноїду можуть бути отримані з використанням різноманітних біфункціональних агентів сполучення білків, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил) циклогексан-1-карбоксилат, імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Конкретно, переважні агенти сполучення включають N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP) (Carlsson et al, Biochem. J. 173:723-737 [1978]) і N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP) для надання дисульфідного зв'язування.

Лінкер може бути приєднаний до молекули мایتансиноїду в різноманітних положеннях, залежно від типу зв'язування. Наприклад, складноефірне зв'язування може бути утворене за допомогою реакції з гідроксильною групою з використанням загальноприйнятих методів сполучення. Реакція може відбуватися по С-3 положенню, що має гідроксильну групу, С-14 положенню, модифікованому гідроксиметилом, С-15 положенню, модифікованому гідроксильною групою, і С-20 положенню, що має гідроксильну групу. У переважному варіанті здійснення, зв'язування утворене по С-3 положенню мایتансинолу або аналога мایتансинолу.

Ауристатини і долостатини

У деяких варіантах здійснення, імунокон'югат містить антитіло винаходу, кон'юговане з долостатинами або пептидними аналогами і похідними долостатину, ауристатинами (патенти США №№ 5635483; 5780588). Було показано, що долостатини і ауристатини надають вплив на динаміку мікротрубочок, гідроліз М і ядерний і клітинний розподіл (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) і мають протиракову (патент США 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). Фрагмент лікарського засобу долостатину або ауристатину може бути приєднаний до антитіла через N (аміно) кінець або C (карбоксил) кінець фрагмента пептидного лікарського засобу (WO 02/088172).

Зразкові варіанти здійснення ауристатину включають зв'язані через N-кінець фрагменти DE і DF лікарського засобу монометилауристатину (тобто, MMAE і MMAF), розкритого в "Senter et al, Proceedings American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, представленого 28 березня 2004 року, розкриття якого навмисно включене за допомогою посилання у всій його повноті.

Типово, фрагменти лікарських засобів на основі пептидів можуть бути отримані за допомогою утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути отримані, наприклад, відповідно до способу рідкофазового синтезу (див. E. Schroder and K. Lubke, "The Petides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), які є добре відомими в галузі пептидної хімії. Фрагменти лікарських засобів на основі ауристатину/долостатину можуть бути отримані відповідно до способів: патент США 5635483; патент США 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et

al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; i Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784.

Каліхеаміцин

Ще один інший імунокон'югат, що представляє інтерес, містить антитіло проти ТАТ, кон'юговане з однією або більше молекулами каліхеаміцину. Антибіотики сімейства каліхеаміцинів мають здатність виробляти розриви в дволанцюжкових ДНК при суб-пікомолярних концентраціях. По отриманню кон'югатів сімейства каліхеаміцинів, див. патенти США 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (всі на ім'я American Cyanamid Company). Структурні аналоги каліхеаміцину, які можуть застосовуватися, включають, але не обмежені лише ними, γ 1I, α 2I, α 3I, N-ацетил- γ 1I, PSAG і θ 1I (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) і вказані вище патенти США на ім'я American Cyanamid). Ще один інший протипухлинний лікарський засіб, в якому антитіло може бути кон'юговане, являє собою QFA, який є антифолатом. Як каліхеаміцин, так і QFA мають внутрішньоклітинні ділянки дії і нелегко перетинають плазматичну мембрану. Отже, клітинне захоплення цих агентів через опосередковану антитілом інтерналізацію значно посилює їх цитотоксичні ефекти.

Інші цитотоксичні агенти

Інші протипухлинні агенти, які можуть бути кон'юговані з антитілами проти ТАТ винаходу, включають BCNU, стрептозоїн, вінкристин і 5-фторурацил, сімейство агентів, відоме спільно як комплекс LL-E33288, описаний в патентах США 5053394, 5770710, а також еспераміцини (патент США 5877296).

Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які може застосовуватися, включають ланцюг дифтерії А, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг екзотоксину А (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг рицину А, ланцюг абрину А, ланцюг модесину А, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, і PAP-S), інгібітор момордики харантської, курцин, кротин, інгібітор *saraoparia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Див., наприклад, WO 93/21232 опублікована 28 жовтня 1993 року.

Даний винахід додатково передбачає імунокон'югат, утворений між антитілом і сполукою з нуклеодитичною активністю (наприклад, рибонуклеазою або ДНК-ендонуклеазою, такою як дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для селективної деструкції пухлини, антитіло може містити високорадіоактивний атом. Різноманітні радіоактивні ізотопи є доступними для отримання радіокон'югованих антитіл проти ТАТ. Приклади включають At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} і радіоактивні ізотопи Lu. Коли кон'югат застосовують для діагностики, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, Tc^{99m} або I^{123} або спінову мітку для візуалізації методом ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомого як магнітно-резонансна візуалізація, МРТ), такий як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Радіоактивні або інші мітки можуть бути введені в кон'югат відомими шляхами. Наприклад, пептид може бути біосинтезований або може бути синтезований за допомогою хімічного амінокислотного синтезу з використанням відповідних амінокислотних попередників, що включають в себе, наприклад, фтор-19 замість водню. Мітки, такі як Tc^{99m} або I^{123} , Re^{186} , Re^{188} і In^{111} можуть бути приєднані через цистеїновий залишок в пептид. Ітрій-90 може бути приєднаний через лізиновий залишок. Метод IODOGEN (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 може застосовуватися для введення йоду-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) детально описує інші методи.

Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента можуть бути отримані з використанням різноманітних біфункціональних агентів сполучення білків, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат, імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоєфірів (такі як диметил адипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанати) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин може бути отриманий, як описано в Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). Вуглець-14-мічена 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є зразковим хелатуючим агентом для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом. Див. WO94/11026. Лінкер може являти собою "розщеплюваний лінкер", що полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, може застосовуватися кислото-лабільний лінкер, чутливий до

пептидази лінкер, фотолабільний лінкер, диметилловий лінкер або дисульфідвмісний лінкер (Chari et al, Cancer Research 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020).

Сполуки винаходу навмисно передбачають, але не обмежені лише ними, ADC, отриманими за допомогою крос-лінкерних реагентів: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, і сульфо-SMPB, і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які є доступними на ринку (наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.). Див. сторінки 467-498, 2003-2004 Довідник по застосуванню і Каталог.

Альтернативно, гібридний білок, що містить антитіло проти TAT і цитотоксичний агент, може бути отриманий, наприклад, за допомогою рекомбінантних методів або пептидного синтезу. Довжина ДНК може містити відповідні області, що кодують дві частини кон'югата, або суміжні з ще однією або розділені областю, що кодує лінкерний пептид, який не порушує бажані властивості кон'югата.

У ще одному іншому варіанті здійснення, антитіло може бути кон'югованим з "рецептором" (таким як стрептавідин) для використання в попередньому націлюванні на пухлину, де кон'югат антитіло-рецептор вводять пацієнту, з подальшим видаленням незв'язаного кон'югата з кровообігу з використанням очищувального агента і введенням потім "ліганду" (наприклад, авідину), який є кон'югованим з цитотоксичним агентом (наприклад, радіонуклеотидом).

10. Імуноліпосоми

Антитіла проти TAT, описані в даній заявці, можуть також бути складені як імуноліпосоми. "Ліпосома" являє собою невеликий пухирець, складений з різноманітних типів ліпідів, фосфоліпідів і/або поверхнево-активної речовини, який є застосовним для доставки лікарського засобу ссавцеві. Компоненти ліпосоми звичайно розташовані в бішаровому утворенні, аналогічному ліпідному розташуванню біологічних мембран. Ліпосоми, що містять антитіло, отримують за допомогою способів, відомих в даній галузі, таких, як описані у Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); патенти США №№ 4485045 і 4544545; і W097/38731, опублікована 23 жовтня 1997 р. Ліпосоми із збільшеним часом циркуляції розкриті в патенті США № 5013556.

Особливо застосовні ліпосоми можуть бути генеровані за допомогою методу випаровування із оберненою фазою з ліпідною композицією, що містить фосфатидилхолін, холестерин і ПЕГ-дериватизований фосфатидилетаноламін (ПЕГ-ФЕ). Ліпосоми піддають екструзії через фільтри з певним розміром пор для отримання на виході ліпосом з бажаним діаметром. Fab' фрагменти антитіл даного винаходу можуть бути кон'юговані з ліпосомами, як описано у Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) через реакцію дисульфідного взаємообміну. Хіміотерапевтичний агент необов'язково міститься всередині ліпосом. Див. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989).

В. TAT-зв'язувальні олігопептиди

TAT-зв'язувальні олігопептиди даного винаходу являють собою олігопептиди, які зв'язуються, переважно, специфічно, з поліпептидом TAT, як описано в даній заявці. TAT-зв'язувальні олігопептиди можуть бути хімічно синтезовані з використанням відомої методології олігопептидного синтезу або можуть бути отримані і очищені з використанням рекомбінантної технології. TAT-зв'язувальні олігопептиди звичайно складаються з щонайменше приблизно 5 амінокислот по довжині, альтернативно щонайменше приблизно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 амінокислот по довжині або більше, де такі олігопептиди мають здатність до зв'язування, переважно, специфічно, з поліпептидом TAT, як описано в даній заявці. TAT-зв'язувальні олігопептиди можуть бути ідентифіковані без зайвого експериментування з використанням добре відомих методів. У цьому відношенні, зазначають, що методи для скринінгу олігопептидних бібліотек для олігопептидів, які мають здатність до специфічного зв'язування з поліпептидною мішенню, є добре відомими в даній галузі (див., наприклад, патенти США №№ 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; Публікації заявок PCT №№ WO 84/03506 і WO84/03564; Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al, в Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol, 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, і Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

У цьому відношенні, відображення бактеріофага (фагу) є одним добре відомим методом, який дозволяє проводити скринінг великих олігопептидних бібліотек для ідентифікації елемента(елементів) цих бібліотек, які мають здатність до специфічного зв'язування з поліпептидною мішенню. Відображення фагу є методом, за допомогою якого варіантні поліпептиди відображаються як гібридні білки з покриваючим білком на поверхні частинок бактеріофага (Scott, J.K. і Smith, G. P. (1990) *Science* 249: 386). Застосовність фагового відображення ґрунтується на тому факті, що великі бібліотеки селективно рандомізованих білкових варіантів (або статистично клонованих кДНК) можуть бути швидко і ефективно відсортовані по тих послідовностях, які зв'язуються з цільовою молекулою з високою спорідненістю. Відображення пептидних (Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378) або білкових (Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363) бібліотек на фаг використовували для скринінгу мільйонів поліпептидів або олігопептидів для тих, які мають властивостями специфічного зв'язування (Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668). Сортування фагових бібліотек статистичних мутантів вимагає стратегії для побудови і розмноження великого числа варіантів, методики афінного очищення з використанням цільового рецептора і засобів оцінки результатів збагачення по зв'язуванню. патенти США №№ 5223409, 5403484, 5571689 і 5663143.

Незважаючи на те, що в більшості способів фагового відображення використовували ниткоподібний фаг, також відомі системи відображення лямбдоїдного фагу (WO 95/34683; Патент США № 5,627,024), системи відображення T4 фагу (Ren et al, *Gene*, 215: 439 (1998); Zhu et al, *Cancer Research*, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., *Infection & Immunity*, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al, *Gene*, 195(2):303-311 (1997); Ren, *Protein Sci.*, 5: 1833 (1996); Efimov et al, *Virus Genes*, 10: 173 (1995)) і системи відображення T7 фагу (Smith і Scott, *Methods in Enzymology*, 217: 228-257 (1993); патент США № 5766905).

У цей час розроблено багато інших поліпшень і варіацій основної концепції фагового відображення. Ці поліпшення посилюють здатність систем відображення проводити скринінг пептидних бібліотек на предмет зв'язування з вибраними цільовими молекулами і відображати функціональні білки з можливістю скринінгу цих білків на предмет бажаних властивостей. Комбінаторні реакційні пристрої для реакцій фагового відображення були розроблені (WO 98/14277) і бібліотеки відображення фагів застосовувалися для аналізу і керування біомолекулярних взаємодій (WO 98/20169; WO 98/20159) і властивостями напружених спіральних пептидів (WO 98/20036). WO 97/35196 описує спосіб виділення афінного ліганду, в якому бібліотека відображення фагу контактує з одним розчином, в якому ліганд буде зв'язуватися з цільовою молекулою, і другий розчин, в якому афінний ліганд не буде зв'язуватися з цільовою молекулою, щоб селективно виділити ліганди, що зв'язуються. WO 97/46251 описує спосіб біопенінгу статистичної бібліотеки відображення фагу з очищенням афінним антитілом, і потім виділення зв'язувального фагу, з подальшим способом мікропенінгу з використанням ямки мікропланшета для виділення фагу з високою спорідненістю зв'язування. Також повідомлялося про застосування білка *A Staphylococcus aureus* як афінного мітка (Li et al. (1998) *Mol Biotech.*, 9: 187). WO 97/47314 описує застосування бібліотек віднімання субстрату для розрізнення специфічності ферменту з використанням комбінаторної бібліотеки, яка може бути бібліотекою відображення фагів. Спосіб відбору ферментів, відповідних для застосування в детергентах з використанням відображення фагів, описаний в WO 97/09446. Додаткові способи відбору білків зі специфічним зв'язуванням описані в патентах США №№ 5498538, 5432018 і WO 98/15833.

Способи генерації пептидних бібліотек і скринінгу цих бібліотек також розкриті в патентах США №№ 5723286, 5432018, 5580717, 5427908, 5498530, 5770434, 5734018, 5698426, 5763192 і 5723323.

С. ТАТ-зв'язувальні органічні молекули

ТАТ-зв'язувальні органічні молекули являють собою органічні молекули, відмінні від олігопептидів або антитіл, як визначено в даній заявці, які зв'язуються, переважно, специфічно, з поліпептидом ТАТ, як описано в даній заявці. ТАТ-зв'язувальні органічні молекули можуть бути ідентифіковані і хімічно синтезовані з використанням відомої методології (див., наприклад, Публікації заявок РСТ №№ WO00/00823 і WO00/39585). ТАТ-зв'язувальні органічні молекули мають звичайно менше ніж приблизно 2000 Дальтон в розмірі, альтернативно, менше ніж приблизно 1500, 750, 500, 250 або 200 Дальтон в розмірі, де такі органічні молекули, які мають здатність до зв'язування, переважно, специфічно, з поліпептидом ТАТ, як описано в даній заявці, можуть бути ідентифіковані без зайвого експериментування з використанням добре відомих методів. У цьому відношенні, зазначають, що методи для скринінгу бібліотек органічних молекул на предмет молекул, які мають здатність до зв'язування з поліпептидною мішенню, є

добре відомими в даній галузі (див., наприклад, Публікації заявок РСТ №№ WO00/00823 і WO00/39585). ТАТ-зв'язувальні органічні молекули можуть являти собою, наприклад, альдегіди, кетон, оксими, гідразони, семікарбазони, карбазиди, первинні аміни, вторинні аміни, третинні аміни, N-заміщені гідразини, гідразиди, спирти, ефіри, тіоли, тіоефіри, дисульфідиди, карбонові

кислоти, складні ефіри, амідиди, сечовини, карбамати, карбонати, кеталі, тіокеталі, ацеталі, тіоацеталі, арилгалогенідиди, арилсульфонати, алкілгалогенідиди, алкілсульфонати, ароматичні сполуки, гетероциклічні сполуки, аніліни, алкени, алкіни, діоли, аміноспирти, оксазолідиди, оксазоліни, тіазолідиди, тіазоліни, енаміни, сульфонамідиди, епоксидиди, азіридиниди, ізоціанатиди, сульфонілхлоридиди, діазосполуки, ацилхлоридиди або т.п.

D. Скринінг антитіл проти ТАТ, ТАТ-зв'язувальних олігопептидів і ТАТ-зв'язувальних органічних молекул з бажаними властивостями

Методи генерації антитіл, олігопептидів і органічних молекул, які зв'язуються з поліпептидами ТАТ, були описані вище. Можна, за бажанням, додатково провести відбір антитіл, олігопептидів або інших органічних молекул з певними біологічними характеристиками.

Ефекти інгібування росту від антитіла проти ТАТ, олігопептиду або іншої органічної молекули винаходу можуть бути оцінені способами, відомими в даній галузі, наприклад, з використанням клітин, які експресують поліпептид ТАТ або ендogenous або після трансфекції геном ТАТ. Наприклад, відповідні лінії пухлинних клітин і ТАТ-трансфіковані клітини можуть бути оброблені моноклональним антитілом проти ТАТ, олігопептидом або іншою органічною молекулою винаходу при різноманітних концентраціях протягом декількох днів (наприклад, 2-7) днів і забарвлені кристалічним фіолетовим або МТТ або проаналізовані за допомогою деякого іншого колориметричного аналізу. Ще один інший спосіб вимірювання проліферації може бути здійснений за допомогою порівняння захоплення ³Н-тимідину клітинами, обробленими в присутності або відсутності антитіла проти ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули винаходу. Після обробки, клітини збирають і кількість радіоактивності, введена в ДНК, кількісно визначають в сцинтиляційному лічильнику. Відповідні позитивні контролю включають обробку вибраної клітинної лінії антитілом, інгібуючим ріст, відомим як інгібуюче ріст цієї клітинної лінії. Інгібування росту пухлинних клітин *in vivo* може бути визначено різноманітними шляхами, відомими в даній галузі. Переважно, пухлинна клітина є клітиною, якою надекспресує поліпептид ТАТ. Переважно, антитіло проти ТАТ, ТАТ-зв'язувальний олігопептид або ТАТ-зв'язувальна органічна молекула будуть інгібувати клітинну проліферацію ТАТ-експресуючих пухлинних клітин *in vitro* або *in vivo* на приблизно 25-100 % в порівнянні з необробленою пухлинною клітиною, більш переважно, на приблизно 30-100 %, і навіть більш переважно, на приблизно 50-100 % або 70-100 %, в одному варіанті здійснення, при концентрації антитіла, яка дорівнює приблизно від 0,5 до 30 мкг/мл. Інгібування росту може бути виміряне при концентрації антитіла, яка дорівнює приблизно від 0,5 до 30 мкг/мл або приблизно від 0,5 нМ до 200 нМ в культурі клітин, де інгібування росту визначають через 1-10 днів після піддавання пухлинних клітин впливу антитіла. Антитіло є інгібуючим ріст *in vivo*, якщо введення антитіла проти ТАТ при приблизно від 1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг маси тіла приводить в результаті до зниження розміру пухлини або зменшенню проліферації пухлинних клітин в межах приблизно від 5 днів до 3 місяців від першого введення антитіла, переважно, в межах від приблизно 5 до 30 днів.

Для відбору антитіла проти ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули, яка індукуює смерть клітин, втрату цілісності мембрани на що вказує, наприклад, поглинання пропідійодиду (ПІ), трипанового синього або 7AAD може бути оцінена відносно контролю. Аналіз поглинання ПІ може бути здійснений за відсутності комплементу і імунних ефекторних клітин. Поліпептид ТАТ-експресуючі пухлинні клітини інкубують із середовищем окремо або середовищем, що містить відповідне антитіло проти ТАТ (наприклад, при приблизно 10 мкг/мл), ТАТ-зв'язувальний олігопептид або ТАТ-зв'язувальну органічну молекулу. Клітини інкубують протягом 3-денного періоду часу. Після кожної обробки, клітини відмивають і аліквотують в 35 мМ закупорені стікачем пробірки 12 × 75 (1 мл на пробірку, 3 пробірки на групу обробки) для видалення згустків клітин. У пробірки потім вводять ПІ (10 мкг/мл). Зразки можуть бути проаналізовані з використанням проточного цитометра FACSCAN® і програмного забезпечення FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Ті антитіла проти ТАТ, ТАТ-зв'язувальних олігопептидів або ТАТ-зв'язувальних органічних молекул, які індукують статистично значні рівні смерті клітин, як визначають за допомогою поглинання ПІ, можуть бути відібрані як індукуючі смерть клітин антитіла проти ТАТ, ТАТ-зв'язувальні олігопептиди або ТАТ-зв'язувальні органічні молекули.

Для скринінгу антитіл, олігопептидів або інших органічних молекул, які зв'язуються з епітопом на поліпептиді ТАТ, зв'язаному антитілом, що представляє інтерес, може

здійснюватися рутинний епітоп-перехресний конкурентний аналіз, такий як описаний в Antibodies, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow і David Lane (1988). Цей аналіз може застосовуватися, щоб визначити чи зв'язується тестоване антитіло, олігопептид або інша органічна молекула з тією ж ділянкою або епітопом, як відоме антитіло проти ТАТ.

Альтернативно, або додатково, картування епітопа може здійснюватися способами, відомими в даній галузі. Наприклад, послідовність антитіла може бути мутагенізована таким чином, як за допомогою сканування аланіном, для ідентифікації контактних залишків. Мутантне антитіло спочатку тестують на предмет зв'язування з поліклональним антитілом для гарантії необхідної складчастості. При відмінному способі, пептиди, відповідні різним областям поліпептиду ТАТ, можуть застосовуватися в конкурентних аналізах з тестованими антитілами або з тестованим антитілом і антитілом з охарактеризованим або відомим епітопом.

Е. Антитіло-залежна опосередкована ферментами пролікарська терапія (ADEPT)

Антитіла даного винаходу також можуть застосовуватися в ADEPT за допомогою кон'югації антитіла з проліки-активуючим ферментом, який перетворює проліки (наприклад, пептидильний хіміотерапевтичний агент, див. WO81/01145) в активний протираковий лікарський засіб. Див., наприклад, WO 88/07378 і патент США № 4975278.

Ферментний компонент імунокон'югату, застосовний для ADEPT, включає будь-який фермент, здатний до дії на проліки, таким чином, щоб перетворити його в більш активну, цитотоксичну форму.

Ферменти, які є застосовними в способі даного винаходу, включають, але не обмежені лише ними, лужну фосфатазу, застосовну для перетворення фосфатвмісних проліків у вільні лікарські засоби; арилсульфатазу, застосовну для перетворення сульфатвмісних проліків у вільні лікарські засоби; цитозиндеаміназу, застосовний для перетворення нетоксичного 5-фторцитозину в протираковий лікарський засіб, 5-фторурацил; протеази, такі як протеаза сератії, термолізін, субтилізін, карбоксипептидази і катепсини (такі як катепсини В і L), які є застосовними для перетворення пептидовмісних проліків у вільні лікарські засоби; D-аланілкарбоксипептидази, застосовні для перетворення проліків, які містять D-амінокислотні замісники; вуглевод-розщеплювальні ферменти, такі як β -галактозидаза і нейрамідідаза, застосовні для перетворення глікозилованих проліків у вільні лікарські засоби; β -лактамазу, застосовну для перетворення лікарських засобів, дериватизованих β -лактамами, у вільні лікарські засоби; і пеніцилінамідази, такі як амідаза пеніциліну V або амідаза пеніциліну G, застосовні для перетворення лікарських засобів, дериватизованих по їх амінних азотах феноксиацетильними або фенілацетильними групами, відповідно, у вільні лікарські засоби. Альтернативно, антитіла з ферментативною активністю, також відомі в даній галузі як "абзими", можуть застосовуватися для перетворення проліків винаходу у вільні активні лікарські засоби (див., наприклад, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Кон'югати антитіло-абзими можуть бути отримані, як описано в даній заявці, для доставки абзиму в популяцію пухлинних клітин. Ферменти даного винаходу можуть бути ковалентно зв'язані з антитілами проти ТАТ, за допомогою методів, добре відомих в даній галузі, таких як застосування гетеробіфункціональних зшиваючих реагентів, що обговорюються вище. Альтернативно, гібридні білки, що містять щонайменше антигензв'язувальну область антитіла винаходу, зв'язану з щонайменше функціонально активною частиною ферменту винаходу, можуть бути побудовані з використанням методів рекомбінантної ДНК, добре відомих в даній галузі (див., наприклад, Neuberger et al, Nature 312:604-608 (1984)).

Ф. Непроцесовані поліпептиди ТАТ

Даний винахід також надає недавно ідентифіковані і виділені нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептиди, які називаються в даній заявці як поліпептиди ТАТ. Конкретно, кДНК (часткові і первинні), що кодують різноманітні поліпептиди ТАТ, були ідентифіковані і виділені, як розкрито додатково в подробицях в Прикладах, приведених нижче.

Як розкрито в Прикладах нижче, різноманітні клони кДНК були депоновані в АТСС. Дійсні нуклеотидні послідовності цих клонів можуть бути легко визначені кваліфікованим фахівцем в даній галузі за допомогою секвенування депонованого клона з використанням рутинних способів в даній галузі. Передбачена амінокислотна послідовність може бути визначена з нуклеотидної послідовності з використанням рутинної кваліфікації. Для поліпептидів ТАТ і кодуючих нуклеїнових кислот, описаних в даній заявці, в деяких випадках, заявники ідентифікували, що, як вважають, є рамкою зчитування, що найкращим чином ідентифікується з інформацією про послідовність, доступну в цей час.

Г. Антитіло проти ТАТ і варіантні поліпептиди ТАТ

У доповнення до антитіл проти ТАТ і непроцесованих поліпептидів ТАТ з нативною послідовністю, описаних в даній заявці, передбачають, що можуть бути отримані антитіла проти

TAT і варіантні поліпептиди TAT. Антитіло проти TAT і варіантні поліпептиди TAT можуть бути отримані за допомогою введення відповідних нуклеотидних змін в кодуючу ДНК, і/або за допомогою синтезу бажаних антитіла або поліпептиду. Кваліфіковані фахівці в даній галузі оціняють, що амінокислотні зміни можуть змінити пост-трансляційні процеси антитіла проти TAT або поліпептиду TAT, такі як зміни числа або положення ділянок глікозилування або зміни мембрано-закріплюючих характеристик.

Варіації в антитілах проти TAT і поліпептидах TAT, описаних в даній заявці, можуть бути проведені, наприклад, з використанням будь-якого з методів і посібника для проведення консервативних і неконсервативних мутацій приведених, наприклад, в патенті США № 5364934. Варіації можуть являти собою заміну, делецію або введення одного або більше кодонів, що кодують антитіло або поліпептид, які приводять в результаті до змін в амінокислотній послідовності в порівнянні з нативною послідовністю антитіла або поліпептиду. Необов'язково, варіація здійснюється за допомогою заміни щонайменше однієї амінокислоти на будь-яку іншу амінокислоту в одному або більше з доменів антитіла проти TAT або поліпептиду TAT. Шлях визначення, по якому амінокислотний залишок може бути введений, заміщений або підданий делеції без несприятливого впливу на бажану активність, може бути знайдений за допомогою порівняння послідовності антитіла проти TAT або поліпептиду TAT з послідовністю, гомологічною відомій білковій молекулі і мінімізації кількості замін в амінокислотній послідовності, проведений в областях з високою гомологією. Амінокислотні заміни можуть бути результатом заміщення однієї амінокислоти ще однією іншою амінокислотою, що має схожі структурні і/або хімічні властивості, такого як заміщення лейцину серином, тобто, консервативні амінокислотні заміни. Введення або делеції можуть необов'язково знаходитися в інтервалі приблизно 1-5 амінокислот. Дозволена варіація може бути визначена за допомогою введень, делецій або заміщень амінокислот, що систематично проводяться, в послідовності і тестування отриманих в результаті варіантів на предмет активності виявлюваною непроцесованою або зрілою нативною послідовністю.

У даному описі надані фрагменти антитіла проти TAT і поліпептиду TAT. Такі фрагменти можуть бути процесовані по N-кінцю або C-кінцю, або в них можуть бути відсутніми внутрішні залишки, наприклад, коли проводять порівняння з непроцесованим нативним антитілом або білком. У певних фрагментах відсутні амінокислотні залишки, які не є суттєвими для бажаної біологічної активності антитіла проти-TAT або поліпептиду TAT.

Фрагменти антитіла проти TAT і поліпептиду TAT можуть бути отримані за допомогою будь-якого з ряду загальноприйнятих методів. Бажані пептидні фрагменти можуть бути хімічно синтезовані. Альтернативний підхід включає в себе генерацію фрагментів антитіла або поліпептиду за допомогою ферментативного розщеплення, наприклад, за допомогою обробки білка ферментом, про який відомо, що він розщеплює білки по ділянках, що визначаються конкретними амінокислотними залишками, або за допомогою розщеплення ДНК відповідними рестрикційними ферментами і виділення бажаного фрагмента. Ще один інший відповідний метод включає в себе виділення і ампліфікацію фрагмента ДНК, що кодує фрагмент бажаних антитіла або поліпептиду, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Олігонуклеотиди, які визначають бажані кінці фрагмента ДНК, використовуються при 5' і 3' праймерах в ПЛР. Переважно, фрагменти антитіла проти TAT і поліпептиду TAT розділяють щонайменше одну біологічну і/або імунологічну активність з нативним антитілом проти TAT або поліпептидом TAT, розкритим в даній заявці.

У конкретних варіантах здійснення, консервативні заміщення, що представляють інтерес, показані в Таблиці 6 під заголовком переважних заміщень. Якщо такі заміщення приводять в результаті до зміни біологічної активності, потім більш значні зміни, позначені зразкові заміщення в Таблиці 1, або як додатково описано нижче з посиланням на класи амінокислот, вводять і продукти піддають скринінгу.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Зразкові заміщення	Переважаючі заміщення
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Leu	Норлейцин
Leu (L)	Норлейцин; He; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; He; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Суттєві модифікації в функції або імунологічній ідентичності антитіла проти ТАТ або поліпептиду ТАТ виконують за допомогою відбору заміщень, які відрізняються значно по їх ефекту на підтримку (а) структури поліпептидного скелета в області заміни, наприклад, у вигляді листа або спіральної конформації, (b) заряду або гідрофобності молекули на цільовій ділянці або (c) об'єму бічного ланцюга. Залишки, що зустрічаються в природі, поділяють на групи на основі загальних властивостей бічного ланцюга:

- (1) гідрофобні: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln
- (3) кислі: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro; і
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміщення спричиняють обмін елемента одного з цих класів на ще один клас. Такі замінені залишки також можуть бути введені в ділянки консервативного заміщення або, більш переважно, в ділянки, що залишилися (неконсервативні).

Варіації можуть бути проведені з використанням способів, відомих в даній галузі, таких як олігонуклеотид-опосередкований (сайт-направлений) мутагенез, аланінове сканування і ПЛР мутагенез. Сайт-направлений мутагенез [Carter et al, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], касетний мутагенез [Wells et al, Gene, 34:315 (1985)], рестрикційний селекційний мутагенез [Wells et al, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] або інші відомі методи можуть здійснюватися на клонуваний ДНК для отримання антитіл проти ТАТ або варіантної ДНК поліпептиду ТАТ.

Скануючий амінокислотний аналіз може також використовуватися для ідентифікації однієї або більше амінокислоти вздовж суміжної послідовності. Середовищ переважних скануючих амінокислот знаходяться відносно малі, нейтральні амінокислоти. Такі амінокислоти включають аланін, гліцин, серин і цистеїн. Аланін звичайно являє собою переважну скануючу амінокислоту середовищ цієї групи, оскільки він елімінує бічний-ланцюг поза бета-вуглецем і найменш ймовірно змінює конформацію основного ланцюга варіанту [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. Аланін також звичайно є переважним, оскільки він є найбільш загальною амінокислотою. Крім того, його часто виявляють як в замаскованому, так і розгорненому положеннях [Creighton, Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol, 150: 1 (1976)]. Якщо аланінова заміна не дає на виході адекватних кількостей варіанту, може застосовуватися ізостерична амінокислота.

Будь-який цистеїновий залишок, не залучений до підтримки потрібної конформації антитіла проти-TAT або поліпептиду TAT, також може бути заміщений, як правило, на серин, щоб поліпшити окиснювальну стійкість молекули і запобігти аберантному зшиванню. Навпаки, цистеїнові зв'язок(зв'язки) можуть бути додані до антитіла проти TAT або поліпептиду TAT для поліпшення стійкості (особливо там, де антитіло являє собою фрагмент антитіла, такий як Fv фрагмент).

Особливо переважний тип замісного варіанту включає в себе заміну одного або більше залишків гіперваріабельної області батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого антитіла або антитіла людини). Загалом, отримані в результаті варіант(и), вибрані для додаткової розробки, будуть мати поліпшені біологічні властивості відносно батьківського антитіла, з якого їх генерують. Зручний шлях для генерації таких замісних варіантів включає в себе дозрівання афінності з використанням фагового відображення. Коротко, декілька ділянок гіперваріабельної області (наприклад, 6-7 ділянок) піддають мутації для генерації всіх можливих амінозаміщень на кожній ділянці. Варіанти антитіла, що генеруються, таким чином відображаються на моновалентним чином з ниткоподібних фагових частинок як гібриди з продуктом гена III M13, упакованому всередині кожної частинки. Фаг-відображені варіанти потім піддають скринінгу на предмет їх біологічної активності (наприклад, спорідненість зв'язування) як описано в даній заявці. Щоб ідентифікувати ділянки кандидатної гіперваріабельної області для модифікації, скануючий аланіном мутагенез може здійснюватися для ідентифікації залишків гіперваріабельної області, сприяючих значно зв'язуванню з антигеном. Альтернативно, або додатково, може бути сприятливим аналізувати кристалічні структури комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і поліпептидом TAT людини. Такі контактні залишки і сусідні залишки є кандидатами для заміщення відповідно до методів, розроблених в даній заявці. Як тільки такі варіанти генеруються, панель варіантів піддають скринінгу, як описано в даній заявці, і антитіла з чудовими властивостями по одному або більше відповідних аналізах можуть бути вибрані для додаткової розробки.

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотні варіанти послідовності антитіла проти TAT, отримують за допомогою різноманітних способів, відомих в даній галузі. Ці способи включають, але не обмежені лише ними, виділення з природного джерела (у разі варіантів амінокислотної послідовності, що зустрічаються в природі) або отримання за допомогою олігонуклеотид-опосередкованого (або сайт-направленого) мутагенезу, ПЛР-мутагенезу і касетного мутагенезу раніше отриманої варіантної або неваріантної версії антитіла проти TAT.

Н. Модифікації антитіл проти TAT і поліпептидів TAT

Ковалентні модифікації антитіл проти TAT і поліпептидів TAT включені в об'єм домагань даного винаходу. Один тип ковалентної модифікації включає взаємодію цільових амінокислотних залишків антитіл проти TAT або поліпептиду TAT з органічним дериватизуючим агентом, який здатний до взаємодії з вибраними бічними ланцюгами або N- або C-кінцевих залишків антитіла проти TAT або поліпептиду TAT. Дериватизація біфункціональними агентами є застосовною, наприклад, для зшивання антитіла проти TAT або поліпептиду TAT з водонерозчинною підтримуючою матрицею або поверхнею для застосування в способі очищення антитіл проти TAT і навпаки. Звичайно застосовувані зшиваючі агенти включають, наприклад, 1,1-біс(діазаацетил)-2-фенілетан, глутаральдегід, N-гідроксисукцинімідні складні ефіри, наприклад, складні ефіри з 4-азидосаліциловою кислотою, гомобіфункціональні складні імідоефіри, включаючи дисукцинімідильні складні ефіри, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат), біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан і агенти, такі як метил-3-[(п-азидофеніл)дитіо]пропіоїмідат.

Інші модифікації включають деамідування глутамінільного і аспарагінільного залишків до відповідних глутамільного і аспартильного залишків, відповідно, гідроксилювання проліну і лізину, фосфорилювання гідроксильних груп сериньного або треонільного залишків, метилування α -аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну і істидину [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], ацетилювання N-кінцевого аміну, і амідкування будь-якої C-кінцевої карбоксильної групи.

Ще один тип ковалентної модифікації антитіла проти TAT або поліпептиду TAT, включений в об'єм домагань даного винаходу, містить зміну нативної схеми глікозилювання антитіла або поліпептиду. "Зміна нативної схеми глікозилювання" призначена для цілей даного винаходу, щоб визначити один або більше вуглеводних фрагментів, виявлених в нативній послідовності антитіла проти TAT або поліпептиду TAT (або за допомогою видалення основоположної ділянки глікозилювання або за допомогою делеції глікозилювання хімічними і/або ферментативними засобами), і/або додавання однієї або більше ділянок глікозилювання, які не присутні в нативній послідовності антитіла проти TAT або поліпептиду TAT. Додатково, фраза включає якісні зміни в

глікозилюванні нативних білків, що включають в себе зміни природи і пропорцій різноманітних присутніх вуглеводних фрагментів.

Глікозилювання антитіл і інших поліпептидів є звичайно або N-зв'язаним або O-зв'язаним. N-зв'язане стосується приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагінового залишку. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, де X являє собою будь-яку амінокислоту за винятком проліну, є розпізнавальними послідовностями для ферментативного приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагіну. Таким чином, присутність однієї з двох цих трипептидних послідовностей в поліпептиді створює потенційну ділянку глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання стосується приєднання одного з цукрів N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози до гідроксиамінокислоти, найчастіше серину або треоніну, хоч 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін також можуть застосовуватися.

Додавання ділянки глікозилювання до антитіла проти TAT або поліпептиду TAT загальноприйнято здійснюють за допомогою зміни амінокислотної послідовності таким чином, що вона містить одну або більше з вищеописаних трипептидних послідовностей (для N-зв'язаних ділянок глікозилювання). Зміна також може бути проведена за допомогою доповнення або заміни одного або більше залишків серину або треоніну залишками до послідовності вихідного антитіла проти TAT або поліпептиду TAT (для O-зв'язаних ділянок глікозилювання). Амінокислотна послідовність антитіла проти TAT або поліпептиду TAT може необов'язково бути змінена через зміни на рівні ДНК, конкретно, за допомогою мутації ДНК, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT по попередньо вибраних основах таким чином, що генеруються кодони, які будуть трансльовані в бажані амінокислоти.

Ще один інший засіб збільшення числа вуглеводних фрагментів на антитілі проти TAT або поліпептиді TAT являє собою хімічне або ферментативне сполучення глікозидів з поліпептидом. Такі способи описані в даній галузі, наприклад, в WO 87/05330, опублікованої 11 вересня 1987 р., і у Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

Видалення вуглеводних фрагментів, присутніх на антитілі проти TAT або поліпептиді TAT, може виконуватися хімічно або ферментативно або за допомогою мутаційної заміни кодонів, які кодують амінокислотні залишки, які служать як мішені для глікозилювання. Методи хімічного деглікозилювання відомі в даній галузі і описані, наприклад, Hakimuddin, et al, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) і Edge et al, Anal. Biochem., 118: 131 (1981). Ферментативне відщеплення вуглеводних фрагментів на поліпептидах може досягатися за допомогою застосування різноманітних ендо- і екzogлікозидаз, як описано Thotakura et al, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Ще один інший тип ковалентної модифікації антитіла проти TAT або поліпептиду TAT включає зв'язування антитіла або поліпептиду з одним з різноманітних небілкових полімерів, наприклад, поліетиленгліколем (PEG), поліпропіленгліколем або поліоксіалкіленами, чином, викладеним в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337. Антитіло або поліпептид також можуть бути укладені в мікрокапсули, отримані, наприклад, методом коацервації або міжфазною полімеризацією (наприклад, гідроксиметилцелюлозі або желатинові мікрокапсули і полі-(метилметакрилат)ні мікрокапсули, відповідно), в колоїдні системи доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи розкриті в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Антитіло проти TAT або поліпептид TAT даного винаходу також можуть бути модифіковані таким чином, щоб утворити химерні молекули, що містять антитіло проти TAT або поліпептид TAT, рекомбіновані з ще одним, гетерологічним поліпептидом або амінокислотою послідовністю.

У одному варіанті здійснення, така химерна молекула містить гібрид антитіла проти TAT або поліпептиду TAT з поліпептидом з міткою, який надає епітоп, з яким антитіло проти мітки може селективно зв'язуватися. Епітопну мітку звичайно розміщують по аміно- або карбоксильному кінцю антитіла проти TAT або поліпептиду TAT. Присутність таких епітоп-мічених форм антитіла проти TAT або поліпептиду TAT може бути виявлена з використанням антитіла проти поліпептиду з міткою. Також, надання епітопної мітки забезпечує легке очищення антитіла проти TAT або поліпептиду TAT за допомогою афінного очищення з використанням антитіла проти мітки або ще одного типу афінної матриці, яка зв'язується з епітопною міткою. Різноманітні поліпептиди з міткою і їх відповідні антитіла є добре відомими в даній галузі. Приклади включають мітки полі-гістидин (полі-his) або полі-гістидин-гліцин (полі-his-gly); поліпептид з міткою flu HA і його антитіло 12CA5 [Field et al, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; мітку c-myc і 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 і 9E10 антитіла до нього [Evan et al, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; і мітка глікопротеїн D (gD) вірусу Herpes Simplex і її антитіло [Paborsky et al, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Інші поліпептиди з міткою включають Flag-пептид [Hopp

et al, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; епітопний пептид KT3 [Martin et al, Science, 255: 192-194 (1992)]; α -тубуліновий епітопний пептид [Skinner et al, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; і пептидну мітку білка 10 гена T7 [Lutz-Freyermuth et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

У альтернативному варіанті здійснення, химерна молекула може містити гібрид антитіла проти TAT або поліпептиду TAT з імуноглобуліном або конкретною областю імуноглобуліну. Для бівалентної форми химерної молекули (що також називається "імуноадгезин"), така гібридизація може проводитися з Fc-областю молекули IgG. Гібриди Ig, переважно, включають заміну розчинної (трансмембранний домен підданий делеції або інактивованій) форми антитіла проти TAT або поліпептиду TAT замість щонайменше однієї варіабельної області всередині молекули Ig. У особливо переважному варіанті здійснення, імуноглобуліновий гібрид включає шарнір, CH2 і CH3, або шарнір, CH1, CH2 і CH3 області молекули IgG1. Про отримання імуноглобулінових гібридів див. також патент США № 5428130, виданий 27 червня 1995 року.

I. Отримання антитіл проти TAT і поліпептидів TAT

Опис нижче стосується передусім отримання антитіл проти TAT і поліпептидів TAT за допомогою культивування клітин, трансформованих або трансфікованих вектором, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло проти TAT і поліпептид TAT. Передбачають, звичайно, що альтернативні способи, які є добре відомими в даній галузі, можуть використовуватися для отримання антитіл проти TAT і поліпептидів TAT. Наприклад, відповідна амінокислотна послідовність, або її частини, можуть бути отримані за допомогою безпосереднього пептидного синтезу з використанням твердофазних методів [див., наприклад, Stewart et al, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc, 85:2149-2154 (1963)]. Синтез білка *in vitro* може здійснюватися з використанням ручних методів або за допомогою автоматизації. Автоматизований синтез може здійснюватися, наприклад, з використанням пептидного синтезатора від Applied Biosystems (Foster City, CA) з використанням інструкцій виробника. Різноманітні частини антитіла проти TAT або поліпептиду TAT можуть бути хімічно синтезовані окремо і об'єднані з використанням хімічних або ферментативних способів для отримання бажаних антитіла проти TAT або поліпептиду TAT.

1. Виділення ДНК, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT

ДНК, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT, може бути отримана з бібліотеки кДНК, отриманої з тканини, яка, як вважають, має мРНК антитіла проти TAT або поліпептиду TAT, і експресують її на виявлюваному рівні. Відповідно, ДНК людини для антитіла проти TAT або поліпептиду TAT може бути зручним чином отримана з бібліотеки кДНК, отриманої з тканини людини. Ген, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT, також може бути отриманим з геномної бібліотеки або за допомогою відомих синтетичних методик (наприклад, автоматизованого синтезу нуклеїнової кислоти).

Бібліотеки можуть бути піддані скринінгу за допомогою зондів (таких як олігонуклеотиди, зі щонайменше приблизно 20-80 основ) сконструйованих для ідентифікації гена, що представляє інтерес, або білка, що кодується ним. Скринінг кДНК або геномної бібліотеки за допомогою вибраного зонда може проводитися з використанням стандартних методик, таких як описані у Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Альтернативним засобом для виділення гена, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT, є застосування методології ПЛР [Sambrook et al., вище; Dieffenbach et al., PCR Primer: Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Методи скринінгу бібліотеки кДНК є добре відомими в даній галузі. Олігонуклеотидні послідовності, вибрані як зонди, повинні мати достатню довжину і бути досить однозначними, щоб хибнопозитивні результати були мінімізовані. Олігонуклеотид, переважно, мітять таким чином, щоб він міг бути виявлений при гібридизації з ДНК в бібліотеці, що піддається скринінгу. Способи мічення є добре відомими в даній галузі, і включають застосування радіоактивних міток, подібно до ^{32}P -міченого АТФ, біотинілювання або мічення ферменту. Умови гібридизації, що включають помірну суворість і високу суворість, надані в Sam brook et al, вище.

Послідовності, ідентифіковані в таких способах скринінгу бібліотек, можуть порівнюватися і вирівнюватися з іншими відомими послідовностями, депонованими і доступними в загальнодоступних базах даних, таких як GenBank або інші приватні бази даних послідовностей. Ідентичність послідовності (або на амінокислотному або нуклеотидному рівні) всередині певних областей молекули або вздовж непроцесованої послідовності може бути визначена з використанням способів, відомих в даній галузі, і як описано в даній заявці.

Нуклеїнова кислота, що має послідовність, яка кодує білок, може бути отримана за допомогою скринінгу вибраної кДНК або геномних бібліотек з використанням розшифрованої амінокислотної послідовності, описаної в даній заявці вперше, і, якщо необхідно, з

використанням загальноприйнятих методик добування праймера, як описано в Sambrook et al., вище, для виявлення попередників і процесингу інтермедіатів мРНК, які можуть не бути зворотно-транскрибованими в кДНК.

2. Вибір і трансформація клітин-хазяїв

Клітини-хазяї трансфікують або трансформують за допомогою векторів експресії або клонування, описаних в даній заявці для отримання антитіла проти ТАТ або поліпептиду ТАТ, і культивують в загальноприйнятих поживних середовищах, модифікованих відповідним чином для індукції промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, які кодують бажані послідовності. Умови культивування, такі як середовища, температура, рН і т. п., можуть бути вибрані кваліфікованим фахівцем без зайвого експериментування. Загалом, принципи, протоколи і практичні методи для максимізації продуктивності клітинних культур можна знайти в Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) і Sambrook et al., вище.

Способи трансфекції еукаріотичних клітин і трансформації прокариотичних клітин відомі рядовому фахівцю в даній галузі, наприклад, CaCl_2 , CaPO_4 , ліпосо-опосередкована і електропорація. Залежно від застосовуваної клітини-хазяя, трансформацію здійснюють з використанням стандартних методів, відповідних для таких клітин. Обробку кальцієм з використанням хлориду кальцію, як описано в Sambrook et al., вище, або електропорацію звичайно застосовують для прокариотів. Інфекцію з *Agrobacterium tumefaciens* застосовують для трансформації деяких рослинних клітин, як описано у Shaw et al, Gene, 23:315 (1983) і в WO 89/05859, опублікованої 29 червня 1989 року. Для клітин ссавців без таких клітинних стінок може використовуватися метод осадження фосфатом кальцію Graham і van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Загальні аспекти трансфекції систем клітин-хазяїв ссавців був описані в патенті США № 4399216. Трансформації в дріжджі звичайно проводять відповідно до способу Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) і Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Однак, також можуть застосовуватися інші способи для введення ДНК в клітини, такі як за допомогою ядерної мікроін'єкції, електропорації, гібридизації бактерійних протопластів з інтактними клітинами, або полікатіони, наприклад, полібрен, поліорнітин. Різноманітні методи трансформації клітин ссавців, див. Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) і Mansour et al, Nature, 336:348-352 (1988).

Прийнятні клітини-хазяї для клонування або експресії ДНК у векторах в даній заявці включають клітини прокариотів, дріжджів або вищі еукаріотичні клітини. Прийнятні прокариоти включають, але не обмежені лише ними, еубактерії, такими як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, такі як *E. coli*. Різноманітні штами *E. coli* є загальнодоступними, такі як *E. coli* K12 штам MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* штам W3110 (ATCC 27,325) і K5 772 (ATCC 53,635). Інші прийнятні прокариотичні клітини-хазяї включають *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, наприклад, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, наприклад, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, наприклад, *Serratia marcescans* і *Shigella*, а також *Bacilli*, такі як *B. subtilis* і *B. licheniformis* (наприклад, *B. licheniformis* 41P, розкриті в DD 266710, опублікованій 12 квітня 1989 р.), *Pseudomonas*, такі як *P. aeruginosa*, і *Streptomyces*. Ці приклади є ілюстративними в більшій мірі, ніж обмежувальними. Штам W3110 є одним особливо переважним хазяєм або батьківським хазяєм, оскільки він являє собою загальний штам хазяя для ферментацій продукту рекомбінантної ДНК. Переважно, клітина-хазяїн секретує мінімальні кількості протеолітичних ферментів. Наприклад, штам W3110 може бути модифікований для надання впливу на генетичну мутацію в генах, що кодують білки, ендогенні для хазяя, з прикладами таких хазяїв, що включають *E. coli* W3110 штам 1A2, який має повний генотип *tonA*; *E. coli* W3110 штам 9E4, який має повний генотип *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 штам 27C7 (ATCC 55,244), який має повний генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kanr*; *E. coli* W3110 штам 37D6, який має повний генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr*; *E. coli* W3110 штам 40B4, який є штамом 37D6 з не-канаміцин резистентною *degP* делеційною мутацією; і *E. coli* штам, що має мутантну периплазматичну протеазу, розкриту в патенті США № 4946783, виданому 7 серпня 1990 р. Альтернативно, відповідними є способи клонування *in vitro*, наприклад, ПЛР або інші полімеразні реакції нуклеїнових кислот.

Первинне антитіло, фрагменти антитіла і гібридні білки антитіла, можуть продукуватися в бактеріях, особливо тоді, коли глікозилювання і Fc ефекторні функції не є необхідними, в таких випадках, коли терапевтичне антитіло є кон'югованим з цитотоксичним агентом (наприклад, токсином) і імунокон'югат самим по собі показує ефективність при деструкції пухлинної клітини. Первинні антитіла мають більш високий період напівжиття при циркуляції. Отримання в *E. coli* є більш швидким і більш економічним. По експресії фрагментів антитіл і поліпептидів в бактеріях,

див., наприклад, патент США № 5648237 (Carter et. al), патент США № 5789199 (Joly et al) і патент США № 5840523 (Simmons et al.), який описує ямку трансляції-ініціації (TIR) і сигнальні послідовності для оптимізації експресії і секреції, причому ці патенти включені в даній заявці за допомогою посилання. Після експресії, антитіло виділяють з клітинної пасти *E. coli* в розчинну фракцію, і воно може бути очищене за допомогою, наприклад, колонки з білком А або G залежно від ізотипу. Остаточне очищення можна проводити аналогічно способу очищення антитіла, яке експресується, наприклад, в клітинах CHO.

У доповнення до прокаріотів, еукаріотичні мікроби, такі як міцеліальні гриби або дріжджі, є прийнятними хазяями для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло проти ТАТ або поліпептиду ТАТ. *Saccharomyces cerevisiae* являє собою звичайно використовуваний нижчий еукаріотичний мікроорганізм-хазяїн. Інші включають *Schizosaccharomyces pombe* (Beach і Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139383 опублікований 2 травня 1985 року); *Kluyveromyces* хазяя (патент США № 4943529; Fleer et al, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) такі як, наприклад, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906; Van den Berg et al, Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, і *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al, J. Basic Microbiol, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomycetes*, такі як *Schwanniomycetes occidentalis* (EP 394538 опублікований 31 жовтня 1990 року); і міцеліальні гриби такі як, наприклад, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 опублікований 10 січня 1991 року), і хазяя *Aspergillus*, такі як *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) і *A. niger* (Kelly і Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Метилотропні дріжджі є прийнятними в даній заявці, і включають, але не обмежені лише ними, дріжджі, здатні до росту на метанолі, вибрані з родів, що складаються з *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* і *Rhodotorula*. Перелік конкретних видів, які є представницькими прикладами цього класу дріжджів можна знайти в C. Anthony, Biochemistry Methylotrophs, 269 (1982).

Прийнятні клітини-хазяї для експресії глікозилованих антитіл проти ТАТ або поліпептиду ТАТ виробляють з багатоклітинних організмів. Приклади клітин безхребетних включають клітини комах, таких як *Drosophila* S2 і *Spodoptera Sf9*, а також рослинні клітини, такі як культури клітин бавовни, кукурудзи, картоплі, соєвих бобів, петунії, томатів і тютюну. Були ідентифіковані численні бакуловірусні штами і варіанти і відповідні пермісивні клітини-хазяї комах з хазяїв, таких як *Spodoptera frugiperda* (гусінь), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодова мушка) і *Bombyx mori*. Різноманітні вірусні штами для трансфекції є загальнодоступними, наприклад, L-1 варіант *Autographa californica* NPV і штам Bm-5 *Bombyx mori* NPV, і такі віруси можуть застосовуватися в даній заявці як вірус відповідно до даного винаходу, конкретно для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Однак, найбільший інтерес представляють клітини хребетних, і розмноження клітин хребетних в культурі (культура тканини) стало звичайною методикою. Прикладами застосовних ліній клітин-хазяїв ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія клітин нирки ембріона людини (293 або клітини 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини нирки хом'яків (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'яка/-DHFR (CHO, Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клітини мишей Сертолі (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини людини карциноми шийки матки (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легені людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather et al, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4; і лінії гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-хазяї трансформують описаними вище експресійними або клонуючими векторами для вироблення антитіл проти ТАТ або поліпептиду ТАТ і культивують в загальноприйнятих поживних середовищах, модифікованих відповідним чином для індукції промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, які кодують бажані послідовності.

3. Селекція і застосування реплікованого вектора

Нуклеїнова кислота (наприклад, кДНК або геномна ДНК), що кодує антитіла проти ТАТ або поліпептиду ТАТ, може бути введена в реплікований вектор для клонування (ампліфікації ДНК)

або для експресії. Різноманітні вектори є загальнодоступними. Вектор може, наприклад, знаходитися у вигляді плазміди, косміди, вірусної частинки або фагу. Відповідна послідовність нуклеїнової кислоти може бути введена у вектор за допомогою різноманітних методик. Як правило, ДНК вводять у відповідні сайт(и) рестрикційної ендонуклеази з використанням методів, відомих в даній галузі. Векторні компоненти звичайно включають, але не обмежені лише ними, одну або більше з сигнальних послідовностей, джерело реплікації, один або більше маркерних генів, енхансерний елемент, промотор, і послідовність термінації транскрипції. У конструкції відповідних векторів, які містять один або більш з цих компонентів, використовують стандартні методи лігування, які є відомими для кваліфікованого фахівця в даній галузі.

TAT може продукуватися рекомбінантно не тільки безпосередньо, але також як поліпептид, гібридний з гетерологічним поліпептидом, який може являти собою сигнальну послідовність або інший поліпептид, що має специфічну ділянку розщеплення по N-кінцю зрілого білка або поліпептиду. Загалом, сигнальна послідовність може являти собою компонент вектора, або вона може бути частиною антитіла проти TAT- або поліпептид TAT-кодуючої ДНК, яку вводять у вектор. Сигнальна послідовність може являти собою прокаріотичну сигнальну послідовність, вибрану, наприклад, з групи лідерів по лужній фосфатазі, пеніциліназі, Ippr або термостабільному ентеротоксину II. Для секреції дріжджами сигнальна послідовність може являти собою, наприклад, лідер по дріжджовій інвертазі, лідер по альфа-фактору (включаючи лідерів по α -фактору для *Saccharomyces* і *Kluuyveromyces*, останній описаний в патенті США № 5010182), або лідер по кислотній фосфатазі, лідер по глюкоамілазі для *C. albicans* (EP 362179 опублікована 4 квітня 1990 року), або сигнальна послідовність, описана в WO 90/13646, опублікованій 15 листопада 1990 року. При експресії клітинами ссавців, сигнальні послідовності ссавців можуть застосовуватися для безпосередньої секреції білка, такі як сигнальні послідовності від секретованих поліпептидів такого ж або спорідненого виду, а також вірусні секреторні лідери.

Як експресійні, так і клонуючі вектори містять послідовність нуклеїнової кислоти, яка забезпечує реплікацію вектора в одній або більше вибраних клітинах-хазяях. Такі послідовності є добре відомими для різноманітних бактерій, дріжджів і вірусів. Точка початку реплікації з плазміди pBR322 є відповідною для більшості грамнегативних бактерій, точка початку реплікації 2 μ плазміди є прийнятною для дріжджів, і різноманітні вірусні точки (SV40, поліоми, аденовіруса, VSV або BPV) є застосовними для клонування векторів в клітинах ссавців.

Експресійні і клонуючі вектори будуть типовим чином містити ген селекції, який також називається селектованим маркером. Типові гени селекції кодують білки, які (а) додають резистентності до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну, (b) доповнюють ауксотрофні недоліки, або (c) постачають критичні поживні компоненти, недоступні зі складних середовищ, наприклад, ген, що кодує рацемазу D-аланіну для *Bacilli*.

Прикладом прийнятних селектованих маркерів для клітин ссавців є маркери, які дозволяють проводити ідентифікацію клітин, компетентних за перенесення антитіл проти TAT- або поліпептид TAT-кодуючої нуклеїнової кислоти, такі як DHFR або тимідинкіназа. Відповідні клітини-хазяї, коли використовують DHFR дикого типу, являє собою лінію клітин CHO за відсутності активності DHFR, отриману і розмножену, як описано Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Прийнятний ген селекції для застосування в дріжджах являє собою ген *trp1*, присутній в дріжджовій плазміді YRp7 [Stinchcomb et al, Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)]. Ген *trp1* надає селекційний маркер для мутантного штаму дріжджів, у яких відсутня здатність рости в присутності триптофану, наприклад, ATCC No. 44076 або PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

Експресійні і клонуючі вектори звичайно містять промотор, функціонально зв'язаний з антитілом проти TAT або послідовністю поліпептид TAT-кодуючої нуклеїнової кислоти, щоб направляти синтез мРНК. Промотори, визнані різними потенційними клітинами-хазяями, є добре відомими. Промотори, прийнятні для застосування з прокаріотичними хазяями, включають промоторні системи β -лактамази і лактози [Chang et al, Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al, Nature, 281:544 (1979)], лужної фосфатази, триптофанову (*trp*) промоторну систему [Goeddel, Nucleic Кислоти Res., 8:4057 (1980); EP 36776] і гібридні промотори, такі як *tac* промотор [deBoer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Промотори для застосування в бактерійних системах також будуть містити Shine-Dalgarno (S.D.) послідовність, функціонально зв'язану з ДНК, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT.

Приклади прийнятних промотуючих послідовностей для застосування з дріжджовими хазяями, включають промотори для 3-фосфогліцераткінази [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] або інших гліколітичних ферментів [Hess et al, J. Adv. Фермент Reg., 7: 149

(1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], таких як енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, триозефосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза і глюкокіназа.

Інші дріжджові промотори, які являють собою індуковані промотори, що мають додаткову перевагу в транскрипції, що контролюється умовами росту, є промоторними областями для алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрома C, кислотної фосфатази, деградаційних ферментів, пов'язаних з метаболізмом азоту, металотіонеїну, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази і ферментів, що відповідають за утилізацію мальтози і галактози. Прийнятні вектори і промотори для застосування в експресії дріжджів додатково описані в EP 73657.

Транскрипція антитіла проти TAT або поліпептиду TAT з векторів у клітин-хазяїв ссавців контролюється, наприклад, промоторами, отриманими від геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус віспи курей (UK 2211504 опублікований 5 липня 1989 року), аденовірус (такий як Аденовірус 2), вірус бичачої папіломи, вірус пташиної саркоми, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В і Вірус Мавп 40 (SV40), від гетерологічних промоторів ссавців, наприклад, промотору актину або промотору імуноглобуліну, і від промоторів теплового шоку, при умові, що такі промотори є сумісними з системами клітини-хазяя.

Транскрипція ДНК, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT, вищими еукаріотами може бути збільшена за допомогою введення енхансерної послідовності у вектор. Енхансери є цис-діючими елементами ДНК, звичайно приблизно від 10 до 300 п. о., які діють на промотор для збільшення його транскрипції. Багато які енхансерні послідовності з генів ссавців є в цей час відомими (глобін, еластаза, альбумін, α -фетопротейн і інсулін). Типово, однак, буде застосовуватися енхансер з вірусу еукаріотичних клітин. Приклади включають енхансер SV40 на кінцевій стороні точки початку реплікації (п. о. 100-270), цитомегаловірус енхансер раннього промотору, енхансер полііоми на кінцевій стороні точки початку реплікації і аденовірусні енхансери. Енхансер може бути сплайсований у вектор по положенню 5' або 3' послідовності, яка кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT, але, переважно, розташований на сайті 5' від промотору.

Експресійні вектори, які застосовуються в еукаріотичних клітинах-хазяях (дріжджових, грибових, комах, рослинних, тваринних, людських або ядровмісних клітинах з інших багатоклітинних організмів) будуть також містити послідовності, необхідні для термінації транскрипції і для стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно є доступними від 5' і, іноді 3', нетрансльованих областей еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Ці області містять нуклеотидні сегменти, транскрибовані як поліаденільовані фрагменти позатрансльованої частини мРНК, що кодує антитіло проти TAT або поліпептид TAT.

Ще інші методи, вектори і клітини-хазяї, прийнятні для адаптації до синтезу антитіла проти TAT або поліпептиду TAT в культурі рекомбінантних клітин хребетних описані в Gething et al, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117060; і EP 117058.

4. Культивування клітин-хазяїв

Клітини-хазяї, що використовуються для продукування антитіл проти TAT або поліпептиду TAT даного винаходу, можуть культивуватися в різноманітних середовищах. Доступні на ринку середовища, такі як Ham's F10 (Sigma), мінімальне підтримуюче середовище (MEM, (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), і модифіковане Дульбекко середовище Ігла (DMEM, Sigma) є прийнятними для культивування клітин-хазяїв. В доповнення, будь-яке з середовищ, описаних в Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; або 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; або патенті США Re. 30985, може застосовуватися як культуральне середовище для клітин-хазяїв. Будь-яке з цих середовищ може бути доповнене за потреби гормонами і/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин, або епідермальний фактор росту), солями (такими як хлорид натрію, кальцію, магнію і фосфат), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими, як аденозин і тимідин), антибіотиками (такими як лікарський засіб ГЕНТАМІЦИН™), слідовими елементами (визначеними як неорганічні сполуки, звичайно присутні при кінцевій концентрації в мікромолярному діапазоні) і глюкозою або еквівалентне джерело енергії. Будь-які інші необхідні добавки також можуть бути включені при відповідних концентраціях, які будуть відомими для кваліфікованих фахівців в даній галузі. Умови культивування, такі як температура, pH і т.п., являють собою умови, які раніше застосовувалися з клітиною-хазяєм, вибраною для експресії, і будуть очевидними для рядового фахівця в даній галузі.

5. Виявлення ампліфікації/експресія гена

Ампліфікація і/або експресія гена можуть бути виміряні в зразку безпосередньо, наприклад, за допомогою загальноприйнятого саузерн-блотингу, нозерн-блотингу для кількісної оцінки

транскрипції мРНК [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блотингу (аналізу ДНК), або гібридизації *in situ*, з використанням відповідним чином міченого зонда, на основі послідовностей, наданих в даній заявці. Альтернативно, можуть використовуватися антитіла, які можуть розпізнавати конкретні дуплекси, включаючи ДНК дуплекси, РНК дуплекси і ДНК-РНК гібридні дуплекси або ДНК-білкові дуплекси. Антитіла в свою чергу можуть бути міченими, і може здійснюватися аналіз, де дуплекс зв'язаний з поверхнею, таким чином, що при утворенні дуплекса на поверхні присутність антитіла, зв'язаного з дуплексом, може бути виявлена.

Експресія гена, альтернативно, може бути виміряна за допомогою імунологічних методів, таких як імуногістохімічне фарбування клітин або зрізів тканин і аналіз клітинної культури або рідин організму, для безпосередньої кількісної оцінки експресії генного продукту. Антитіла, застосовні для імуногістохімічного фарбування і/або аналізу зразка текучих середовищ, можуть бути або моноклональними, або поліклональними, і можуть бути отримані в будь-якому ссавці. Загальноприйнято, можуть бути отримані антитіла проти поліпептиду ТАТ з нативною послідовністю або проти синтетичного пептиду на основі послідовностей ДНК, наданих в даній заявці, або проти екзогенної послідовності, рекомбінованої з ДНК ТАТ і кодуючої конкретний епітоп антитіла.

6. Очищення антитіла проти ТАТ і поліпептиду ТАТ

Форми антитіла проти ТАТ і поліпептиду ТАТ можуть бути витягнуті з культурального середовища або з лізатів клітин-хазяїв. Якщо воно є мембранно-зв'язаним, воно може вивільнятися з мембрани з використанням відповідного розчину детергенту (наприклад, Triton-X 100) або за допомогою ферментативного розщеплення. Клітини, що використовуються при експресії антитіла проти ТАТ і поліпептиду ТАТ, можуть бути зруйновані різноманітними фізичними або хімічними засобами, такі як циклічне проведення заморожування-відтавання, руйнування ультразвуком, механічне руйнування, або агентами, лізуючими клітини.

Може бути бажаним очищати антитіла проти ТАТ і поліпептиду ТАТ від білків або поліпептидів рекомбінантних клітин. Наступні методики є представницькими прикладами відповідних методик очищення: фракціонування на іонообмінній колонці; осадження етанолом; обернено-фазова ВЕРХ; хроматографія на оксиді кремнію або на катіонообмінній смолі, такий як DEAE; хроматофокусування; SDS-PAGE; осадження сульфатом амонію; гель-фільтрація з використанням, наприклад, Сефрадекса G-75; колонки з Сефарозою і білком А, для видалення забруднюючих компонентів, таких як IgG; і колонки, хелатуючі метали, для зв'язування мічені епітопом форми антитіла проти ТАТ і поліпептиду ТАТ. Могуть використовуватися різноманітні методи очищення білка і такі методи є відомими в даній галузі і описані, наприклад в Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Вибрані стадії(ії) очищення будуть залежати, наприклад, від природи способу отримання і конкретного продукowanego антитіла проти ТАТ або поліпептиду ТАТ.

Коли використовують рекомбінантні технології, антитіла можуть продукуватися внутрішньоклітинно, в периплазматичному просторі, або безпосередньо секретуватися в середовищі. Якщо антитіло продукується внутрішньоклітинно, на першій стадії, залишки у вигляді частинок, або клітин-хазяїв або лізованих фрагментів, видаляють, наприклад, за допомогою центрифугування або ультрафільтрації. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описують методику виділення антитіл, які секретуються в периплазматичний простір *E. coli*. Коротко, клітинну пасту відморожують в присутності ацетату натрію (рН 3,5), ЕДТА і фенілметилсульфонілфториду (PMSF) протягом приблизно 30 хв. Залишки клітин можуть видалятися центрифугуванням. У тих випадках, де антитіло секретується в середовищі, супернатанти від таких експресійних систем, як правило, спочатку концентрують з використанням фільтра, що промислово виробляється, для концентрації білка, наприклад, ультрафільтраційного блока Amicon або Millipore Pellicon. Інгібітор протеаз, такий як PMSF, може бути включений в будь-яку з перерахованих вище стадій для інгібування протеолізу, і антибіотики можуть бути включені для запобігання росту непередбачених забруднюючих організмів.

Композиція антитіла, отримана з клітин, може бути очищена з використанням, наприклад, хроматографії на гідроксіапатиті, гель-електрофорезу, діалізу і афінної хроматографії, причому афінна хроматографія є переважним методом очищення. Придатність білка А як афінного ліганду залежить від виду і ізо типу Fc домену будь-якого імуноглобуліну, який присутній в антитілі. Білок А може застосовуватися для очищення антитіл, які основані на важких ланцюгах $\gamma 1$, $\gamma 2$ або $\gamma 4$ людини (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Білок G рекомендований для всіх мишачих ізо типів і для $\gamma 3$ людини (Guss et al, *EMBO J.* 5: 15671575 (1986)). Матрикс, до якого афінний ліганд приєднаний, найчастіше являє собою агарозу, але доступні і інші

матрикси. Механічно стійкі матрикси, такі як скло з контрольованим розміром пор або полі(стиролдивініл)бензол забезпечують більш швидкі швидкості потоку і більш короткий час обробки, чим може досягатися з агарозою. Там, де антитіло містить CH₃ домен, смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) є застосовною для очищення. Інші методи для

очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, осадження етанолом, обрернено-фазова ВЕРХ, хроматографія на оксиді кремнію, хроматографія на СЕФАРОЗІ™ з гепарином, хроматографія на аніоно- або катіонообмінній смолі (такій як колонка з поліаспарагіноювою кислотою), хроматофокусування, SDS-PAGE і осадження сульфатом амонію також є доступними залежно від витягуваного антитіла.

Після будь-якої попередньої стадії(ій) очищення, суміш, що містить антитіло, що представляє інтерес, і забруднюючі компоненти можуть бути піддані хроматографії гідрофобної взаємодії з низьким значенням рН з використанням елюючого буфера при рН приблизно 2,5-4,5, переважно, здійснюваної при низькій концентрації солі (наприклад, приблизно 0-0,25M солі).

І. Фармацевтичні лікарські форми

Терапевтичні лікарські форми антитіл проти ТАТ, ТАТ-зв'язувальних олігопептидів, ТАТ-зв'язувальних органічних молекул і/або поліпептидів ТАТ, що застосовуються відповідно до даного винаходу, отримують для зберігання за допомогою змішування антитіла, поліпептиду, олігопептиду або органічної молекули, що мають бажаний ступінь чистоти з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у вигляді ліофілізованих лікарських форм або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів при використовуваних дозуваннях і концентраціях і включають буфери, такі як ацетат, Тріс, фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); поліпептиди з низькою молекулярною масою (менше ніж приблизно 10 залишків); білки, такі як альбумін сироватки, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, що включають глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТА; тонізуючі засоби, такі як трегалоза і хлорид натрію; цукри, такі як сахароза, манітол, трегалоза або сорбітол; поверхнево-активний засіб, такий як полісорбат; солетворні протиіони, такі як іон натрію; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як ТВІН®, PLURONICS® або поліетиленгліколь (PEG). Антитіло, переважно, містить антитіло при концентрації 5-200 мг/мл, переважно, 10-100 мг/мл.

Лікарські форми в даній заявці можуть також містити більше однієї активної сполуки, за потреби для конкретного показання, для лікування, переважно, сполуки з комплементарними активностями, які не надають несприятливого впливу одна на одну. Наприклад, в доповнення до антитіла проти ТАТ, ТАТ-зв'язувального олігопептиду або ТАТ-зв'язувальної органічної молекули, може бути бажаним включати в одну лікарську форму додаткове антитіло, наприклад, друге антитіло проти ТАТ, яке зв'язується з різним епітопом на поліпептиді ТАТ, або антитіло до деякої іншої мішені, такої як фактор росту, яке впливає на ріст конкретного раку. Альтернативно, або додатково, композиція може додатково містити хіміотерапевтичний агент, цитотоксичний агент, цитокін, агент, інгібуючий ріст, антигормональний агент і/або кардіопротектор. Такі молекули відповідним чином присутні в комбінації в кількостях, які є ефективними для призначеної мети.

Активні інгредієнти також можуть бути інкапсульовані в мікрокапсули, отримані, наприклад, за допомогою методів коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, гідроксиметилцеллюлозні або желатинові мікрокапсули і полі-(метилметакрилат)ні мікрокапсули, відповідно, в системах доставки колоїдального лікарського засобу (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемulsіях. Такі методи розкриті в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можуть бути отримані препарати з уповільненим вивільненням. Прийнятні приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, причому матриці знаходяться у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Приклади матриць уповільненого вивільнення включають складні поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетил-метакрилат) або полі(вініловий спирт)), полілактиди (патент США № 3773919), співполімери L-глутамінової

кислоти і γ етил-L-глутамату, неруйнований етилен-вінілацетат, руйновані співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT® (ін'єктовані мікросфери, складені зі співполімера молочної кислоти-гліколевої кислоти і ацетату леупроліду), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляна кислота.

5 Лікарські форми, що застосовуються для введення *in vivo*, повинні бути стерильними. Це легко досягається за допомогою фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани.

К. Діагностика і лікування за допомогою антитіл проти TAT, TAT-зв'язувальних олігопептидів і TAT-зв'язувальних органічних молекул

10 Для визначення експресії TAT при раку, доступні різноманітні діагностичні аналізи. У одному варіанті здійснення, надекспресія поліпептиду TAT може бути проаналізована за допомогою імуногістохімії (ІГХ). Занурені в парафін зрізи тканин з біопсійних проб пухлини можуть бути піддані ІГХ аналізу і відповідні критерії інтенсивності фарбування TAT білка є наступними:

Бальна оцінка 0 - фарбування не спостерігають або фарбування мембран спостерігають у менше ніж 10 % пухлинних клітин.

15 Бальна оцінка 1+ - слабке/ледве фарбування мембран, що сприймається, виявляють у більше ніж 10 % пухлинних клітин. Клітини є забарвленими тільки частково по їх мембрані.

Бальна оцінка 2+ - від слабкого до помірно повного фарбування мембран спостерігають у більше ніж 10 % пухлинних клітин.

20 Бальна оцінка 3+ - від помірного до сильно повного фарбування мембран спостерігають у більше ніж 10 % пухлинних клітин.

Такі пухлини з Бальними оцінками 0 або 1+ для експресії поліпептиду TAT можуть характеризуватися як не надекспресуючі TAT, в той час як ці пухлини з Бальними оцінками 2+ або 3+ можуть характеризуватися як надекспресуючі TAT.

25 Альтернативно, або додатково, FISH аналізи, такі як INFORM® (що поставляється Ventana, Arizona) або PATHVISION® (Vysis, Illinois) можуть здійснюватися на фіксованій в формаліні, зануреній в парафін пухлинній тканині, щоб визначити ступінь (якщо є) надекспресії TAT в пухлині.

30 Надекспресія або ампліфікація TAT можуть бути оцінені з використанням діагностичного аналізу *in vivo*, наприклад, за допомогою введення молекули (такої як антитіло, олігопептид або органічна молекула), яка зв'язується з молекулою, що підлягає виявленню, і мітиться міткою (наприклад, радіоактивним ізотопом або флуоресцентною міткою), що виявляється, і зовнішнього сканування пацієнта для локалізації мітки.

35 Як описано вище, антитіла проти TAT, олігопептиди і органічні молекули винаходу мають різноманітні нетерапевтичні застосування. Антитіла проти TAT, олігопептиди і органічні молекули даного винаходу можуть бути застосовними для діагностики і визначення стадії поліпептид TAT-експресуючих раків (наприклад, при радіологічній візуалізації). Антитіла, олігопептиди і органічні молекули є також застосовними для очищення або імунопреципітації поліпептиду TAT з клітини, для виявлення і кількісної оцінки поліпептиду TAT *in vitro*, наприклад, при ELISA або Вестерн-блотингу, для знищення і усунення TAT-експресуючих клітин з популяції змішаних клітин як стадія при очищенні інших клітин.

40 У цей час, залежно від стадії раку, лікування раку включає в себе одну терапію або комбінацію з наступних терапій: хірургічне втручання для видалення ракової тканини, променеви терапію і хіміотерапію. Терапія із застосуванням антитіла проти TAT, олігопептиду або органічної молекули може бути особливо бажаною у немолодих пацієнтів, які погано переносять токсичність і побічні ефекти хіміотерапії, і при метастазуючому захворюванні, де променева терапія має обмежену застосовність. Направлений вплив на пухлину антитілами проти TAT, олігопептидами і органічними молекулами винаходу є застосовним для полегшення протікання TAT-експресуючих раків при первинній діагностиці захворювання або під час загострення. Для терапевтичних застосувань, антитіло проти TAT, олігопептид або органічна молекула може застосовуватися окремо або в комбінованій терапії з використанням, наприклад, гормонів, антиангіогенів або сполук, мічених радіоактивними ізотопами, або за допомогою хірургічного втручання, кріотерапії і/або променевої терапії. Лікування з використанням антитіла проти TAT, олігопептиду або органічної молекули може проводитися в сполученні з іншими видами загальноприйнятої терапії, або послідовно, з пре- або пост-загальноприйнятою терапією. Хіміотерапевтичні лікарські засоби, такі як TAXOTERE® (доцетаксел), TAXOL® (паклітаксел), естрамустин і мітоксантрон застосовують при лікуванні раку, особливо, у надійних пацієнтів. У даному способі винаходу для лікування або полегшення раку, раковому пацієнту може вводитися антитіло проти TAT, олігопептид або органічна молекула в сполученні з лікуванням одним або більше з попередніх хіміотерапевтичних агентів. Зокрема, 60 передбачається комбінована терапія паклітакселом і модифікованими похідними (див.,

наприклад, EP0600517). Антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічна молекула будуть вводиться разом з терапевтично ефективною дозою хіміотерапевтичного агента. У ще одному варіанті здійснення, антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу вводять в сполученні з хіміотерапією для посилення активності і ефективності впливу хіміотерапевтичного агента, наприклад, паклітакселу. Настільний довідник лікаря (PDR) розкриває дозування цих агентів, яке використовувалося при лікуванні різноманітних раків. Режим дозування і дозування цих згаданих вище хіміотерапевтичних лікарських засобів, які є терапевтично ефективними, буде залежати від конкретного раку, що піддається лікуванню, ступеня розвитку захворювання і інших факторів, з якими знайомий кваліфікований терапевт в даній галузі, і які можуть бути визначені терапевтом.

У одному конкретному варіанті здійснення, кон'югат, що містить антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, кон'юговані з цитотоксичним агентом, вводять пацієнту. Переважно, імунокон'югат, зв'язаний з ТАТ білком інтерналізується клітиною, приводячи в результаті до збільшеної терапевтичної ефективності впливу імунокон'югату при знищенні ракової клітини, з якою він зв'язується. У переважному варіанті здійснення цитотоксичний агент направлено діє або надає вплив на нуклеїнову кислоту в раковій клітині. Приклади таких цитотоксичних агентів описані вище і включають майтансиноїди, каліхеаміцини, рибонуклеази і ендонуклеази ДНК. Антитіла проти ТАТ, олігопептиди, органічні молекули або їх кон'югати з токсином вводять пацієнту-людині відповідно до відомих методів, таких як внутрішньовенне введення, наприклад, у вигляді болюса або за допомогою безперервної інфузії протягом періоду часу, за допомогою внутрішньом'язового, внутрішньочеревинного, інтрацеребрального, підшкірного, внутрішньосуглобового, інтасиновіального, інтратекального, перорального, місцевого або інгаляційного шляхів. Внутрішньовенне або підшкірне введення антитіла, олігопептиду або органічної молекули є переважним.

Інші терапевтичні режими можуть комбінуватися з введенням антитіла проти ТАТ, олігопептиду або органічної молекули. Комбіноване введення включає спільне введення, з використанням роздільних лікарських форм або одиначної фармацевтичної лікарської форми, і послідовне введення в альтернативному порядку, де, переважно, передбачений період часу, в той час як обидва (або всі) активні агенти одночасно виявляють їх біологічну активність. Переважно, така комбінована терапія приводить в результаті до синергістичного терапевтичного ефекту.

Може також бути бажаним комбінувати введення антитіл проти ТАТ або антитіл, олігопептидів або органічних молекул, з введенням антитіла, направлено проти ще одного іншого пухлинного антигена, зв'язаного з конкретним раком.

У ще одному варіанті здійснення, способи терапевтичного лікування даного винаходу включають в себе комбіноване введення антитіл проти ТАТ (або антитіл), олігопептидів або органічних молекул і одного або більше хіміотерапевтичних агентів або агентів, які інгібують ріст, що включають спільне введення з різних хіміотерапевтичних агентів. Хіміотерапевтичні агенти включають естрамустину фосфат, преднімустин, цисплатин, 5-фторурацил, мелфалан, циклофосфамід, гідроксисечовину і гідроксіуреатаксани (такі як паклітаксел і доксетаксел) і/або антрациклінові антибіотики. Отримання і режими дозування для таких хіміотерапевтичних агентів можуть застосовуватися відповідно до інструкцій виробника або визначають емпірично кваліфікованим практиком. Отримання і режими дозування для такої хіміотерапії також описані в Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Антитіло, олігопептид або органічна молекула можуть комбінуватися з антигормональною сполукою; наприклад, антиестрогенною сполукою, такою як тамоксифен; анти-прогестероном, таким як онапристон (див., EP 616812); або антиандрогеном, таким як флутамід, в дозуванні, відомому для таких молекул. У тих випадках, де рак, що піддається лікуванню, являє собою андроген-незалежний рак, пацієнт може попередньо бути підданий антиандрогенній терапії і, після того як рак стане андроген-незалежним, антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічна молекула (і необов'язково інший агент, як описано в даній заявці) можуть вводиться пацієнту.

Іноді, може бути сприятливим також спільно вводити пацієнту кардіопротектор (для запобігання або зниження дисфункції міокарда, пов'язаної з терапією) або один або більше цитокінів. У доповнення до вказаних вище терапевтичних режимів, пацієнт може бути підданий хірургічному видаленню ракових клітин і/або променевої терапії, перед, одночасно з або після терапії антитілом, олігопептидом або органічною молекулою. Прийнятні дозування для будь-якого з вказаних вище агентів, що спільно вводяться, являють собою дозування, що застосовуються в цей час, і можуть бути знижені внаслідок комбінованої дії (синергізму) агента і антитіла проти ТАТ, олігопептиду або органічної молекули.

Для профілактики або лікування захворювання, дозування і режим введення будуть вибрані терапевтом відповідно до відомих критеріїв. Відповідне дозування антитіла, олігопептиду або органічної молекули будуть залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, як визначено вище, тяжкості і протікання захворювання, незалежно від того, чи вводять антитіло, олігопептид або органічну молекулу в превентивних або терапевтичних цілях, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта і відповіді на антитіло, олігопептид або органічну молекулу, і думки лікуючого лікаря. Антитіло, олігопептид або органічну молекулу відповідним чином вводять пацієнту за один раз або протягом ряду терапій. Переважно, антитіло, олігопептид або органічну молекулу вводять за допомогою внутрішньовенної інфузії або за допомогою підшкірних ін'єкцій. Залежно від типу і тяжкості захворювання, приблизно від 1 мкг/кг до приблизно 50 мкг/кг маси тіла (наприклад, приблизно 0,1-15 мкг/кг/доза) антитіла може бути первинним кандидатним дозуванням для введення пацієнту, або, наприклад, за допомогою одного або більше роздільних введень, або за допомогою безперервної інфузії. Режим дозування може включати введення первинної навантажувальної дози, яка дорівнює приблизно 4 мкг/кг, з подальшою тижневою підтримкою дози, яка дорівнює приблизно 2 мкг/кг антитіла проти ТАТ. Однак, можуть бути застосовні інші режими дозування. Типове щоденне дозування може знаходитися в інтервалі від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше, залежно від факторів, згаданих вище. Для повторних введень протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування підтримують, поки не з'являється бажане придушення симптомів захворювання. Прогрес цієї терапії може легко реєструватися загальноприйнятими методами і аналізами і оснований на критеріях, відомих терапевту або іншим фахівцям, кваліфікованим в даній галузі.

Крім введення білка антитіла пацієнту, дана заявка передбачає введення антитіла за допомогою генної терапії. Таке введення нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло, охоплюється виразом "введення терапевтично ефективної кількості антитіла". Див., наприклад, WO96/07321, опубліковану 14 березня 1996 року, що стосується застосування генної терапії для генерації внутрішньоклітинних антитіл.

Існує два основних підходи до доставки нуклеїнової кислоти (що необов'язково міститься у векторі) в клітини пацієнта; *in vivo* і *ex vivo*. Для доставки *in vivo* нуклеїнову кислоту безпосередньо вводять ін'єкційно в пацієнта, звичайно на ділянки, де потрібне антитіло. Для лікування *ex vivo* клітини пацієнта видаляють, нуклеїнову кислоту вводять в ці виділені клітини, і модифіковані клітини вводять пацієнту або безпосередньо або, наприклад, інкапсульованими всередині пористих мембран, які імплантують в пацієнта (див., наприклад, патенти США №№ 4892538 і 5283187). Існують різноманітні способи, доступні для введення нуклеїнових кислот в життєздатні клітини. Методи варіюють залежно від того, чи переноситься нуклеїнова кислота в культивовані клітини *in vitro* або *in vivo* в клітини призначеного хазяя. Методи, прийнятні для перенесення нуклеїнової кислоти в клітини ссавців *in vitro*, включають застосування ліпосом, електропорації, мікроін'єкції, гібридизації клітин, DEAE-декстрана, метод осадження фосфатом кальцію, і т. д. Звичайно застосовуваний вектор для доставки гена *ex vivo* є ретровірусним вектором.

У цей час переважні методи перенесення нуклеїнової кислоти *in vivo* включають трансфекцію вірусними векторами (такими як аденовірус, вірус Herpes simplex I або адено-зв'язаний вірус) і системи на основі ліпідів (застосовні ліпіди для ліпід-опосередкованого перенесення являють собою DOTMA, DOPE і DC-Choi, наприклад). Для огляду відомих в цей час методик маркування генів і генної терапії див. Anderson et al, Science 256:808-813 (1992). Див. також WO 93/25673 і посилання, що цитуються в ній.

Антитіла проти ТАТ винаходу можуть знаходитися в різних формах, охоплених в даній заявці визначенням "антитіло". Таким чином, антитіла включають з повною довжиною або інтактне антитіло, фрагменти антитіла, антитіло з нативною послідовністю або амінокислотні варіанти, гуманізовані, химерні або гібридні антитіла, імунокон'югати і їх функціональні фрагменти. У гібридних антитілах послідовність антитіла є рекомбінованою з гетерологічною поліпептидною послідовністю. Антитіла можуть бути модифіковані по Fc-області для забезпечення бажаних ефекторних функцій. Як обговорюється більш детально в даній заявці в розділах, з відповідними Fc-областями, оголене антитіло, зв'язане на клітинній поверхні, може індукувати цитотоксичність, наприклад, через антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (ADCC) або за допомогою залучення комплементу в комплемент-залежну цитотоксичність, або деякого іншого механізму. Альтернативно, там, де бажано усунути або знизити ефекторну функцію, таким чином, щоб мінімізувати побічні ефекти або терапевтичні ускладнення, можуть застосовуватися деякі інші Fc-області.

У одному варіанті здійснення антитіло конкурує за зв'язування або зв'язується по суті з тим же епітопом, що і антитіла винаходу. Антитіла, що мають біологічні характеристики даних

антитіл винаходу проти ТАТ, також передбачаються, конкретно включаючи направлений вплив на пухлину *in vivo* і будь-яке інгібування проліферації клітин або цитотоксичні характеристики.

Способи отримання вказаних вище антитіл описані в даній заявці детально.

Дані антитіла проти ТАТ, олігопептиди і органічні молекули є застосовними для лікування

5 ТАТ-експресуючого раку або полегшення одного або більше симптомів раку у ссавця. Такий рак включає рак простати, рак сечовивідних шляхів, рак легені, рак молочної залози, рак товстої кишки і рак яєчника, більш конкретно, аденокарциному простати, карциноми ниркових клітин, колоректальні аденокарциноми, аденокарциноми легень, карциноми легеневих сквамозних клітин і плевральну мезотеліому. Раки охоплюють метастатичні раки будь-якого раку з
10 попередніх. Антитіло, олігопептид або органічна молекула мають здатність зв'язуватися з щонайменше частиною ракових клітин, які експресують поліпептид ТАТ у ссавця. У переважному варіанті здійснення, антитіло, олігопептид або органічна молекула є ефективними для руйнування або знищення ТАТ-експресуючих пухлинних клітин або інгібування росту таких пухлинних клітин, *in vitro* або *in vivo*, при зв'язуванні з поліпептидом ТАТ на клітині. Таке
15 антитіло включає оголене антитіло проти ТАТ (не кон'юговане з яким-небудь агентом). Оголені антитіла, які мають цитотоксичні або інгібуючі ріст клітин властивості можуть бути додатково зв'язані з цитотоксичним агентом для надання ним навіть більшої активності при деструкції пухлинних клітин. Цитотоксичні властивості можуть бути додані антитілу проти ТАТ за допомогою, наприклад, кон'югації антитіла з цитотоксичним агентом, з утворенням імунокон'югату, як описано в даній заявці. Цитотоксичний агент або агент, інгібуючий ріст, переважно, являє собою невелику молекулу. Токсини, такі як каліхеаміцин або майтансиноїд і їх аналоги або похідні, є переважними.

Винахід надає композицію, що містить антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу винаходу, і носій. З метою лікування раку, композиції можуть вводитися пацієнту, потребує такого лікування, де композиція може містити одне або більше антитіла проти
25 ТАТ, присутніх як імунокон'югат або як оголене антитіло. У додатковому варіанті здійснення, композиції можуть містити ці антитіла, олігопептиди або органічні молекули в комбінації з іншими терапевтичними агентами, такими як цитотоксичні або інгібуючі ріст агенти, включаючи хіміотерапевтичні агенти. Винахід також надає лікарські форми, що містять антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу винаходу, і носій. У одному варіанті здійснення лікарська форма являє собою терапевтичну лікарську форму, що містить фармацевтично прийнятний носій.

Ще одним іншим аспектом винаходу є виділені нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла проти ТАТ. Нуклеїнові кислоти, що кодують як Н, так і L ланцюга, і особливо залишки гіперваріабельної області, ланцюги яких кодують антитіло з нативною послідовністю, а також
35 варіанти, модифікації і гуманізовані версії антитіла є охопленими.

Винахід також надає способи, застосовні для лікування поліпептид ТАТ-експресуючого раку або пом'якшення одного або більше симптомів раку у ссавця, включаючи введення терапевтично ефективної кількості антитіла проти ТАТ, олігопептиду або органічної молекули
40 ссавцеві. Терапевтичні композиції антитіла, олігопептиду або органічної молекули можуть вводитися короткочасно (в гострому режимі) або хронічно або з перервами, як указано терапевтом. Також надані способи інгібування росту і знищення поліпептид ТАТ-експресуючих клітин.

Винахід також надає набори і промислові вироби, що містять щонайменше одне антитіло проти ТАТ, один олігопептид або одну органічну молекулу. Набори, що містять антитіла проти ТАТ, олігопептиди або органічні молекули, знаходять застосування, наприклад, для аналізів знищення ТАТ клітин, для очищення або імунопреципітації поліпептиду ТАТ з клітин. Наприклад, для виділення і очищення ТАТ, набір може містити антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, зв'язану з кульками (наприклад, кульками сефарози). Можуть бути
50 надані набори, які містять антитіла, олігопептиди або органічні молекули для виявлення і кількісного визначення ТАТ *in vitro*, наприклад, при ELISA або Вестерн-блотингу. Таке антитіло, олігопептид або органічна молекула, застосовні для виявлення, можуть бути надані разом з міткою, такою як флуоресцентна або радіоактивна мітка.

L. Промислові вироби і набори

55 Ще один інший варіант здійснення винаходу являє собою виріб, що містить матеріали, застосовні для лікування проти ТАТ експресуючого раку. Виріб містить контейнер і мітку або листок-вкладиш на контейнері або пов'язані з контейнером.

Прийнятні контейнери включають, наприклад, бутлі, пляшечки, шприци і т.д. Контейнери можуть бути утворені з різноманітних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер утримує
60 композицію, яка є ефективною для лікування ракового стану і може мати стерильний вхідний

отвір (наприклад, контейнер може являти собою мішок з внутрішньовенним розчином або пляшечку, що має пробку, яка піддається проколюванню голкою для гіподермальної ін'єкції). Щонайменше один активний агент в композиції являє собою антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу винаходу. Мітка або листок-вкладиш вказує на те, що композицію застосовують для лікування раку. Мітка або листок-вкладиш будуть додатково містити інструкції для введення композиції антитіла, олігопептиду або органічних молекул раковому пацієнту. Додатково, виріб може додатково містити другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатичну воду для ін'єкцій (BWFI), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрози. Він може додатково включати інші матеріали, бажані з комерційної точки зору і точки зору користувача, що включають інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Також надані набори, які є застосовними для різноманітних цілей, наприклад, для аналізів знищення ТАТ-експресуючих клітин, для очищення або імунопреципітації поліпептиду ТАТ з клітин. Для виділення і очищення поліпептиду ТАТ, набір може містити антитіло проти ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, зв'язану з кульками (наприклад, кульками сефарози). Можуть бути надані набори, які містять антитіла, олігопептиди або органічні молекули для виявлення і кількісного визначення поліпептиду ТАТ *in vitro*, наприклад, при ELISA або Вестерн-блотингу. Як і виріб, набір містить контейнер і мітку або листок-вкладиш на контейнері або пов'язані з контейнером. Контейнер втримує композицію, що містить щонайменше одне антитіло проти ТАТ, один олігопептид або одну органічну молекулу винаходу. Можуть бути включені додаткові контейнери, які містять, наприклад, розріджувачі і буфери, контрольні антитіла. Мітка або листок-вкладиш можуть надавати опис композиції, а також інструкції для призначеного *in vitro* або діагностичного застосування.

М. Застосування поліпептидів ТАТ і нуклеїнових кислот, які кодують ТАТ-поліпептид

Нуклеотидні послідовності (або їх комплемент), що кодують поліпептиди ТАТ, мають різноманітні застосування в галузі молекулярної біології, включаючи застосування як зонди гібридизації, в хромосомі і картуванні генів і в генерації антисмислових РНК і ДНК зондів. ТАТ-кодуюча нуклеїнова кислота буде також застосовною для отримання поліпептидів ТАТ за допомогою рекомбінантних методів, описаних в даній заявці, де ці поліпептиди ТАТ можуть знайти застосування, наприклад, при отриманні антитіл проти ТАТ, як описано в даній заявці.

Непроцесована нативна послідовність гена ТАТ або її частини можуть застосовуватися як зонди гібридизації для бібліотеки кДНК для виділення непроцесованої кДНК ТАТ або для виділення ще інших кДНК (наприклад, які кодують варіанти ТАТ або ТАТ, що зустрічаються в природі, з інших видів), які мають бажану ідентичність послідовності з нативною послідовністю ТАТ, описаною в даній заявці. Необов'язково, довжина зондів буде складати приблизно від 20 до приблизно 50 основ. Зонди гібридизації можуть бути похідними щонайменше частково від нових областей первинної нативної нуклеотидної послідовності, де ці області можуть бути визначені без зайвого експериментування або з геномних послідовностей, що включають промотори, енхансерні елементи і інтрони нативної послідовності ТАТ. За допомогою прикладу, метод скринінгу буде включати виділення кодуючої області гена ТАТ з використанням відомої послідовності ДНК для синтезу вибраного зонда з приблизно 40 основ. Зонди гібридизації можуть бути мічені різноманітними мітками, включаючи радіонуклеотиди, такими як ³²P або ³⁵S, або ферментативними мітками, такими як лужна фосфатаза, зв'язана із зондом через системи зв'язування авідин/біотин. Мічені зонди, що мають послідовність, комплементарну з послідовністю гена ТАТ даного винаходу, можуть застосовуватися для скринування бібліотек кДНК людини, геномних ДНК або мРНК, щоб визначити, з якими елементами таких бібліотек зонд гібридизується. Методи гібридизації описані з додатковими подробицями нижче в прикладах. Будь-які EST послідовності, розкриті в даній заявці, можуть схожим чином використовуватися як зонди, з використанням методів, розкритих в даній заявці.

Інші застосовні фрагменти нуклеїнових кислот, що кодують ТАТ, включають антисмислові або смислові олігонуклеотиди, що містять одониткову послідовність нуклеїнової кислоти, (або РНК, або ДНК), здатну до зв'язування з цільовими послідовностями мРНК (смисловий) ТАТ або ДНК (антисмисловий) ТАТ. Антисмислові або смислові олігонуклеотиди, відповідно до даного винаходу, містять фрагмент кодуючої області ДНК ТАТ. Такий фрагмент, звичайно містить щонайменше приблизно 14 нуклеотидів, переважно, від приблизно 14 до 30 нуклеотидів. Здатність виробляти антисмисловий або смисловий олігонуклеотид, на основі послідовності кДНК, що кодує даний білок описана, наприклад, у Stein і Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) і van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988).

Зв'язування антисмислових або смислових олігонуклеотидів з цільовими послідовностями нуклеїнової кислоти приводить в результаті до утворення дуплексів, які блокують транскрипцію

або трансляцію цільової послідовності за допомогою одного з декількох засобів, що включають посилену деградацію дуплексів, передчасну термінацію транскрипції або трансляції або за допомогою інших засобів. Такі способи охоплені даним винаходом. Антисмислові олігонуклеотиди, таким чином, можуть застосовуватися для блокування експресії ТАТ білків, де ці ТАТ білки можуть відіграти роль в індукції раку у ссавців. Антисмислові або смислові олігонуклеотиди додатково містять олігонуклеотиди, що мають модифіковані цукрово-фосфодієфірні кістяки (або інші цукрові зв'язування, такі як описані в WO 91/06629), і, де такі цукрові зв'язування є резистентними до ендогенних нуклеаз. Такі олігонуклеотиди з резистентними цукровими зв'язуваннями є стабільними *in vivo* (тобто, здатними чинити опір ферментативній деградації), але зберігають специфічність послідовності, щоб бути здатними до зв'язування з цільовими нуклеотидними послідовностями.

Переважають інтрагенні сайти для антисмислового зв'язування включають область, що включає трансляційний ініціаційний/стартовий кодон (5'-AUG/5'-ATG) або термінаційний/стоп кодон (5'-UAA, 5'-UAG і 5'-UGA/5'-TAA, 5'-TAG і 5'-TGA) відкритої рамки зчитування (ORF) гена. Ці області стосуються частини мРНК або гена, яка охоплює від приблизно 25 до приблизно 50 суміжних нуклеотидів в обох напрямках (тобто, 5' або 3') від кодона трансляції ініціації або термінації. Інші переважні області для антисмислового зв'язування включають: інтрони; екзони; інтрон-екзонні зчленування; відкриту рамку зчитування (ORF) або "кодуючу область", яка є областю між кодоном трансляції ініціації і кодоном трансляції термінації; 5'-кеп мРНК, яка містить N7-метилований залишок гуанозину, з'єднаний з 5'-найбільшим залишком мРНК через 5'-5' трифосфатний зв'язок і включає самі 5'-кеп структури, а також перші 50 нуклеотидів, що прилягають до кінця; 5' нетрансльована область (5'UTR), частина мРНК в 5' напрямку від кодона трансляції ініціації, і, таким чином, яка включає нуклеотиди між 5' кеп-сайтом і кодоном трансляції ініціації мРНК або відповідні нуклеотиди на гені; і 3' нетрансльовану область (3'UTR), частину мРНК в 3' напрямку від кодона трансляції термінації, і, таким чином, яка включає нуклеотиди між кодоном трансляції термінації і 3' кінцем мРНК або відповідними нуклеотиди на гені.

Конкретні приклади переважних антисмислових сполук, застосованих для інгібування експресії ТАТ білків, включають олігонуклеотиди, що містять модифіковані кістяки або неприродні міжнуклеозидні зв'язки. Олігонуклеотиди, що мають модифіковані скелети, включають олігонуклеотиди, які зберігають атом фосфору в скелеті, і олігонуклеотиди, які не мають атома фосфору в скелеті. Для цілей даного опису, і як іноді називаються в даній галузі, модифіковані олігонуклеотиди, які не мають атома фосфору в їх міжнуклеозидному скелеті, можуть також розглядатися як олігонуклеозиди. Переважні модифіковані олігонуклеотидні скелети включають, наприклад, фосфотіоати, хіральні фосфотіоати, фосфодитіоати, складні фосфотриєфіри, аміноалкілфосфотриєфіри, метил- і інші алкілфосфонати, що включають 3'-алкіленфосфонати, 5'-алкіленфосфонати і хіральні фосфонати, фосфінати, фосфорамідати, що включають 3'-амінофосфорамідат і аміноалкілфосфорамідати, тіонофосфорамідати, тіоноалкілфосфонати, тіоноалкілфосфотриєфіри, селенофосфати і борано-фосфати, що мають нормальні 3'-5' зв'язування, їх 2'-5' зв'язані аналоги, і мають обернену полярність, де одним або більше міжнуклеотидними зв'язками є зв'язки 3' із 3', 5' з 5' або 2' з 2'. Переважні олігонуклеотиди, що мають обернену полярність, містять одиничний 3' із 3' зв'язок при 3'-найбільшому міжнуклеотидному зв'язку, тобто одиничний обернений нуклеозидний залишок, який може бути абазичним (нуклеосонова пропущена або є гідроксильна група замість неї). Різноманітні солі, змішані солі і вільні кислотні форми також включені. Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання фосфоровмісних зв'язків, включають, але не обмежені лише ними, патенти США №№: 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5194599; 5565555; 5527899; 5721218; 5672697 і 5625050, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання.

Переважають модифіковані олігонуклеотидні скелети, які не включають в себе атом фосфору, мають скелети, які утворені за допомогою коротколанцюжкових алкільних або циклоалкільних міжнуклеозидних зв'язків, змішаних гетероатомних і алкільних або циклоалкільних міжнуклеозидних зв'язків, або одного або більше коротколанцюжкових гетероатомних або гетероциклічних міжнуклеозидних зв'язків. Такі включають скелети, що мають морфоліно-зв'язки (утворені частково від цукрової частини нуклеозиду); силоксанові скелети; сульфідні, сульфоксидні і сульфонові скелети; формацетильні і тіоформацетильні скелети; метиленформацетильні і тіоформацетильні скелети; рибоацетильні скелети; алкенвмісні скелети; сульфаматні скелети; метиленіміно і метиленгідразиніві скелети; сульфонатні і

сульфонамідні скелети; амідні скелети; і інші, які мають змішані N, O, S і CH.суб.2 компонентні частини. Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання таких олігонуклеозидів включають, але не обмежені лише ними, патенти США №№: 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5264562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5610289; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; 5792608; 5646269 і 5677439, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання.

У інших переважних антисмислових олігонуклеотидах, як цукор, так і міжнуклеозидний зв'язок, тобто, скелет, нуклеотидних структурні одиниці заміщені новими групами. Одиниці основ підтримуються для гібридизації за допомогою цільової сполуки відповідної нуклеїнової кислоти. Одну таку олігомерну сполуку, олігонуклеотидоміметик, який показав чудові гібридизаційні властивості, називають пептидною нуклеїновою кислотою (PNA). У сполуках PNA, цукровий скелет олігонуклеотиду заміщений амідом, що містить скелет, зокрема аміноетилгліциновий скелет. Нуклеооснови зберігаються і зв'язані безпосередньо або опосередковано з аза-азотними атомами амідної частини скелета. Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання сполук PNA, включають, але не обмежені лише ними, патенти США №№: 5539082; 5714331; і 5719262, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання. Додатковий посібник по сполуках PNA можна знайти у Nielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-1500.

Переважні антисмислові олігонуклеотиди включають фосфотіоатні скелети і/або гетероатомні скелети, і зокрема, $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ [відомий як метилен (метиліміно) або MMI скелет], $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ і $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ [де нативний фосфодіефірний скелет представлений як $-\text{O-P-O-CH}_2-$], описані у вказаному вище патенті США № 5489677, і амідні скелети вказаного вище патенту США № 5602240. Також переважними є антисмислові олігонуклеотиди, що мають структури морфоліно-скелета вказаного вище патенту США № 5034506.]

Модифіковані олігонуклеотиди можуть також містити один або більше заміщених цукрових фрагментів. Переважні олігонуклеотиди містять один з наступних в 2' положенні: OH; F; O-алкіл, S-алкіл, або N-алкіл; O-алкеніл, S-алкеніл або N-алкеніл; O-алкініл, S-алкініл або N-алкініл; або O-алкіл-O-алкіл, де алкіл, алкеніл і алкініл можуть бути заміщені або не заміщені $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкілом або $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ алкенілом і алкінілом. Особливо переважними є $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, де n і m складають від 1 до приблизно 10. Інші переважні антисмислові олігонуклеотиди містять один з наступних в 2' положенні: $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкаріл, аралкіл, O-алкаріл або O-аралкіл, SH, SCH_3 , OCN, Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , гетероциклоалкіл, гетероциклоалкаріл, аміноалкіламіно, поліалкіламіно, заміщений силіл, РНК-розщеплювальну групу, репортерну групу, інтеркалятор, групу для поліпшення фармакокінетичних властивостей олігонуклеотиду або групу для поліпшення фармакодинамічних властивостей олігонуклеотиду, і інші замісники, що мають схожі властивості. Переважна модифікація включає 2'-метоксіетокси ($2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, також відому як 2'-O-(2-метоксіетил) або 2'-MOE) (Martin et al, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) тобто, алкоксіалкокси групу. Додаткова переважна модифікація включає 2'-диметиламінооксіетокси, тобто, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ групу, також відому як 2'-DMAOE, як описано в даній заявці в прикладах нижче, і 2'-диметиламіноетоксіетокси (також відому в даній галузі як 2'-O-диметиламіноетоксіетил або 2'-DMAEOE), тобто, $2'\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$.

Додаткова переважна модифікація включає Закриті Нуклеїнові кислоти (LNA), в яких 2'-гідроксильна група зв'язана з 3' або 4' вуглецевим атомом цукрового кільця, за допомогою чого утворюючи біциклічний цукровий фрагмент. Зв'язок є, переважно, метиленовою ($-\text{CH}_2-$)_n групою, утворюючи місток між 2' кисневим атомом і 4' вуглецевим атомом, де n дорівнює 1 або 2. LNA і їх отримання описані в WO 98/39352 і WO 99/14226.

Інші переважні модифікації включають 2'-метокси ($2'\text{-O-CH}_3$), 2'-амінопропокси ($2'\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2'-аліл ($2'\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 2'-O-аліл ($2'\text{-O-CH}_2\text{-CH=CH}_2$) і 2'-фтор ($2'\text{-F}$). 2'-модифікація може знаходитися в арабіно (верхньому) положенні або рибо (нижньому) положенні. Переважною 2'-арабіно модифікацією є 2'-F. Аналогічні модифікації можуть також бути зроблені по інших положеннях на олігонуклеотиді, конкретно 3' положенні цукру на 3' кінцевому нуклеотиді або в 2'-5' зв'язаних олігонуклеотидах і 5' положенні 5' кінцевого нуклеотида. Олігонуклеотиди можуть також мати цукроміметики, такі як циклобутильні фрагменти замість пентофуранозильного цукру. Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання таких модифікованих цукрових структур, включають, але не обмежені лише ними, патенти США №№: 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785;

5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; 5792747; і 5700920, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання у всій його повноті.

Олігонуклеотиди можуть також включати модифікації або заміщення нуклеїнової основи (що часто називається в даній галузі просто як "основа"). Як використовують в даній заявці, "немодифіковані" або "природні" нуклеїнові основи включають пуринові основи аденін (A) і гуанін (G), і піримідинові основи тимін (T), цитозин (C) і урацил (U). Модифіковані нуклеїнові основи включають інші синтетичні і природні нуклеїнові основи, такі як 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гідроксиметилцитозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метильні і інші алкільні похідні аденіну і гуаніну, 2-пропільні і інші алкільні похідні аденіну і гуаніну, 2-тіоурацил, 2-тіотимін і 2-тіоцитозин, 5-галогенурацил і цитозин, 5-пропініл (-C≡C-CH₃ або -CH₂-C≡CH) урацил і цитозин і інші алкільні похідні піримідинових основ, 6-азоурацил, цитозин і тимін, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тіоурацил, 8-галоген, 8-аміно, 8-тіол, 8-тіоалкіл, 8-гідроксил і інші 8-заміщені аденіни і гуаніни, 5-галоген, особливо 5-бром, 5-трифторметил і інші 5-заміщені урацили і цитозини, 7-метилгуанін і 7-метиладенін, 2-F-аденін, 2-аміно-аденін, 8-азагуанін і 8-азааденін, 7-деазагуанін і 7-деазааденін, і 3-деазагуанін і 3-деазааденін. Додаткові модифіковані нуклеїнові основи включають трициклічні піримідини, такі як феноксазинцитидин (1H-піримідо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), фенотіазинцитидин (1H-піримідо[5,4-b][1,4]бензотіазин-2(3H)-он), G-затиски, такі як заміщений феноксазинцитидин (наприклад, 9-(2-аміноетокси)-H-піримідо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазолцитидин (2H-піримідо[4,5-b]індол-2-он), піридоіндолцитидин (H-піридо[3',2':4,5]піроло[2,3-d]піримідин-2-он). Модифіковані нуклеїнові основи можуть також включати основи, в яких пуринова або піримідинова основа заміщена іншими гетероциклами, наприклад 7-деаза-аденін, 7-деазагуанозин, 2-амінопіридин і 2-піридон. Додаткові нуклеїнові основи включають основи, розкриті в патенті США № 3687808, основи, розкриті в Concise Encyclopedia Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, і основи, розкриті Englisch et al, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Деякі з цих нуклеїнових основ є особливо застосовними для збільшення спорідненості зв'язування олігомерних сполук винаходу. Такі включають 5-заміщені піримідини, 6-азапіримідини і N-2, N-6 і O-6 заміщені пурини, що включають 2-амінопропіладенін, 5-пропінілурацил і 5-пропінілцитозин. Було показано, що 5-метилцитозинові заміщення збільшують стійкість дуплекса нуклеїнової кислоти на 0,6-1,2 градусів C. (Sanghvi et al, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) і є переважними заміщеннями основи, навіть більш особливо, коли поєднуються з 2'-О-метоксіетильними цукровими модифікаціями. Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання модифікованих нуклеїнових основ, включають, але не обмежені лише ними: патент США № 3687808, а також патенти США №№: 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5645985; 5830653; 5763588; 6005096; 5681941 і 5750692, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання.

Ще однією іншою модифікацією антисмислових олігонуклеотидів є хімічне зв'язування з олігонуклеотидом одного або більше фрагментів або кон'югатів, які посилюють активність, клітинний розподіл або клітинне захоплення олігонуклеотиду. Сполуки винаходу можуть включати кон'югатні групи, ковалентно зв'язані з функціональними групами, такими як первинні або вторинні гідроксильні групи. Кон'югатні групи винаходу включають інтеркалятори, репортерні молекули, поліаміни, поліаміди, поліетиленгліколи, прості полієфіри, групи, які посилюють фармакодинамічні властивості олігомерів, і групи, які посилюють фармакокінетичні властивості олігомерів. Типові групи кон'югатів включають холестерини, ліпіди, катіонні ліпіди, фосфоліпіди, катіонні фосфоліпіди, біотин, феназин, фолат, фенантритдин, антахінон, акридин, флуоресцеїни, родаміни, кумарини і барвники. Групи, які посилюють фармакодинамічні властивості, в контексті даного винаходу, включають групи, які поліпшують захоплення олігомера, посилюють резистентність олігомера до деградації, і/або посилюють послідовність-специфічну гібридизацію з РНК. Групи, які посилюють фармакокінетичні властивості, в контексті даного винаходу, включають групи, які поліпшують захоплення олігомера, розподіл, метаболізм або екскрецію. Кон'югатні фрагменти включають, але не обмежені лише ними, ліпідні фрагменти, такі як холестериновий фрагмент (Letsinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), холеву кислоту (Manoharan et al, Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), тіоефір, наприклад, гексил-S-тримілітол (Manoharan et al, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al, Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), тіохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), аліфатичний ланцюг, наприклад, залишки додекандіолу або ундецилу (Saison-Behmoaras et al, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al, FEBS Lett.,

1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al, Biochimie, 1993, 75, 49-54), фосфоліпід, наприклад, ди-гексадецил-гас-гліцерин або 1,2-ди-О-гексадецил-гас-гліцеро-3-Н-фосфонат триетиламонію (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), поліамін або ланцюг поліетиленгліколю (Manoharan et al, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), або адамантаноцтову кислоту (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), пальмітильний фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), або октадециламін або гексиламіно-карбоніл-оксихолестериновий фрагмент. Олігонуклеотиди винаходу можуть також бути кон'югованими з активними лікарськими речовинами, наприклад, аспірином, варфариним, фенілбутазоном, ібупрофеном, супрофеном, фенбуфеном, кетопрофеном, (S)-(+)-проанопрофеном, карпрофеном, дансилсаркозином, 2,3,5-трийодбензойною кислотою, флуфенаміновою кислотою, фоліною кислотою, бензотіадіазидом, хлортіазидом, діазепином, індометацином, барбітуратом, цефалоспорином, сульфамідним лікарським засобом, антидіабетичним засобом, антибактерійним засобом або антибіотиком. Кон'югати олігонуклеотид-лікарський засіб і їх отримання описані в патентній заявці США № 09/334130 (поданій 15 червня 1999 р.) і патентах США №№: 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 і 5688941, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання.

Не є необхідним для всіх положень в даній сполуці бути однорідно модифікованими, і, фактично, більше ніж одна з вищезгаданих модифікацій може бути введена в одиничну сполуку або навіть в одиничний нуклеозид в олігонуклеотиді. Даний винахід також включає антисмислові сполуки, які є химерними сполуками. "Химерні" антисмислові сполуки або "химери" в контексті даного винаходу являють собою антисмислові сполуки, зокрема, олігонуклеотиди, які містять дві або більше хімічно помітні області, кожна з яких зроблена з щонайменше однієї мономерної одиниці, тобто, нуклеотиду у разі олігонуклеотидної сполуки. Ці олігонуклеотиди типово містять щонайменше одну область, де олігонуклеотид модифікований таким чином, щоб додати олігонуклеотиду збільшеної резистентності до нуклеазної деградації, збільшеного клітинного захоплення і/або збільшеної спорідненості зв'язування для цільової нуклеїнової кислоти. Додаткова область олігонуклеотиду може служити як субстрат для ферментів, здатних до розщеплення гібридів РНК:ДНК або РНК:РНК. За допомогою прикладу, РНКазі Н є клітинною ендонуклеазою, яка розщеплює нитку РНК дуплекса РНК:ДНК. Активація РНКазі Н, отже, приводить в результаті до розщеплення РНК-мішені, за допомогою чого значно посилюючи ефективність олігонуклеотидного інгібування гена експресії. Отже, порівнянні результати можуть часто бути отримані з більш короткими олігонуклеотидами, коли застосовують химерні олігонуклеотиди, в порівнянні з фосфотіоатними дезоксиолігонуклеотидами, які гібридизуються з тією ж цільовою областю. Химерні антисмислові сполуки винаходу можуть бути утворені як композитні структури двох або більше олігонуклеотидів, модифікованих олігонуклеотидів, олігонуклеозидів і/або олігонуклеотидних міметиків, як описано вище. Переважні химерні антисмислові олігонуклеотиди включають щонайменше один 2' модифікований цукор (переважно, 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) по 3' кінцю для надання резистентності до нуклеаз, і область з щонайменше 4 суміжними 2'-Н цукрами для надання активності РНКазі Н. Такі сполуки також називають в даній галузі гібридами або гапмерами (химерними олігонуклеотидами). Переважні гапмери мають область 2' модифікованого цукру (переважно, 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) по 3'-кінцю і по 5' кінцю, розділені щонайменше однією областю, що має щонайменше 4 суміжних 2'-Н цукри, і, переважно, включають зв'язки фосфотіоатного скелета. Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання таких гібридних структур, включають, але не обмежені лише ними, патенти США №№ 5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; і 5700922, кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання у всій його повноті.

Антисмислові сполуки, що застосовуються відповідно до даного винаходу, можуть бути зручним чином і традиційно отримані за допомогою добре відомого методу твердофазного синтезу. Обладнання для такого синтезу постачається декількома продавцями, включаючи, наприклад, Applied Biosystems (Foster City, Calif). Можуть додатково або альтернативно використовуватися будь-які інші засоби для такого синтезу, відомі в даній галузі. Добре відомим є застосування схожих методів для отримання олігонуклеотидів, таких як фосфотіоати і

алкіловані похідні. Сполуки винаходу можуть також бути додані до суміші, інкапсульовані, кон'юговані або іншим чином зв'язані з іншими молекулами, структурами молекул або сумішами сполук, як наприклад, ліпосоми, молекули, націленими на рецептор, пероральні, ректальні, місцеві або інші лікарські форми, щоб сприяти захопленню, розподілу і/або всмоктуванню.

5 Патенти Сполучених Штатів, в яких викладене отримання таких лікарських форм, які сприяють захопленню, розподілу і/або всмоктуванню, включають, але не обмежені лише ними, патенти США №№ 5108921; 5354844; 5416016; 5459127; 5521291; 5543158; 5547932; 5583020; 5591721; 4426330; 4534899; 5013556; 5108921; 5213804; 5227170; 5264221; 5356633; 5395619; 5416016; 5417978; 5462854; 5469854; 5512295; 5527528; 5534259; 5543152; 5556948; 5580575; і 5595756,

10 кожний з яких включений в дану заявку за допомогою посилання.

Інші приклади смислових або антисмислових олігонуклеотидів включають такі олігонуклеотиди, які є ковалентно зв'язаними з органічними фрагментами, такими як фрагменти, описані в WO 90/10048, і іншими фрагментами, які збільшують спорідненість олігонуклеотиду до цільової послідовності нуклеїнової кислоти, такими як полі-(L-лізин). Ще

15 додатково, інтеркалюючі агенти, такі як еліптицини, і алкілюючі агенти або комплекси металів можуть бути приєднані до смислових або антисмислових олігонуклеотидів, щоб модифікувати специфічність зв'язування антисмислового або смислового олігонуклеотиду до цільової нуклеотидної послідовності.

Антисмислові або смислові олігонуклеотиди можуть бути введені в клітину, що містить

20 цільову послідовність нуклеїнової кислоти за допомогою будь-якого методу генного перенесення, що включає, наприклад, CaPO_4 -опосередковану трансфекцію ДНК, електропорацію, або за допомогою використання векторів генного перенесення, таких як вірус Епштейн-Барра. У переважній методиці, антисмисловий або смисловий олігонуклеотид вводять у відповідний ретровірусний вектор. Клітина, що містить цільову послідовність нуклеїнової

25 кислоти, контактує з рекомбінантним ретровірусним вектором, або *in vivo* або *ex vivo*. Прийнятні ретровірусні вектори включають, але не обмежені лише ними, вектори, які походять від мишачого ретровірусу M-MuLV, N2 (ретровірусу, який походить від M-MuLV), або векторів подвійного копіювання, позначених DCT5A, DCT5B і DCT5C (див. WO 90/13641).

Смислові або антисмислові олігонуклеотиди також можуть бути впроваджені в клітину, що

30 містить цільову нуклеотидну послідовність за допомогою утворення кон'югата з ліганд-зв'язувальною молекулою, як описано в WO 91/04753. Прийнятні ліганд-зв'язувальні молекули включають, але не обмежені лише ними, рецептори клітинної поверхні, фактори росту, інші цитокіни або інші ліганди, які зв'язуються з рецепторами клітинної поверхні. Переважно, кон'югація ліганд-зв'язувальної молекули не надає істотного впливу на здатність ліганд-

35 зв'язувальної молекули до зв'язування з її відповідними молекулою або рецептором, або блокує вхід смислового або антисмислового олігонуклеотиду або його кон'югованої версії в клітину.

Альтернативно, смисловий або антисмисловий олігонуклеотид може бути впроваджений в клітину, що містить цільову послідовність нуклеїнової кислоти за допомогою утворення комплексу олігонуклеотид-ліпід, як описано в WO 90/10448. Комплекс смисловий або

40 антисмисловий олігонуклеотид-ліпід, переважно, дисоціює всередині клітини під дією ендогенної ліпази.

Антисмислові або смислові молекули РНК або ДНК звичайно містять щонайменше приблизно 5 нуклеотидів по довжині, альтернативно щонайменше приблизно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70,

45 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950,

50 960, 970, 980, 990, або 1000 нуклеотидів по довжині, де в даному контексті термін "приблизно" означає посилальну довжину нуклеотидної послідовності плюс або мінус 10 % від цієї посилальної довжини.

Зонди можуть також використовуватися в методах ПЛР для генерації пулу послідовностей для ідентифікації близькоспоріднених послідовностей, що кодують ТАТ.

55 Нуклеотидні послідовності, що кодують ТАТ, можуть також застосовуватися для конструювання зондів гібридизації для картування гена, який кодує цей ТАТ, і для генетичного аналізу індивідуумів з генетичними порушеннями. Нуклеотидні послідовності, надані в даній заявці, можуть бути картовані в хромосому і конкретні області хромосоми з використанням відомих методів, таких як гібридизація *in situ*, аналіз зв'язування проти відомих хромосомних

60 маркерів і скринінг гібридизації за допомогою бібліотек.

Коли кодуючі послідовності для ТАТ кодують білок, який зв'язується з ще одним іншим білком (приклад, де ТАТ є рецептором), ТАТ може застосовуватися в аналізах для ідентифікації інших білків або молекул, залучених у взаємодію зв'язування. За допомогою таких способів, інгібітори взаємодії зв'язування рецептор/ліганд можуть бути ідентифіковані. Білки, залучені до таких взаємодій зв'язування, можуть також застосовуватися для скринінгу пептиду або низькомолекулярних інгібіторів або агоністів взаємодії зв'язування. Також, рецептор ТАТ може застосовуватися для виділення кореляційного ліганду(лігандів). Скринінгові аналізи можуть бути сконструйовані, щоб знайти ведучі сполуки, які імітують біологічну активність нативного ТАТ або рецептора для ТАТ. Такі скринінгові аналізи будуть включати аналізи, що піддаються скринінгу хімічних бібліотек з високою пропускнуою здатністю, роблячи їх особливо відповідними для ідентифікації низькомолекулярних кандидатів в лікарські засоби. Невеликі молекули, що розглядаються, включають синтетичні органічні або неорганічні сполуки. Аналізи можуть здійснюватися в різноманітних форматах, що включають аналізи білок-білкового зв'язування, біохімічні скринінгові аналізи, імуноаналізи і аналізи на клітинній основі, які добре охарактеризовані в даній галузі.

Нуклеїнові кислоти, які кодують ТАТ або його модифіковані форми можуть також застосовуватися для генерації або трансгенних тварин або тварин з "вимкненим геном" які, в свою чергу, є застосовними при розробці і скринінгу терапевтично застосовних реагентів. Трансгенна тварина (наприклад, миша або щур) являє собою тварину, що має клітини, які містять трансген, причому трансген був введений в тварину або предок тварини на пренатальній, наприклад, ембріональній стадії. Трансген являє собою ДНК, яку інтегрують в геном клітини, з якої трансгенна тварина розвивається. У одному варіанті здійснення, кДНК, що кодує ТАТ, може застосовуватися для клонування геномної ДНК, що кодує ТАТ відповідно до встановлених методів, і геномними послідовностями, що застосовуються для генерації трансгенних тварин, які містять клітини, які експресують ДНК, що кодує ТАТ. Способи генерації трансгенних тварин, особливо, тварин, таких як миші або щури, стали загальноприйнятими в даній галузі і описані, наприклад, в патентах США №№ 4736866 і 4870009. Типово, конкретні клітини будуть намічені для ТАТ трансгенного впровадження за допомогою тканино-специфічних енхансерів. Трансгенні тварини, які включають копію трансгена, що кодує ТАТ, що вводиться в зародкову лінію тварини на ембріональній стадії, можуть застосовуватися для дослідження ефекту збільшеної експресії ДНК, що кодує ТАТ. Такі тварини можуть застосовуватися як тестерні тварини для реагентів, передбачуваних для придання захисту, від, наприклад, патологічних станів, пов'язаних з його надекспресією. Відповідно до даного винаходу, тварину обробляють реагентом, і знижена частота настання патологічного стану, в порівнянні з необробленими тваринами, які несуть трансген, буде вказувати на потенційне терапевтичне втручання для патологічного стану.

Альтернативно, нелюдські гомологи ТАТ можуть застосовуватися для створення тварини "з вимкненим" ТАТ, який має дефектний або змінений ген, що кодує ТАТ в результаті гомологічної рекомбінації між ендogenousним геном, що кодує ТАТ, і зміненої геномної ДНК, що кодує ТАТ, введеної в ембріональний стовбур клітин тварини. Наприклад, кДНК, що кодує ТАТ, може застосовуватися для клонування геномної ДНК, що кодує ТАТ відповідно до встановлених методів. Частина геномної ДНК, що кодує ТАТ, може бути піддана делеції або заміщена ще одним іншим геном, таким як ген, що кодує селектований маркер, який може застосовуватися для реєстрації інтеграції. Звичайно, деякі кілооснови незміненої фланкуючої ДНК (як по 5', так і по 3' кінцях) включають у вектор [див., наприклад, Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987) для опису гомологічних рекомбінаційний векторів]. Вектор впроваджують в ембріональну лінію стовбурових клітин (наприклад, за допомогою електропорації), і клітини, в яких впроваджена ДНК гомологічно рекомбінувала з ендogenousною ДНК, піддають селекції [див. наприклад, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Вибрані клітини потім ін'єктують в бластоцисту тварини (наприклад, миші або щура) для утворення агрегаційних химер [див., наприклад, Bradley, в Teratocarcinomas i Embryonic Stem Cells: Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Химерний ембріон може потім бути імплантований у прийнятну псевдовагітну самицю приймальної тварини, і привнесений ембріон використовують для створення тварини з "вимкненим геном". Потомство, що втримує гомологічно рекомбіновану ДНК в своїх зародкових клітинах, може бути ідентифіковане за допомогою стандартних методів і застосовуватися для виведення тварин, у яких всі клітини тварини містять гомологічно рекомбіновану ДНК. Тварини з вимкненим геном можуть характеризуватися, наприклад, по їх здатності захищатися проти деяких патологічних станів і по розвитку у них патологічних станів внаслідок відсутності поліпептиду ТАТ.

Нуклеїнову кислоту, яка кодує поліпептиди ТАТ, можна також застосовувати в генній терапії. У додатках генної терапії, гени вводять в клітини, щоб досягнути синтезу *in vivo* терапевтично ефективного генетичного продукту, наприклад, для заміни дефектного гена. "Генна терапія" включає як загальноприйнятну генну терапію, де тривалий ефект досягається за допомогою разового лікування, так і введення гена терапевтичних агентів, яке включає однократне або повторне введення терапевтично ефективних ДНК або мРНК. Антисмислові РНК і ДНК можуть застосовуватися як терапевтичні агенти для блокування експресії певних генів *in vivo*. Вже було показано, що короткі антисмислові олігонуклеотиди можуть бути імпортовані в клітини, де вони діють як інгібітори, незважаючи на їх низькі внутрішньоклітинні концентрації, викликані їх обмеженням захопленням клітинною мембраною. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Олігонуклеотиди можуть бути модифіковані для посилення їх захоплення, наприклад, за допомогою заміщення їх негативно заряджених фосфодіефірних груп незарядженими групами.

Існують різноманітні способи, доступні для введення нуклеїнових кислот в життєздатні клітини. Методи розрізняються залежно від того, чи переноситься нуклеїнова кислота в культивовані клітини *in vitro* або *in vivo* в клітини призначеного хазяя. Методи, прийнятні для перенесення нуклеїнової кислоти в клітини ссавців *in vitro*, включають застосування ліпосом, електропорацію, мікроін'єкцію, гібридизацію клітин, DEAE-декстран, метод осадження фосфатом кальцію, і т.д. В цей час переважні методи генного перенесення *in vivo* включають трансфекцію вірусними (типове ретровірусними) векторами і вірусну трансфекцію опосередковану покритими білком ліпосомами (Dzau et al, Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). У деяких ситуаціях є бажаним надати джерело нуклеїнової кислоти разом з агентом, який націлений на цільові клітини, такі як антитіло, специфічні для мембранного білка клітинної поверхні мембран або цільової клітини, ліганд для рецептора на цільовій клітині, і т.д. Там, де використовуються ліпосоми, білки, які зв'язуються з мембранним білком клітинної поверхні, зв'язаним з ендоцитозом, можуть застосовуватися для націлювання і/або для полегшення захоплення, наприклад капсидні білки або їх фрагменти, тропні для конкретного типу клітин, антитіла для білків, які піддаються інтерналізації в фазі клітинного циклу, білки, які націлюють внутрішньоклітинну локалізацію і збільшують внутрішньоклітинний період напівжиття. Метод рецептор-опосередкованого ендоцитозу описаний, наприклад, Wu et al, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); і Wagner et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Для огляду по маркуванню генів і протоколах генної терапії див. Anderson et al, Science 256, 808-813 (1992).

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують поліпептиди ТАТ або їх фрагменти, описані в даній заявці, є застосовними для ідентифікації хромосом. У цьому відношенні, існує постійна потреба ідентифікувати нові хромосомні маркери, оскільки відносно декілька реагентів для маркування хромосом, на основі дійсних даних про послідовність є доступними в цей час. Кожна молекула нуклеїнової кислоти для ТАТ даного винаходу може застосовуватися як маркер хромосом.

Поліпептиди ТАТ і молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть також застосовуватися діагностично для гістотипування, де поліпептиди ТАТ даного винаходу можуть диференційно експресуватися в одній тканині в порівнянні з ще однією іншою, переважно, в хворій тканині в порівнянні з нормальною тканиною такого ж типу тканини. Молекули нуклеїнових кислот для ТАТ зможуть знайти застосування для генерації зондів для ПЛР, Норзерн-аналізу, Саузерн-аналізу і Вестерн-аналізу.

Даний винахід охоплює способи скринінгу сполук для ідентифікації сполук, які імітують дію поліпептиду ТАТ (агоністів) або запобігають ефекту поліпептиду ТАТ (антагоністів). Скринінгові аналізи для кандидатів в лікарські засоби-антагоністи спроектовані для ідентифікації сполук, які зв'язуються або утворюють комплекс або комплекс з поліпептидами ТАТ, що кодуються генами, ідентифікованими в даній заявці, або іншим чином впливають на взаємодію поліпептидів, що кодуються з іншими клітинними білками, включаючи наприклад, інгібування експресії поліпептиду ТАТ з клітин. Такі скринінгові аналізи будуть включати аналізи, що піддаються скринінгу хімічних бібліотек з високою пропускнуою здатністю, роблячи їх особливо прийнятними для ідентифікації низькомолекулярних кандидатів в лікарські засоби.

Аналізи можуть здійснюватися в різноманітних форматах, що включають аналізи білок-білкового зв'язування, біохімічні скринінгові аналізи, імуноаналізи і аналізи на клітинній основі, які добре охарактеризовані в даній галузі.

Всі аналізи для антагоністів мають спільні риси в тому, що вони спричиняють приведення в контакт кандидата в лікарський засіб з поліпептидом ТАТ, що кодується нуклеїновою кислотою, ідентифікованою в даній заявці, при умовах і протягом часу, достатнього для забезпечення взаємодії цих двох компонентів.

У аналізах зв'язування, взаємодією є зв'язування, і утворений комплекс може бути виділений або виявлений в реакційній суміші. У конкретному варіанті здійснення, поліпептид ТАТ, що кодується геном, ідентифікованим в даній заявці, або кандидат в лікарський засіб іммобілізують на твердій фазі, наприклад, на титраційному мікропланшеті, за допомогою ковалентних або нековалентних прикріплень. Неговалентне прикріплення, загалом, здійснюється за допомогою покриття твердої поверхні розчином поліпептиду ТАТ і сушіння. Альтернативно, іммобілізоване антитіло, наприклад, моноклональне антитіло, специфічне для поліпептиду ТАТ, що підлягає іммобілізації, може застосовуватися для закріплення його на твердій поверхні. Аналіз здійснюють за допомогою додавання неіммобілізованого компонента, який може бути помічений міткою, що виявляється, до іммобілізованого компонента, наприклад, покритої поверхні, що містить закріплений компонент. Коли реакція завершується, компоненти, які не прореагували видаляють, наприклад, промиванням, і комплекси, закріплені на твердій поверхні, виявляють. Коли початково неіммобілізований компонент несе мітку, що виявляється, виявлення мітки, іммобілізованої на поверхні, вказує на те, що комплексоутворення сталося. Там, де початково неіммобілізований компонент не несе мітку, комплексоутворення може бути виявлено, наприклад, за допомогою використання міченого антитіла, що специфічно зв'язується з іммобілізованим комплексом.

Якщо сполука-кандидат взаємодіє з, але не зв'язується з конкретним поліпептидом ТАТ, що кодується геном, ідентифікованим в даній заявці, її взаємодія з цим поліпептидом може бути проаналізована методами, добре відомими для виявлення білок-білкових взаємодій. Такі аналізи включають традиційні підходи, такі як, наприклад, зшивання, со-імунопреципітація, і со-очищення через градієнти або хроматографічні колонки. Додатково, білок-білкові взаємодії можуть реєструватися за допомогою використання генетичної системи на основі дріжджів, описаній Fields і сотр. (Fields and Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)), як розкрито Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Багато які транскрипційні активатори, такі як дріжджовий GAL4, складаються з двох фізично дискретних модулярних доменів, один з яких діє як ДНК-зв'язувальний домен, а інший функціонує як транскрипційно-активаційний домен. Дріжджова експресійна система, описана в приведених вище публікаціях (яка звичайно називається "двогібридною системою") має перевагу з цієї властивості, і використовує два гібридні білки, один з яких є цільовим білком, який рекомбінований з ДНК-зв'язувальним доменом GAL4, і інший, в якому кандидатні активуючі білки рекомбіновані з активаційним доменом. Експресія GAL1-lacZ репортерного гена під контролем GAL4-активованого промотору залежить від відновлення активності GAL4 через білок-білову взаємодію. Колонії, що містять взаємодіючі поліпептиди, виявляють з хромогенним субстратом для β -галактозидази. Повний набір (MATCHMAKER™) для ідентифікації білок-білкових взаємодій між двома конкретними білками з використанням двогібридного методу є промислово доступним від Clontech. Ця система також може бути поширена для картування білкових доменів, залучених до конкретних білкових взаємодій, а також для визначення точного положення амінокислотних залишків, які є вирішальними для цих взаємодій.

Сполуки, надають вплив на взаємодію гена, що кодує поліпептид ТАТ, ідентифікованого в даній заявці, і іншого внутрішньо- або позаклітинних компонентів можуть бути тестовані таким чином: звичайно отримують реакційну суміш, що містить продукт гена і внутрішньо- або позаклітинний компонент при умовах і протягом часу, що забезпечують взаємодію і зв'язування двох продуктів. Для тестування здатності кандидатної сполуки інгібувати зв'язування, реакцію проводять за відсутності і в присутності тестованої сполуки. Додатково, може бути додане плацебо до третьої реакційної суміші, щоб служити як позитивний контроль. Зв'язування (утворення комплексу) між тестованою сполукою і внутрішньо- або позаклітинним компонентом, присутнім в суміші реєструють, як описано в даній заявці вище. Утворення комплексу в контрольній реакції(реакціях), але не в реакційній суміші, що містить тестовану сполуку, вказує на те, що тестована сполука надає вплив на взаємодії тестованої сполуки і її партнера реакції.

Для аналізу на антагоністи, поліпептид ТАТ може бути доданий до клітини, нарівні зі сполукою, що піддається скринінгу на предмет специфічної активності і здатності сполуки інгібувати активність, що представляє інтерес, в присутності поліпептиду ТАТ, вказує на те, що сполука є антагоністом по відношенню до поліпептиду ТАТ. Альтернативно, антагоністи можуть бути виявлені за допомогою об'єднання поліпептиду ТАТ і потенційного антагоніста з мембрано-зв'язаними рецепторами поліпептиду ТАТ або рекомбінантними рецепторами при відповідних умовах для аналізу конкурентного інгібування. Поліпептид ТАТ може бути помічений, оскільки, наприклад, радіоактивністю, таким чином, що число молекул поліпептиду ТАТ, зв'язаних з рецептором, може застосовуватися, щоб визначити ефективність потенційного антагоніста. Ген,

що кодує рецептор, може бути ідентифікований численними методами, відомими фахівцям в даній галузі, наприклад, ліганд-пенінгом і FACS-сортином. Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Переважно, експресійне клонування використовують там, де поліаденіловану РНК отримують з клітини, сприйнятливої до поліпептиду ТАТ і бібліотеку кДНК, створену з цієї РНК ділять на пули і використовують для трансфекції COS клітин або інших клітин, які не є сприйнятливими до поліпептиду ТАТ. Трансфіковані клітини, які вирощують на скляних слайдах, піддають впливу міченого поліпептиду ТАТ. Поліпептид ТАТ може бути помічений різноманітними засобами, включаючи йодування або включення сайту розпізнавання для сайт-специфічних протеїназ. Після фіксації і інкубації, слайди піддають авторадіографічному аналізу. Позитивні пули ідентифікують і суб-пули отримують і ре-трансфікують з використанням процесу інтерактивного суб-пулінгу і ре-скринінгу, зрештою, отримуючи одиничний клон, який кодує передбачуваний рецептор.

Як альтернативний підхід для ідентифікації рецептора, мічений поліпептид ТАТ може бути фотоафінно-зв'язаний з клітинною мембраною або препаратами екстракту, які експресують молекулу рецептора. Зшитий матеріал розділяють за допомогою PAGE і експонують на рентгеновську плівку. Мічений комплекс, що містить рецептор, може бути вирізаний, розділений на пептидні фрагменти, і підданий мікро-секвенуванню білка. Амінокислотна послідовність, отримана в результаті мікро-секвенування, може використовуватися для конструювання набору вироджених олігонуклеотидних зондів для скринінгу бібліотеки кДНК, щоб ідентифікувати ген, що кодує передбачуваний рецептор.

У ще одному іншому аналізі на антагоністи, клітини ссавців або мембранний препарат, експресуючі рецептор, будуть інкубуватися з міченим поліпептидом ТАТ в присутності кандидатної сполуки. Здатність сполуки посилювати або блокувати цю взаємодію, потім може бути виміряна.

Більш конкретні приклади потенційних антагоністів включають олігонуклеотид, який зв'язується з гібридами імуноглобуліну з поліпептидом ТАТ, і, зокрема, антитілами, включаючи, без обмеження, полі- і моноклональні антитіла і фрагменти антитіл, одинично-ланцюжкові антитіла, антиідіотипічні антитіла і химерні або гуманізовані версії таких антитіл або фрагментів, а також антитіла людини і фрагменти антитіл. Альтернативно, потенційний антагоніст може бути близькоспорідненим білком, наприклад, формою, яка мутувала, поліпептиду ТАТ, який розпізнає рецептор, але не надає ніякого ефекту, за допомогою чого конкурентно інгібуючи дію поліпептиду ТАТ.

Ще одним іншим потенційним антагоністом поліпептиду ТАТ є конструкція антисмислової РНК або ДНК, отримана з використанням антисмислової технології, де, наприклад, антисмислова молекула РНК або ДНК діє, щоб блокувати безпосередньо трансляцію мРНК за допомогою гібридизації з цільовою мРНК і запобігаючи трансляції білка. Антисмислова технологія може застосовуватися для контролю генної експресії через утворення потрійної спіралі або антисмислових ДНК або РНК, причому обидва методи основані на зв'язуванні поліпептиду з ДНК або РНК. Наприклад, 5' кодуєча частина поліпептидної послідовності, яка кодує зрілі поліпептиди ТАТ, в даній заявці, застосовують для конструювання антисмислового РНК-олігонуклеотиду з приблизно від 10 до 40 пар основ по довжині. ДНК-олігонуклеотид конструюють, щоб він був комплементарним області гена, залученій до транскрипції (потрійна спіраль - див. Lee et al, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al, Science, 241: 456 (1988); Dervan et al, Science, 251: 1360 (1991)), за допомогою цього запобігаючи транскрипції і виробленню поліпептиду ТАТ. Антисмисловий РНК-олігонуклеотид гібридується з мРНК in vivo і блокує трансляцію молекули мРНК в поліпептиді ТАТ (антисмислові - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Олігонуклеотиди, описані вище, можуть також бути доставлені в клітини таким чином, що антисмислова РНК або ДНК може експресуватися in vivo для інгібування вироблення поліпептиду ТАТ. Коли застосовують антисмислову ДНК, олігодезоксирибонуклеотиди, які походять від сайту трансляції-ініціації, наприклад, між приблизно -10 і +10 положеннями цільової нуклеотидної послідовності гена, є переважними.

Потенційні антагоністи включають малі молекули, які зв'язуються з активним сайтом, ділянкою зв'язування рецептора або фактором росту або іншою відповідною ділянкою зв'язування поліпептиду ТАТ, за допомогою цього блокуючи нормальну біологічну активність поліпептиду ТАТ. Приклади малих молекул включають, але не обмежені лише ними, невеликі пептиди або пептидоподібні молекули, переважно, розчинні пептиди, і синтетичні непептидильні органічні або неорганічні сполуки.

Рибозими являють собою ферментативні молекули РНК, здатні каталізувати специфічне розщеплення РНК. Рибозими діють за допомогою послідовність-специфічної гібридизації з комплементарною цільовою РНК, з подальшим ендонуклеолітичним розщепленням. Специфічні ділянки розщеплення рибозимів в потенційній цільовій РНК можуть бути ідентифіковані відомими методами. Додаткові подробиці див., наприклад, у Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), і публікація заявки РСТ № WO 97/33551 (опублікована 18 вересня 1997 року).

Молекули нуклеїнової кислоти при утворенні потрібної спіралі, що використовуються для інгібування транскрипції, повинні бути одонитковими і складеними з дезоксинуклеотидів. Композицію основ цих олігонуклеотидів конструюють таким чином, що вона сприяє утворенню потрібної спіралі через правила спарювання основ Хугстіна, які, як правило, вимагають ділянок значного розміру з пуринів або піримідинів на одній нитці дуплекса. Додаткові подробиці див., наприклад, в публікації патентної заявки РСТ № WO 97/33551, вище.

Ці малі молекули можуть бути ідентифіковані за допомогою будь-якого одного або більше зі скринінгових аналізів, що обговорюються в даній заявці вище, і/або за допомогою будь-яких інших скринінгових методів, добре відомих кваліфікованим фахівцям в даній галузі.

Виділена поліпептид ТАТ-кодуюча нуклеїнова кислота може застосовуватися в даній заявці для рекомбінантного вироблення поліпептиду ТАТ з використанням методів, добре відомих в даній галузі, і, як описано в даній заявці. У свою чергу, продуковані поліпептиди ТАТ можуть використовуватися для генерації антитіл проти ТАТ з використанням методів, добре відомих в даній галузі, і, як описано в даній заявці.

Антитіла, що специфічно зв'язуються з поліпептидом ТАТ, ідентифіковані в даній заявці, а також інші молекули, ідентифіковані за допомогою скринінгових аналізів, розкритих в даній заявці раніше, можуть вводитися для лікування різноманітних порушень, що включають рак, у вигляді фармацевтичних композицій.

Якщо поліпептид ТАТ є внутрішньоклітинним і цільні антитіла використовуються як інгібітори, антитіла, які інтерналізуються, є переважними. Однак, ліпофекції або ліпосоми також можуть застосовуватися для доставки антитіла або фрагмента антитіла в клітини. Там, де застосовують фрагменти антитіл, найменший інгібуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з доменом зв'язування цільового білка, є переважним. Наприклад, на основі послідовностей варіабельних областей антитіла, може бути сконструйована пептидна молекула, яка зберігає здатність до зв'язування цільової послідовності білка. Такі пептиди можуть бути синтезовані хімічно і/або отримані за допомогою технології рекомбінантної ДНК. Див., наприклад, Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

Лікарська форма в даній заявці може також містити більше однієї активної сполуки, як необхідно для конкретного показання для лікування, переважно, такі сполуки з комплементарними активностями, яка не надає несприятливого впливу одна на одну. Альтернативно, або додатково, композиція може містити агент, який посилює її функцію, такий як, наприклад, цитотоксичний агент, цитокін, хіміотерапевтичний агент або агент, який інгібує ріст. Такі молекули відповідним чином присутні в комбінації в кількостях, які є ефективними для призначеної мети.

Наступні приклади пропонуються тільки в ілюстративних цілях, і не призначені для обмежень об'єму домагань даного винаходу будь-яким чином.

Всі патентні і літературні посилання, що цитуються в даному описі, включені в даний документ за допомогою посилання у всій повноті.

ПРИКЛАДИ

Промислово доступні реагенти, на які посилаються в прикладах, застосовували відповідно до інструкцій виготовлювача, якщо не указано інакше. Джерело цих клітин, ідентифікованих в наступних прикладах, і по всьому опису, за допомогою номерів доступу ATCC являє собою Американську колекцію типових культур, Manassas, VA.

ПРИКЛАД 1: Профілювання тканинної експресії з використанням GeneExpress®

Фірмова база даних, що містить інформацію про генної експресію (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD), була проаналізована в спробі ідентифікувати поліпептиди (і кодуючі їх нуклеїнові кислоти), чия експресія значно і виявляється регулюється по висхідній в конкретних пухлинних тканині(ах) людини, що представляють інтерес в порівнянні з іншими пухлиною(ами) людини і/або нормальною тканиною людини. Конкретно, аналіз бази даних GeneExpress® проводили з використанням або програмного забезпечення, доступного через Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, для застосування з базою даних GeneExpress® або з фірмовим програмним забезпеченням, написаним і розробленим Genentech, Inc. для застосування з базою даних GeneExpress®. Рейтинг позитивних хітів в аналізі оснований на декількох критеріях, що включають, наприклад, тканинну специфічність, пухлинну специфічність

і рівень експресії в нормальній по суті і/або нормальній проліферуючій тканинах. З використанням цього аналізу експресії мРНК, визначали, що мРНК, що кодує поліпептид TAT211, істотним чином, відтворюється і виявлювано надекспресується в пухлинах легені, яєчника і щитовидної залози людини в порівнянні з відповідними нормальними тканинами

5 легені, яєчника і щитовидної залози людини, відповідно.

ПРИКЛАД 2: Гібридизація *in situ*

Гібридизація *in situ* являє собою потужний і різносторонній метод для виявлення і локалізації послідовностей нуклеїнових кислот в препаратах клітин або тканин. Вона може бути застосовна, наприклад, для ідентифікації ділянок генної експресії, аналізу тканинного розподілу

10 транскрипції, ідентифікації і локалізації вірусної інфекції, витікаючих змін в конкретному синтезі мРНК і допомоги в картуванні хромосом.

Гібридизацію *in situ* здійснюють, слідуючи оптимізованій версії протоколу Lu and Gillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994), з використанням ПЛР-генерованих ^{32}P -мічених рибозондів. Коротко, фіксовані в формаліні, занурені в парафін тканини людини нарізують, депарафінізують, депротейнізують в протеїназі К (20 г/мл) протягом 15 хвилин при 37 °С, і додатково обробляють для гібридизації *in situ*, як описано Lu and Gillett, вище. ^{32}P -UTP-мічений антисмисловий рибозонд генерували з продукту ПЛР і гібридували при 55 °С протягом ночі. Слайди занурювали в емульсію для ядерних треків Kodak NTB2 і витримували протягом 4 тижнів.

Синтез ^{32}P -Рибозонда

20 6,0 мкл (125 мКи) ^{32}P -UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ки/ммоль) сушили за допомогою швидкого вакуумування. До кожної пробірки, що містить висушений ^{32}P -UTP, додавали наступні інгредієнти: 2,0 мкл 5× транскрипційного буфера, 1,0 мкл DTT (100 мМ), 2,0 мкл суміші NTP (2,5 мМ:10 мМ; кожний 10 мМ GTP, CTP & ATP+10 мкл H₂O), 1,0 мкл UTP (50 мМ), 1,0 мкл Rnasin, 1,0 мкл ДНК матриці (1 мкг), 1,0 мкл H₂O, 1,0 мкл РНК полімерази (для продуктів ПЛР T3=AS, T7=S, звичайно).

25 Пробірки інкубували при 37 °С протягом однієї години. Додавали 1,0 мкл RQ1 ДНКазу, з подальшою інкубацією при 37 °С протягом 15 хвилин. Додавали 90 мкл TE (10 мМ Tris рН 7,6/1 мМ ЕДТА рН 8,0), і суміш наносили піпеткою на папір DE81. Розчин, що залишився, завантажували в ультрафільтраційний блок Microcon-50, і обертали з використанням програми 10 (6 хвилин). Фільтраційний блок інвертували над другою пробіркою і обертали з використанням програми 2 (3 хвилини). Після остаточного виділення обертанням, додавали 100 мкл TE. 1 мкл кінцевого продукту наносили піпеткою на папір DE81 і підраховували в 6 мл Biofluor II.

35 Зонд запускали в гелі TBE/сечовина. 1-3 мкл зонда або 5 мкл РНК Mrk III додавали до 3 мкл завантажувального буфера. Після нагрівання на блоці нагрівання з 95 °С протягом трьох хвилин, зонд негайно вміщували на лід. Ямки гелю була розкриті, зразок завантажували, і запускали при 180-250 Вольт протягом 45 хвилин. Гель обгортали сарановою обгорткою і експонували на плівку XAR з інтенсифікуючим екраном в морозильній камері з -70 °С від однієї години до протягом ночі.

40 ^{32}P -Гібридизація

А. Попередня обробка заморожених зрізів

45 Слайди видаляли з морозильної камери, вміщували на алюмінієві піддони і відморожували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Піддони вміщували в інкубатор при 55 °С протягом п'яти хвилин, для зниження конденсації. Слайди фіксували протягом 10 хвилин в 4 % параформальдегіді на льоду у витяжній шафі, і промивали в 0,5× SSC протягом 5 хвилин, при кімнатній температурі (25 мл 20 × SSC+975 мл SQ H₂O). Після депротейнізації в 0,5 мкг/мл протеїназі К протягом 10 хвилин при 37 °С (120,5 мкл 10 мг/мл вихідного розчину в 250 мл попередньо нагрітому буфері, який не містить РНКазу, для РНКазу), зрізи промивали в 0,5 × SSC протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Зрізи дегідратували в 70 %, 95 %, 100 % етанолі, по 2 хвилини кожний.

В. Попередня обробка занурених в парафін зрізів

55 Слайди депарафінізували, вміщували в SQ H₂O, і споліскували двічі в 2 × SSC при кімнатній температурі, протягом 5 хвилин кожний раз. Зрізи депротейнізували в 20 мкг/мл протеїнази К (500 мкл 10 мг/мл в 250 мл буфера, яка не містить РНКазу, для РНКазу; 37 °С, 15 хвилин) - ембріон людини, або 8 × протеїнази К (100 мкл в 250 мл буфера для РНКазу, 37 °С, 30 хвилин) - формалінові тканини. Подальше споліскування в 0,5 × SSC і дегідратацію здійснювали, як описано вище.

С. Прегібридизація

60 Слайди були укладені в пластикову коробку, змочену буфером Vox (4 × SSC, 50 % формамід) - насичений фільтрувальний папір.

D. Гібридизація

Зонд з $1,0 \times 10^6$ рахунків в хвилину і 1,0 мкл тРНК (50 мг/мл вихідний розчин) на слайд нагрівали при 95 °C протягом 3 хвилин. Слайди охолоджували на льоду, і 48 мкл гібридизаційного буфера додавали на слайд. Після інтенсивного струшування, 50 мкл ^{32}P суміші додавали до 50 мкл прегібридизації на слайді. Слайди інкубували протягом ночі при 55 °C.

E. Промивання

Промивання проводили 2 × 10 хвилин за допомогою 2 × SSC, EDTA при кімнатній температурі (400 мл 20 × SSC+16 мл 0,25М EDTA, Vf=4L), з подальшою обробкою РНКазою при 37 °C протягом 30 хвилин (500 мкл 10 мг/мл в 250 мл буфера для РНКазі = 20 мкг/мл). Слайди промивали 2 × 10 хвилин 2 × SSC, EDTA при кімнатній температурі. Суворість умов промивання була наступною: 2 години при 55 °C, 0,1 × SSC, EDTA (20 мл 20 × SSC+16 мл EDTA, Vf=4L).

F. Олігонуклеотиди

Аналіз *in situ* аналіз здійснювали на різноманітних послідовностях ДНК, розкритих в даній заявці. Олігонуклеотиди, що використовуються для цих аналізів, отримували таким чином, щоб вони були комплементарними нуклеїновим кислотам (або їх комплементом), як показано на супровідних Фігурах.

G. Результати

По відношенню до експресії TAT211 в нормальних тканинах людини, від слабкої до помірної експресії спостерігали в підгрупі тестованих зразків епітелію ссавців, слизовій сечового міхура, легені, і ниркових каналців. Всі інші тестовані нормальні тканини людини, включаючи як нормальну строму яєчника людини, так і міометрія матки, були негативними по експресії TAT211. Навпаки, сильну експресію TAT211 спостерігали у 16 з 27 (59 %) тестованих великоклітинних карцином людини. Додатково, сильну експресію TAT211 також спостерігали у 8 з 9 (89 %) тестованих карцином ендометрія людини. Остаточо, сильну експресію TAT211 спостерігали у 12 з 14 тестованих карцином яєчника.

ПРИКЛАД 3: Отримання антитіл, які зв'язуються з поліпептидами TAT211

Даний приклад ілюструє отримання моноклональних антитіл, які можуть специфічно зв'язуватися з TAT211.

Методи отримання моноклональних антитіл відомі в даній галузі і описані, наприклад, у Goding, вище. Імуногени, які можуть використовуватися, включають очищений TAT, рекомбінантні білки, що містять TAT, і клітини, експресуючі рекомбінантний TAT на клітинній поверхні. Вибір імуногена може бути проведений кваліфікованим фахівцем в даній галузі без зайвого експериментування.

Мишей, таких як Balb/c, імунізують імуногеном TAT, емульгованим в повному ад'юванті Фрейнда, і ін'єктують підшкірно або внутрішньочеревинно в кількості 1-100 мікрограмів. Альтернативно, імуноген емульгують в ад'юванті MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) і ін'єктують в задню подушечку стопи тварини. Імунізованих мишей потім повторно імунізують через 10-12 днів додатковим імуногеном, емульгованим у вибраному ад'юванті. Потім, протягом декількох тижнів, миші також можуть бути імунізовані додатковими імунізаційними ін'єкціями. Зразки сироватки можуть бути періодично отримані від мишей за допомогою ретро-орбітального забору крові для тестування в аналізах ELISA для виявлення антитіл проти-TAT.

Після виявлення прийнятного титру антитіл, тварини "позитивні" на антитіла, можуть бути ін'єктовані остаточною внутрішньовенною ін'єкцією TAT. Три-чотири дні після, мишей умертвляють і збирають клітини селезінки. Клітини селезінки потім гібридизують (з використанням 35 % поліетиленгліколю) з клітинами вибраної лінії мишачої мієломи, такої як P3 × 63 AgU.1, доступної з ATCC, No. CRL 1597. Гібриди генерують гібридомні клітини, які потім можуть вміщуватися в 96-ямкові планшети для тканинних культур, які містять НАТ (гіпоксантин, аміноптерин і тимідин) середовище для інгібування проліферації негібридних клітин, мієломних гібридів, і гібридів клітин селезінки.

Гібридомні клітини будуть скриновані в ELISA на реактивність проти TAT. Визначення "позитивних" гібридомних клітин, які секретують бажані моноклональні антитіла проти TAT, знаходиться в межах кваліфікації в даній галузі.

Позитивні гібридомні клітини можуть бути ін'єктовані внутрішньочеревинно сингенним мишам Balb/c для отримання асцитів, що містять моноклональні антитіла проти TAT. Альтернативно, гібридомні клітини можуть бути вирощені в колбах для тканинних культур або ролерних бутлях. Очищення моноклональних антитіл, продукованих в асцитах, може здійснюватися з використанням осадження сульфатом амонію, з подальшою гель-ексклюзійною хроматографією. Альтернативно, може використовуватися афінна хроматографія, основана на зв'язуванні антитіла з білком А або білком G.

З використанням вищеописаного методу, були генеровані різноманітні окремі і чітко помітні клітинні лінії гібридом, кожна з яких продукує моноклональні антитіла, які зв'язуються з нативним поліпептидом TAT211. Моноклональні антитіла, продуковані цими гібридомними лініями, продемонстрували зв'язування з поліпептидом TAT211 з використанням добре відомих і рутинно застосовуваних методів, таких як Вестерн-блотинг, аналіз ELISA, аналіз сортування FACS, клітин, які експресують поліпептид TAT211, і/або імуногістохімічний аналіз. Одна конкретна лінія мишачої гібридоми (яка експресує мишаче моноклональне антитіло, позначене в даній заявці як 10H1, також що називається mu10H1) була вибрана для додаткових досліджень. Амінокислотні послідовності, зв'язані з моноклональним антитілом 10H1, і різноманітні інші його версії, що включають домени VL, VH і/або CDR, показані на Фігурах 3-12.

ПРИКЛАД 4: Аналізи конкурентного зв'язування і картування епітопів

TAT211 епітопи, зв'язані описаними моноклональними антитілами, можуть бути визначені за допомогою стандартного аналізу конкурентного зв'язування (Fendly et al, Cancer Research 50: 1550-1558 (1990)). Дослідження перехресного блокування можуть бути проведені на антитілах за допомогою зняття прямої флуоресценції на інтактних клітинах PC3, сконструйованих для експресії TAT211 з використанням машини для скринінгу PANDEX™ для кількісної оцінки флуоресценції. Кожне моноклональне антитіло кон'югують з ізотіоціанатом флуоресцеїну (FITC), з використанням встановлених методик (Wofsy et al, Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel і Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Конфлюентні моношари TAT211-експресуючих клітин PC3 трипсинізують, промивають однократно, і ресуспендують при $1,75 \times 10^6$ клітин/мл в холодному PBS, що містить 0,5 % альбумін бичачої сироватки (BSA) і 0,1 % NaN_3 . Кінцеву концентрацію 1 % латексних частинок (IDC, Portland, OR) додають для зниження закупорювання мембран планшетів PANDEX™. Клітини в суспензії, 20 мкл, і 20 мкл очищених моноклональних антитіл (від 100 мкг/мл до 0,1 мкг/мл) додають в ямки планшетів PANDEX™ і інкубують на льоду протягом 30 хвилин. Попередньо визначене розбавлення FITC-мічених моноклональних антитіл в 20 мкл додають до кожної ямки, інкубують протягом 30 хвилин, промивають, і флуоресценцію кількісно оцінюють на машині для скринінгу PANDEX™. Моноклональні антитіла розглядають, як розділяючі епітоп, якщо кожне блокувало зв'язування іншого на 40 % або більше в порівнянні з контрольними нерелевантними моноклональними антитілами і при такій же концентрації антитіла. З використанням цього аналізу, рядовий фахівець в даній галузі може ідентифікувати інші моноклональні антитіла, які зв'язуються з тим же самим епітопом, як антитіла, описані вище.

Аналіз делеції може бути проведений для ідентифікації приблизного розташування в поліпептидній послідовності, показаній як SEQ ID NO:2 антигенних епітопів. У одному експерименті, було продемонстровано, що моноклональні антитіла проти TAT211 зв'язуються з антигенним епітопом, розташованим між амінокислотами 320-361 послідовності поліпептиду TAT211, показаної на Фігурі 2. Поліпептиди, що містять будь-яку з цих конкретно ідентифікованих ділянок антигенного епітопа, молекули нуклеїнових кислот, які кодують цих поліпептиди, і антитіла, що зв'язуються з цими поліпептидами, всі охоплені об'ємом даного винаходу.

ПРИКЛАД 5: Імуногістохімічний аналіз

Антитіла проти TAT211 були отримані, як описано вище, і імуногістохімічний аналіз здійснювали з використанням функціонального моноклонального антитіла проти TAT211 таким чином. Тканинні зрізи спочатку фіксували протягом 5 хвилин в суміші ацетон/етанол (заморожені або занурені в парафін). Зрізи потім промивали в PBS, і потім блокували авідинном і біотином (Векторний набір) протягом 10 хвилин кожний з подальшим промиванням в PBS. Зрізи потім блокували 10 % сироваткою протягом 20 хвилин і потім блотували для видалення надлишку. Первинне антитіло потім додавали до зрізів при концентрації, яка дорівнює 10 мкг/мл протягом 1 години, і потім зрізи промивали в PBS. Біотинільоване вторинне антитіло (проти-первинного антитіла) потім додавали до зрізів протягом 30 хвилин, і потім зрізи промивали в PBS. Зрізи потім піддавали впливу реагентів набору Вектор ABC протягом 30 хвилин, і потім зрізи промивали в PBS. Зрізи потім піддавали впливу Діамінобензидину (Pierce) протягом 5 хвилин і потім промивали в PBS. Зрізи потім контрастно забарвлювали з допомогою гематоксиліну Майєрса, покривали покривним склом і візуалізували. Імуногістохімічний аналіз також може здійснюватися, як описаний у Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 і Ausubel et al, Current Protocols Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley і Sons (1997).

Результати цих аналізів демонструють, що моноклональне антитіло, яке використовується проти TAT211 не зв'язується виявлювано з будь-якою з наступних нормальних тканин людини: мозок, серце, печінка, простата, шкіра, селезінка, аорта, яєчко, щитовидна залоза, тонкий і

товстий кишечник, шлунок і строма яєчника, і спостерігали тільки слабке зв'язування в нормальних альвеолярних клітинах легені, епітелії молочної залози, субпопуляції ниркових каналців і мигдалинах.

Навпаки, від помірної до сильної експресії TAT211 спостерігали в 9 з 11 незалежних зразках клітин прозорої аденокарциноми яєчника, 19 з 20 незалежних зразках ендометриїдної аденокарциноми яєчника, 4 з 10 незалежних зразках слизеутворювальної аденокарциноми яєчника і 23 з 25 незалежних зразках серозної аденокарциноми яєчника. Загалом, експресію TAT211, що виявляється, спостерігали загалом в 58 з 66 (88 %) всіх тестованих незалежних зразків аденокарциноми яєчника.

Крім того, від помірної до сильної експресії TAT211 спостерігали в 24 з 31 незалежних зразках аденокарциноми легені. Загалом, експресію TAT211, що виявляється, спостерігали загалом в 27 з 31 (87 %) всіх тестованих незалежних зразків аденокарциноми легені.

Від помірної до сильної експресії TAT211 також спостерігали в 19 з 23 незалежних зразках папілярної карциноми щитовидної залози. Загалом, експресію TAT211, що виявляється, спостерігали загалом в 21 з 23 (91 %) всіх тестованих незалежних зразків папілярної карциноми щитовидної залози.

З використанням моноклонального антитіла 10H1 проти TAT211 (зв'язані амінокислотні послідовності, показані на Фігурах 3-12), імуногістохімічний аналіз використовували на різноманітних зразках тканини первинної і зв'язаної місцевої метастатичної карциноми, щоб визначити, чи підтримується експресія TAT211 в метастатичному (в порівнянні з первинним) стані. Результати цих аналізів демонстрували, що існує високий ступінь відповідності в експресії TAT211 в первинних і зв'язаних місцевих метастатичних зразках. Конкретно, із 10 тестованих зразків аденокарциноми яєчника, 9 показали один і той же від помірного до високого рівня експресії TAT211 як в первинній пухлині, так і зв'язаних місцевих метастазах. З тестованих 14 зразків аденокарциноми легені, 12 показали один і той же від помірного до високого рівня експресії TAT211 як в первинній пухлині, так і зв'язаних місцевих метастазах. Остаточо, із 3 тестованих зразків сквамозних клітин карциноми легені, 2 показали один і той же від помірного до високого рівня експресії TAT211 як в первинній пухлині, так і зв'язаних місцевих метастазах.

ПРИКЛАД 6: Гуманізація мишачих моноклональних антитіл

Даний приклад демонструє застосовність способів гуманізації мишачого антитіла 10H1, направлено проти TAT211.

Позаклітинний домен TAT211 експресували в *E. coli* (неглікозилований) і як імуноадгезин (Fc гібрид) в клітинах CHO (глікозилований) і очищали загальноприйнятими засобами. Мишачу гібридому, яка експресує антитіло 10H1, отримували за допомогою імунізації мишей рекомбінантним позаклітинним доменом TAT211, отриманим з *E. coli*, і ідентифікували по її здатності до зв'язування з планшетами, покритими TAT211 за допомогою ELISA.

Клонування мишачих варіабельних доменів 10H1

Загальну РНК екстрагували з гібридомних клітин, які продукують 10H1 з використанням стандартних способів. Варіабельні легкі (VL) і варіабельні важкі (VH) домени ампліфікували з використанням РВ-ПЛР з виродженими праймерами до важкого і легкого ланцюгів. Прямі праймери були специфічними для N-кінцевої амінокислотної послідовності VL і VH областей. Відповідно, LC і HC зворотні праймери були сконструйовані для ренатурації з областю в константному легкому (CL) і константному важкому домені 1 (CH1), які є високо консервативними для всіх видів. Полінуклеотидну послідовність вставок визначали з використанням рутинних способів секвенування. Амінокислотні послідовності mu10H1 VL (SEQ ID NO:4) і VH (SEQ ID NO:13) показані на Фігурах 3 і 4, відповідно.

Прямі графти гіперваріабельної області на акцепторний консенсусний каркас людини

Фагмід, що застосовується для цієї роботи, являє собою моновалентний вектор відображення Fab-g3, і складається з 2 відкритих рамок зчитування під контролем одиничного промотору rhoA. Перша відкрита рамка зчитування складається з сигнальної послідовності stII, рекомбінованої з VL і CH1 доменами акцепторного легкого ланцюга, а друга складається з сигнальної послідовності stII, рекомбінованої з VH і CH1 доменами акцепторного важкого ланцюга, з подальшим мінорним фаговим покриваючим білком P3.

VL і VH домени з мишачого 10H1 (mu10H1) були вирівняні з консенсусними послідовностями VL каппа I (huKI) і VH підгрупи III (huIII) людини. Для створення графта CDR, гіперваріабельні області з mu10H1 трансплантували в консенсусні акцепторні каркаси huKI і huIII для генерації "10H1-графта", прямого CDR-графта (Фігури 3 і 4). У VL домені наступні області були трансплантовані в консенсусний акцептор людини: положення 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3). У VH домені, були трансплантовані положення 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 93-102 (H3). MacCallum et al. (J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) проаналізували кристалічні структури комплексу антитіла і

антигена і виявили, що положення 49 і 93 важкого ланцюга є частиною контактної області, таким чином, здається доцільним включати ці положення у визначення CDR-H2 і CDR-H3, при гуманізації антитіл.

"10H1-графт" генерували як IgG за допомогою мутагенезу Кункеля LC і HC експресійних векторів з використанням окремих олігонуклеотидів для кожної гіперваріабельної області. Амінокислотні зміни для збільшення спорідненості або стійкості були також проведені з використанням мутагенезу Кункеля. Коректні клони ідентифікували за допомогою секвенування ДНК.

Рандомізація гіперваріабельних областей

Різноманітність послідовностей вводили окремо в кожну гіперваріабельну область 10H1-графт з використанням м'якої стратегії рандомізації, яка підтримує схил у бік послідовності мишачої гіперваріабельної області. Це здійснювали з використанням стратегії синтезу отруєних олігонуклеотидів, уперше описаної Gallop et al, J. Med. Chem. 37: 1233-1251 (1994). Для даного положення всередині гіперваріабельної області, що підлягає мутації, кодон, що кодує амінокислоту дикого типу, трують 70-10-10-10 сумішшю нуклеотидів, що приводить в результаті до 50 процентного ступеня мутації по кожному положенню.

М'яким способом рандомізовані олігонуклеотиди були розташовані після послідовностей мишачих гіперваріабельних областей і охоплювали такі ж області, що визначаються прямими графтами гіперваріабельної області. Амінокислотне положення на початку H2 (положення 49) в VH домені, було обмежено по різноманітності послідовності до A, G, S або T за допомогою використання кодона RGC.

Щоб уникнути повторного вибору CDR-прищепленої послідовності дикого типу, стоп-кодон (TAA) вводили в середину кожної CDR 10H1-графта за допомогою мутагенезу Кункеля, що приводить до 6 різних матриць, кожна зі стоп-кодоном, введеним в різну CDR. Рандомізовані олігонуклеотиди застосовували для введення різноманітності, а також для відновлення стоп-кодона у відповідній матриці.

Генерація фагових бібліотек

Пули рандомізованих олігонуклеотидів, сконструйованих для введення різноманітності в кожну гіперваріабельну область, як викладено вище, фосфорилювали окремо в 20 мкл реакційних сумішах, що містять 660 нг олігонуклеотиду, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM АТФ, 20 mM DTT, і 5 Од полінуклеотидкінази протягом 1 год. при 37 °C. Кожний фосфорилований пул олігонуклеотидів, направлений для введення різноманітності в одиничну CDR, об'єднували з 20 мкг матриці Кункеля, що містить відповідний стоп-кодон. Реакцію здійснювали в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ в кінцевому об'ємі, який дорівнює 500 мкл, що приводило до співвідношення олігонуклеотиду до матриці, яке дорівнює 3. Суміш ренатурували при 90 °C протягом 4 хв., 50 °C протягом 5 хв. і потім охолоджували на льоду. Ренатовану матрицю (250 мкл) потім заповнювали за допомогою додавання 1 мкл 100 mM АТФ, 10 мкл 25 mM dNTPs (25 mM кожні з dATP, dCTP, dGTP і dTTP), 15 мкл 100 mM DTT, 25 мкл 10X ТМ буфера (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 2400 Од Т4 лігази, і 30 Од Т7 полімерази протягом 3 годин при кімнатній температурі. Продукт-наповнювач потім витягували і електропорували в клітини SS320 і розмножати в присутності хелперного фагу M13/KO7, як описано Sidhu et al, Methods in Enzymology 328:333-363 (2000). Розміри бібліотек знаходилися в інтервалі від 1-2 × 10⁹ незалежних клонів. Випадкові клони з первинних бібліотек секвенували для оцінки якості бібліотеки.

Селекція фагу

Для селекцій фагів, отриманий з CHO позаклітинний домен TAT211 (2 мкг/мл) іммобілізували в PBS на титраційних мікропланшетах MaxiSorp (Nunc) протягом ночі при 4 °C. Планшети блокували протягом щонайменше 1 год. з використанням Casein Blocker (Pierce). Фаг збирали з культурального супернатанта і суспендували в PBS, що містить 0,5 % BSA і 0,05 % Твін 20 (PBSBT). Після селекції фагу, мікротитрувальні ямки промивали великою кількістю PBS, що містить 0,05 % Твін 20 (PBST), і зв'язаний фаг елюювали за допомогою інкубації ямок з 100 mM HC1 протягом 30 хв. Фаг нейтралізували 1 M Tris, pH 8 і ампліфікували з використанням клітин XL1-Blue і хелперного фагу M13/KO7 і вирощували протягом ночі при 37 °C в 2YT, 50 мкг/мл карбенациліну. Титри фагу, елюйованого з мішеньовмісної ямки порівнювали з титрами фагу, витягнутого з ямки, що не містить мішень, для оцінки збагачення.

Отримання Fab і IgG

Для експресії Fab білка для вимірювань спорідненості, стоп-кодон вводили між важким ланцюгом і g3 у векторі фагового відображення. Клоні трансформували в клітинах E. coli 34B8 клітини і вирощували в середовищі Complete C.R.A.P. при 30 °C (Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Клітини збирали центрифугуванням, суспендували в PBS, 100 мкМ PMSF,

100 мкМ бензамідину, 2,5 мМ ЕДТА і руйнували відкритим способом з використанням мікрофлуїдаїзера. Fab очищали за допомогою афінної хроматографії з Білком G.

Для цілей скринінгу, IgG варіанти спочатку отримували в клітинах 293. Вектори, що кодують VL і VH (25 мкг) трансфікували в клітини 293 з використанням системи FuGene. 500 мкл FuGene змішували з 4,5 мл середовища DMEM, що не містить FBS і інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв. Кожний ланцюг (25 мкг) додавали до цієї суміші і інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хв. і потім переносили в п'ять колб T-150 для трансфекції протягом ночі при 37 °C в 5 % CO₂. На наступний день, середовища, що містять трансфекційну суміш, видаляють і замінюють на 23 мл середовища PS04 з 0,1 мл/л слідових елементів (A0934) і 10 мг/л інсуліну (A0940). Клітини інкубували протягом додаткових 5 днів, після яких середовища збирали при 1000 об/хв. протягом 5 хв. і стерильно фільтрували з використанням 0,22 мкм фільтра з низьким зв'язуванням білка. Зразки можуть зберігатися при 4 °C після додавання 2,5 мл 0,1 % PMSF для кожних 125 мл середовища. IgG очищали з використанням афінної хроматографії з Білком G.

Визначення спорідненості

Визначення спорідненості здійснювали за допомогою аналізу Скетчарда і поверхневого плазмонного резонансу з використанням BiAcCore™-2000 або A100.

BiAcCore 2000

Позаклітинний домен TAT211 (глікозилований) іммобілізували (приблизно 100-400 RU, в 10 мМ ацетату натрію pH 4,8 на сенсорному чипі CM5) і варіант антитіла 10H1 служив як аналізована проба (яка інжектуються при швидкості потоку, яка дорівнює 30 мкл/хв., з використанням 2-кратного серійного розведення від 4 до 1000 нМ в PBST). Кожний зразок аналізували з 4-хвилинною асоціацією і 10-хвилинною дисоціацією. Після кожної інжекції чип регенерували з використанням 10 мМ гліцину pH 1,7.

Результати і обговорення

Акцепторний каркас людини, що використовується для гуманізації, оснований на консенсусному каппа I VL домені людини і консенсусному VH домені підгрупи III людини. VL і VH домени mu10H1 вирівнювали з доменами каппа I і підгрупи III людини; кожна область, що визначає комплементарність (CDR), була ідентифікована і трансплантована в акцепторний каркас людини для генерації CDR-графта, який міг бути експресований як IgG (10H1-графт) (Фігури 3 і 4). Спорідненість 10H1-графта як Fab оцінювали з використанням поверхневого плазмонного резонансу, і була виявлена спорідненість, яка дорівнює 74 нМ для CHO-похідного позаклітинного домену TAT211, вказуючи на те, що CDR графт втратив приблизно 2-кратну спорідненість відносно антитіла гібридами mu10H1. Аналізом Скетчарда спорідненість mu10H1 IgG визначали як таку, що дорівнює 36, 37, 59 і 61 нМ для зв'язування з клітинами P828, OVCAR4, P701sc20 і Igrov1 (всі експресуючі TAT211), відповідно.

Були згенеровані бібліотеки фагового відображення Fab, в яких різноманітність вводили окремо в кожному CDR 10H1-графта і проводили пенінг проти CHO-похідного позаклітинного домену TAT211. Збагачення спостерігали після другого раунду у всіх 6 бібліотеках. Після 6 раунду, клони підіймали для аналізу послідовностей ДНК з кожної бібліотеки і відображали зміни послідовності, націлені в кожній з шести CDR (Фігури 3 і 4). Ці зміни послідовності, ідентифіковані з бібліотеки, могли б представити зміни, які ведуть до варіантів з поліпшеним зв'язуванням або просто указати на амінокислотні зміни по положеннях, які не мають впливу на зв'язування позаклітинного домену TAT211.

Деякі вибрані клони експресували як Fab і характеризували по зв'язуванню з позаклітинним доменом TAT211 за допомогою BiAcCore. Всі клони, зв'язані з TAT211 на поверхні клітин і більшість зв'язаних клонів мали значення спорідненості, значно поліпшені відносно 10H1-графта.

Усунення потенційного деамідування і ділянок, які утворюють ізо-аспарагінову кислоту, в CDR-L1 10H1-графта

Щоб уникнути потенційних виробничих проблем, потенційну ділянку утворення ізо-аспарагінової кислоти Asn28-Gly29 в CDR-L1 10H1-графта усували за допомогою відбору залишків, виявлених в інших антитілах в цих положеннях. Зміна Asn28 на Ser28 в CDR-L1 10H1-графта (10H1 v11.1) була знайдена прийнятною заміною і служила для усунення потенційного деамідування і утворення ізо-аспарагінової кислоти. Додатково, було виявлено, що зворотна мутація V93A в VH мала невеликий вплив на зв'язування (10H1.11.2 b, Фігура 4) і була введена в більш пізні гуманізовані варіанти, оскільки аланін є більш звичайно знайденим в цьому положенні.

Дозрівання афінності 10H1.11

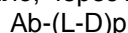
Додаткові фагові бібліотеки генерували для спорідненості зв'язування зрілого 10H1.11 з позаклітинним доменом TAT211. Різноманітність була призначена в 10H1.11.2 В для часто змінних положень в попередній бібліотеці і включала положення 27, 27с, 27е, 29, 93 і 94 в легкому ланцюгу і 54, 55 і 61 у важкому ланцюгу. Послідовності, ідентифіковані з цих бібліотек, показані на Фігурах 3-12.

З вибраних послідовностей, деякі були переформатовані в IgG для оцінки за допомогою Біасcore і аналізу Скетчарда. 10H1.11.4В генерували із змін, що поділяються, що спостерігаються в 10H1.11.2 В і воно мало найвищу спорідненість за результатами аналізу Скетчарда. Було показано, що антитіло 10H1.11.4 В, що має амінокислотну послідовність VL SEQ ID NO:9 (амінокислотної послідовності легкого ланцюга SEQ ID NO:81) і амінокислотну послідовність VH SEQ ID NO:18 (амінокислотної послідовності важкого ланцюга SEQ ID NO: 80), зв'язується з TAT211 на поверхні клітини з більш високою спорідненістю, ніж мишаче 10H1 і, як таке, було вибрано як лідируючий кандидат для додаткової розробки.

ПРИКЛАД 7: Отримання антитіл, кон'югованих з токсином, які зв'язуються з TAT211

Застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC), тобто імунокон'югатів, для місцевої доставки цитотоксичних або цитостатичних агентів, тобто лікарських засобів для знищення або інгібування пухлинних клітин при лікуванні раку (Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) AntiCancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz і Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26: 151-172; патент США № 4975278) забезпечує направлену доставку фрагмента лікарського засобу до пухлин і його внутрішньоклітинну акумуляцію, де системне введення цих некон'югованих лікарських агентів може приводити в результаті до неприйнятних рівнів токсичності для нормальних клітин, також як і для пухлинних клітин, які намагаються усунути (Baldwin et al, (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Cytotoxic agents in Cancer Therapy: Review, " в Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506). Таким чином, намагаються досягнути максимальної ефективності з мінімальною токсичністю. Спроби сконструювати і очистити ADC фокусувалися на селективності моноклональних антитіл (mAb), а також ліки-зв'язувальних і ліки-вивільняючих властивостях. Повідомлялося, що як поліклональні антитіла, так і моноклональні антитіла є застосовними при цих стратегіях (Rowland et al, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87). Лікарські засоби, що застосовуються в цих способах, включають дауноміцин, доксорубіцин, метотрексат і віндезин (Rowland et al, (1986) вище). Токсини, які застосовуються в кон'югатах антитіло-токсин включають бактерійні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такий як рицин, низькомолекулярні токсини, такі як гелданаміцин (Mandler et al. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), мایتансиноїди (EP 1391213; Liu et al, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), і каліхеаміцин (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342).

У кон'югатах антитіла з лікарським засобом (ADC) винаходу, антитіло (Ab) є кон'югованим з одним або більш з фрагментів лікарського засобу (D), наприклад, приблизно від 1 до приблизно 20 фрагментів лікарського засобу на антитіло, через лінкер (L). ADC що має формулу:



можуть бути отримані за допомогою декількох шляхів, з використанням реакцій органічної хімії, умов і реагентів, відомих кваліфікованим фахівцям в даній галузі, що включають: (1) реакцію нуклеофільної групи антитіла з бівалентним лінкерним реагентом, щоб утворити Ab-L, через ковалентний зв'язок, з подальшою реакцією з фрагментом лікарського засобу D; і (2) реакцію нуклеофільної групи фрагмента лікарського засобу з бівалентним лінкерним реагентом, щоб утворити D-L, через ковалентний зв'язок, з подальшою реакцією з нуклеофільною групою антитіла. Додаткові способи отримання ADC описані в даній заявці.

Лінкер може бути складений з одного або більше лінкерних компонентів. Зразкові лінкерні компоненти включають 6-малеїмідокапроїл ("MC"), малеїмідопропаноїл ("MP"), валін-цитрулін ("val-cit"), аланін-фенілаланін ("ala-phe"), п-амінобензилоксикарбоніл ("PAB"), N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо)пентаноат ("SPP"), N-сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат ("SMCC") і N-сукцинімідил (4-йодо-ацетил)амінобензоат ("SIAB"). Додаткові лінкерні компоненти є відомими в даній галузі і деякі описані в даній заявці.

У деяких варіантах здійснення, лінкер може містити амінокислотні залишки. Зразкові амінокислотні лінкерні компоненти включають дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Зразкові дипептиди включають: валін-цитрулін (vc або val-cit), аланін-фенілаланін (af або ala-phe). Зразкові трипептиди включають: гліцин-валін-цитрулін (gly-val-cit) і гліцин-гліцин-гліцин (gly-gly-gly). Амінокислотні залишки, які містять амінокислотний лінкерний компонент включають залишки, що зустрічаються в природі, а також мінорні амінокислоти і

амінокислотні аналоги, які не зустрічаються в природі, такі як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можуть бути сконструйовані і оптимізовані по їх селективності для ферментативного розщеплення конкретними ферментами, наприклад, пухлино-зв'язаними протеазами, катепсин В, С і D або плазмінова протеаза.

Нуклеофільні групи на антитілах включають, але не обмежені лише ними: (i) N-кінцеві амінні групи, (ii) амінні групи бічного ланцюга, наприклад лізин, (iii) тіольні групи бічного ланцюга, наприклад цистеїн, і (iv) цукрові гідроксильна або аміногрупи, де антитіло є глікозилованим. Амінні, тіольні, гідроксильні, гідразидні, оксимні, гідразинові, тіосемікарбазонові, гідразинкарбоксилатні і арилгідразидні групи є нуклеофільними і здатні до взаємодії з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних фрагментах і лінкерних реагентах, що включають: (i) активні складні ефіри, такі як складний ефір NHS, складний ефір HOBT, галогенформіати і ацилгалогеніди; (ii) алкіл- і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетон, карбоксильні і малеїмідні групи. Деякі антитіла мають відновлювальні міжланцюжкові дисульфідні, тобто цистеїнові містки. Антитіла можуть бути отримані реакційноздатними для кон'югації з лінкерними реагентами за допомогою обробки відновним агентом, таким як DTT (дитіотреїтол). Кожний цистеїновий місток буде таким чином утворювати, теоретично, два реакційноздатні тіольні нуклеофіли. Додаткові нуклеофільні групи можуть бути введені в антитіла через реакцію лізину з 2-імінотіолоном (реагент Трота), що приводить в результаті до конверсії аміну в тіол. Реакційноздатні тіольні групи можуть бути введені в антитіло (або його фрагмент) за допомогою введення одного, двох, трьох, чотирьох або більше цистеїнових залишків (наприклад, отримуючи мутантні антитіла, що містять один або більше ненативних цистеїнових амінокислотних залишків).

Кон'югати антитіла з лікарським засобом винаходу також можуть бути отримані за допомогою модифікації антитіла для введення електрофільних фрагментів, які можуть взаємодіяти з нуклеофільними замісниками на лінкерному реагенті або лікарському засобі. Цукор глікозилованих антитіл може бути окислений, наприклад періодатними окиснювальними реагентами, з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть взаємодіяти з аміною групою лінкерних реагентів або фрагментів лікарських засобів. Отримані імінові групи основи Шиффа можуть утворювати стійкий зв'язок, або можуть бути відновлені, наприклад боргідридними реагентами з утворенням стійких амінних зв'язків. У одному варіанті здійснення, реакція вуглеводної частини глікозилизованого антитіла або з галактозоксидазою або мета-періодатом натрію можуть давати на виході карбонільні (альдегідні і кетонні) групи в білку, які можуть взаємодіяти з відповідними групами на лікарському засобі (Hermanson, Bioconjugate Techniques). У ще одному варіанті здійснення, білки, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть взаємодіяти з мета-періодатом натрію, що приводить в результаті до отримання альдегіду замість першої амінокислоти (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; Патент США № 5362852). Такий альдегід може взаємодіяти фрагментом лікарського засобу або лінкерним нуклеофілом.

Альтернативно, гібридний білок, що містить антитіло і цитотоксичний агент, може бути отриманий, наприклад, за допомогою рекомбінантних методів або пептидного синтезу. Ланцюг ДНК по довжині може містити відповідні області, що кодують дві частини кон'югата, або прилягають одна до одної, або розділені областю кодуючою лінкерний пептид, який не руйнує бажані властивості кон'югата.

У ще одному іншому варіанті здійснення, антитіло може бути кон'юговане з "рецептором" (таким як стрептавідин) для використання при попередньому націлюванні на пухлину, де кон'югат антитіло-рецептор вводять пацієнту, з подальшим видаленням незв'язаного кон'югата з кровообігу з використанням очищуючого агента і потім введенням "ліганду" (наприклад, авідину), який є кон'югованим з цитотоксичним агентом (наприклад, радіонуклеотидом).

Конкретні методи для отримання кон'югатів антитіло-лікарський засіб за допомогою зв'язування токсинів з очищеними антитілами є добре відомими і традиційно використовуються в даній галузі. Наприклад, кон'югація очищеного моноклонального антитіла з токсином DM1 може виконуватися таким чином. Очищене антитіло дериватизують N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноатом для введення дитіопіридилної групи. Антитіло (376,0 мг, 8 мг/мл) в 44,7 мл 50 мМ калійфосфатного буфера (pH 6,5), що містить NaCl (50 мМ) і EDTA (1 мМ) обробляють SPP (5,3 молярних еквівалента в 2,3 мл етанолу). Після інкубації протягом 90 хвилин під аргон при температурі навколишнього середовища, реакційну суміш піддають гель-фільтрації через колонку Сефадекс G25, що врівноважує 35 мМ цитрату натрію, 154 мМ NaCl і 2 мМ EDTA. Фракції, які містять антитіло потім збирають і аналізують. Антитіло-SPP-Py (337,0 мг з вивільнюваною 2-тіопіридиною групою) розбавляють вказаним вище буфером 35 мМ цитрату натрію, pH 6,5, до кінцевої концентрації, яка дорівнює 2,5 мг/мл. DM1 (1,7

еквівалента, 16,1 молів) в 3,0 мМ диметилацетаміді (DMA, 3 % об./об. в кінцевій реакційній суміші) потім додають до розчину антитіла. Забезпечують протікання реакції при температурі навколишнього середовища під аргоном протягом 20 годин. Реакційну суміш завантажують на колонку для гель-фільтрації з Сефакрил S300 (5,0 см × 90,0 см, 1,77 л), яку врівноважують 35

5 мМ цитратом натрію, 154 мМ NaCl, pH 6,5. Об'ємна швидкість потоку становить 5,0 мл/хв. і 65 фракцій (20,0 мл кожна) збирають. Фракції відбирають і аналізують, де кількість молекул лікарського засобу DM1, зв'язаних на молекулу антитіла (p'), визначають за допомогою вимірювання поглинання при 252 нм і 280 нм.

У ілюстративних цілях, кон'югація очищеного моноклонального антитіла з токсином DM1

10 також може здійснюватися таким чином. Очищене антитіло дериватизують (Сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) для введення SMCC лінкера. Антитіло обробляють при 20 мг/мл в 50 мМ фосфат калію/50 мМ хлорид натрію/2 мМ EDTA, pH 6,5-7,5 молярними еквівалентами SMCC (20 мМ в DMSO, 6,7 мг/мл). Після перемішування протягом 2 годин під аргоном при температурі навколишнього

15 середовища, реакційну суміш фільтрують через колонку з Сефадекс G25, що врівноважує 50 мМ фосфат калію/50 мМ хлорид натрію/2 мМ EDTA, pH 6,5. Фракції, які містять антитіло відбирають і аналізують. Антитіло-SMCC потім розбавляють 50 мМ фосфат калію/50 мМ хлорид натрію/2 мМ EDTA, pH 6,5, до кінцевої концентрації, яка дорівнює 10 мг/мл, і приводять у взаємодію з 10 мМ розчином DM1 (1,7 еквівалентів, що передбачають 5 SMCC/антитіло, 7,37

20 мг/мл) в диметилацетаміді. Реакційну суміш перемішують при температурі навколишнього середовища під аргоном 16,5 годин. Реакційну суміш кон'югації потім фільтрують через колонку для гель-фільтрації з Сефадекс G25 (1,5 × 4,9 см) з 1× PBS при pH 6,5. Відношення DM1/антитіло (p) потім вимірюють по поглинанню при 252 нм і при 280 нм.

Крім того, вільний цистеїн на антитілі вибору може бути модифікований за допомогою біс-

25 малеїмідо реагенту BM(PEO)4 (Pierce Chemical), залишаючи малеїмідогрупу, яка не прореагувала, на поверхні антитіла. Це може здійснюватися за допомогою розчинення BM(PEO)4 в суміші 50 % етанол/вода до концентрації, яка дорівнює 10 мМ, і додавання десятиразового молярного надлишку до розчину, що містить антитіло в забуференому фосфатом фізрозчині при концентрації, яка дорівнює приблизно 1,6 мг/мл (10 мікромолів) і

30 забезпечуючи його взаємодію протягом 1 години. Надлишок BM(PEO)4 видаляють гель-фільтрацією в 30 мМ цитраті, pH 6 з 150 мМ NaCl буфером. Приблизно 10-кратний молярний надлишок DM1 розчиняють в диметилацетаміді (DMA) і додають до інтермедіату антитіло-BMPEO. Диметилформамід (DMF) також може використовуватися для розчинення реагенту фрагмента лікарського засобу. Забезпечують взаємодію реакційної суміші протягом ночі перед

35 гель-фільтрацією або діалізом в PBS для видалення лікарського засобу, який не прореагував. Гель-фільтрацію на колонках S200 в PBS застосовують для видалення високомолекулярних агрегатів і отримання очищеного кон'югата антитіло-BMPEO-DM1.

Цитотоксичні лікарські засоби звичайно кон'югували з антитілами через часті численні лізиніві залишки антитіла. Кон'югація через тіольні групи, присутні, або вбудовані в, антитіло,

40 що представляє інтерес, також здійснювалася. Наприклад, цистеїнові залишки були введені в білки методами генетичної інженерії для утворення ділянок ковалентного приєднання для лігандів (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126-132; Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) J. Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al. (2001)

45 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; Патент США № 6,248,564). Як тільки вільний цистеїновий залишок з'являється в антитілі, що представляє інтерес, токсини можуть бути зв'язані з цією ділянкою. Як приклад, лікарські лінкерні реагенти, малеїмідокапроїл-монометил ауристатин E (MMAE), тобто MC-MMAE, малеїмідокапроїл-монометил ауристатин F (MMAF), тобто MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE або MC-val-cit-PAB-MMAF, розчинені в ДМСО,

50 розбавляють в ацетонітрилі і воді при відомій концентрації, і додають до охолодженого цистеїн-дериватизованого антитіла в забуференому фосфатом фізрозчині (PBS). Через приблизно одну годину, додають надлишок малеїміду для гасіння реакції і купірування будь-яких тіольних груп антитіла, які не прореагували. Реакційну суміш концентрують центрифугальною ультрафільтрацією і антитіло, кон'юговане з токсином, очищають і знесолють за допомогою

55 елювання через смола G25 в PBS, фільтрують через 0,2 м фільтри в стерильних умовах, і заморожують для зберігання.

Додатково, антитіла проти TAT211 даного винаходу можуть бути кон'юговані з ауристатиновими і долостатиновими токсинами (такими як MMAE і MMAF) з використанням наступного методу. Антитіло, розчинене в 500 мМ бораті натрію і 500 мМ хлориді натрію при pH

60 8,0, обробляють надлишком 100 мМ дитіотреїтолу (DTT). Після інкубації при 37 °C протягом

приблизно 30 хвилин, буфер обмінюють за допомогою елюювання через смолу Сефадекс G25 і елюють PBS з 1 мМ DTPA. Значення тіол/Ab перевіряють за допомогою визначення концентрації відновленого антитіла по поглинанню при 280 нм розчину, а концентрацію тіолу за допомогою реакції з DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) і визначення поглинання при 412 нм.

Відновлене антитіло, розчинене в PBS, охолоджують на льоду.

Лікарський лінкерний реагент, (1) малеїмідокапроїл-монометил ауристатин Е (MMAE), тобто MC-MMAE, (2) MC-MMAF, (3) MC-val-cit-PAB-MMAE або (4) MC-val-cit-PAB-MMAF, розчинений в ДМСО, розбавляють в ацетонітрилі і воді при відомій концентрації, і додають до охолодженого відновленого антитіла в PBS. Через приблизно одну годину, додають надлишок малеїмиду для гасіння реакції і купірування будь-яких тіольних груп антитіла, які не прореагували. Реакційну суміш концентрують центрифугальною ультрафільтрацією і антитіло, кон'юговане з токсином, очищають і знесолюють за допомогою елюювання через смолу G25 в PBS, фільтрують через 0,2 м фільтри в стерильних умовах, і заморожують для зберігання.

ПРИКЛАД 8: Аналіз знищення пухлинних клітин *in vitro*

Клітини ссавців, які експресують поліпептид TAT211, що представляє інтерес, можуть бути отримані з використанням стандартних методів експресійного вектора і клонування. Альтернативно, множина ліній пухлинних клітин, які експресують поліпептиди TAT211, що представляють інтерес, є загальнодоступними, наприклад, через ATCC і можуть бути рутинно ідентифіковані з використанням стандартного ELISA або FACS аналізу. Моноклональні антитіла проти поліпептиду TAT211 (і його похідних кон'югованих з токсином) можуть потім використовуватися в аналізах, щоб визначити здатність антитіла знищувати клітини, які експресують поліпептид TAT211 *in vitro*.

Наприклад, клітини, які експресують поліпептид TAT211, що представляє інтерес, отримують, як описано вище, і вміщують в 96-ямкові чашки. У одному аналізі, кон'югат антитіло/токсин (або оголене антитіло) включений протягом інкубації клітин протягом періоду, який дорівнює 4 дням. У другому незалежному аналізі, клітини інкубують протягом 1 години з кон'югатом антитіло/токсини (або оголеним антитілом) і потім промивають і інкубують за відсутності кон'югата антитіло/токсини протягом періоду, який дорівнює 4 дням. Життєздатність клітин потім вимірюють з використанням Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay від Promega (Cat# G7571). Необроблені клітини служать як негативний контроль.

У першому експерименті і з конкретним відношенням до даного винаходу, різноманітні концентрації кон'югатів токсину ADC MC-vc-PAB-MMAE з гуманізованими антитілами проти TAT211 10H1 і контрольних антитіл (проти-людського gD або проти-аглютиніну амброзії), які є неспецифічними для зв'язування з TAT211, тестували на здатність до зв'язування і знищення поліпептид TAT211-експресуючої клітинної лінії OVCAR-3. Більш конкретно, клітини OVCAR-3 висівали при 3000 клітин на ямку в 96-ямкових планшетах і потім обробляли різноманітними концентраціями антитіл. Знищення клітин кількісно оцінювали на день 7 з використанням реагенту Cell Titer-Glo. Антитіла, що використовуються в цих аналізах, являли собою (i) антитіло проти TAT211 10H1-графт, що має VL амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO: 5, і VH амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:14, (ii) неспецифічне антитіло проти людського gD, (iii) неспецифічне антитіло проти аглютиніну амброзії, (iv) гуманізоване антитіло 10H1.11 проти TAT211, що має VL амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO: 6, і VH амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:15, (v) гуманізоване антитіло 10H1.11.2 B проти TAT211, що має VL амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO: 8, і VH амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:17, (vi) гуманізоване антитіло 10H1.11.4 B проти TAT211, що має VL амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO: 9, і VH амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:18, (vii) гуманізоване антитіло 10H1.11.6 B проти TAT211, що має VL амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:11, і VH амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:20, і (viii) гуманізоване антитіло 10H1.11.1 проти TAT211, що має VL амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO: 7, і VH амінокислотну послідовність, показану як SEQ ID NO:16. Результати цих експериментів показані на Фігурі 15 і демонструють, що кожне з антитіл проти TAT211, кон'югованих з токсином викликало значні рівні смерті клітин у клітин OVCAR-3 (тобто, клітин, яких експресують поліпептид TAT211 на клітинній поверхні), в той час як ніякого значного знищення клітин не спостерігали для будь-яких неспецифічних антитіл. Ці дані демонструють, що тестовані антитіла проти TAT211 здатні до зв'язування з поліпептидом TAT211 на поверхні клітин, які експресують цей поліпептид і викликають смерть цих клітин *in vitro*.

У другому експерименті, різноманітні концентрації або (i) кон'югованого з MC-vc-PAB-MMAE 10H1.11.4B, або (ii) контрольного антитіла проти gD людини, тестували *in vitro* на здатність знищувати або клітини 293 (які ендогенно не експресують поліпептид TAT211) або клітини 293,

які були рекомбінантно побудовані, щоб експресувати поліпептид TAT211 на їх клітинній поверхні (клітини 293/TAT211). Більш конкретно, клітини 293 або 293/TAT211 висівали при 2000 клітинах на ямку в 96-ямкових планшетах і потім обробляли різноманітними концентраціями антитіл. Знищення клітин кількісно оцінювали на день 7 з використанням реагенту Cell Titer-Glo.

5 Результати, отримані з клітинами 293, показані на Фігурі 16, де дані демонструють, що ні неспецифічне контрольне антитіло проти gD людини, ні антитіло проти TAT211 10H1.11.4B не мали здатності продукувати значне знищення клітин 293 (які не експресують поліпептид TAT211). Навпаки, однак, результати, отримані з клітинами 293/TAT211 (Фігура 17), які експресують поліпептид TAT211 на клітинній поверхні, демонструють, що антитіло проти

10 TAT211 10H1.11.4B, кон'юговане з токсином, спричиняє значне знищення клітин *in vitro*.

Ці дані демонструють, що різноманітні антитіла проти TAT211, що використовуються в цих аналізах, мають здатність до зв'язування з TAT211 поліпептидом на клітинній поверхні і індукують смерть тих клітин, з якими зв'язується антитіло.

ПРИКЛАД 9: Аналіз знищення пухлини *in vivo*

15 Для тестування ефективності дії різноманітних антитіл проти TAT211 для знищення пухлини використовували модель *in vivo* OVCAR-3 жирового тіла молочної залози. Конкретно, була розроблена модель №. 4382-061404 OVCAR-3 трансплантата жирового тіла молочної залози з використанням TAT211-експресуючої клітинної лінії OVCAR-3 аденокарциноми яєчника, яка

20 була отримана від Американської Колекції Типових Культур (Manassas, VA). Клітини OVCAR-3 вводили ін'єкційно внутрішньочеревинно самицям мишей C.B-17 з важкою комбінованою імунною недостатністю з бежевою мутацією (C.B-17 SCID.beige). Донорну пухлину вирізали з миші, яка несе внутрішньочеревинні пухлини, подрібнювали, і хірургічно імплантували в праве грудне жирове тіло молочної залози самицям реципієнтних мишей C.B-17 SCID.beige. Пухлини

25 жирового тіла молочної залози серійно пасерували для підтримки лінії трансплантата і для забезпечення мишей-пухлиноносіїв для досліджень ефективності дії (звичайно готових через 14-18 днів після трансплантації). Миші C.B-17 SCID.beige, що використовуються для підтримки лінії трансплантата, мали вік 6-8 тижнів і були отримані від Charles River Laboratories, Inc. (San Diego, CA). Різнорозмірні концентрації, включаючи 3 мг/кг, різноманітних антитіл потім використовували, щоб визначити їх ефект на середній об'єм пухлини *in vivo*.

30 Результати цих різноманітних аналізів *in vivo* показані на Фігурах 18 і 19. Ці результати демонструють, що тестовані різноманітні антитіла проти TAT211 мають здатність до зв'язування з поліпептидом TAT211 на поверхні пухлинних клітин *in vivo* і індукування смерті цих TAT211-експресуючих пухлинних клітин. Отже, результати цих експериментів показують, що тестовані різноманітні антитіла проти TAT211 є ефективними при терапевтичному лікуванні TAT211-

35 експресуючих пухлин *in vivo*.

ПРИКЛАД 10: Клітинна інтерналізація антитіл проти TAT211

Щоб визначити чи є антитіла проти TAT211, описані в даній заявці, інтерналізованими в TAT211-експресуючі клітини при зв'язуванні антитіла з поліпептидом TAT211 на клітинній

40 поверхні, клітини висівали на 8-ямкові предметні стекла (Nalge Nunc Intl.) (100000 клітин/ямку для OVCAR3 і 30000 клітини/ямку для Igrov1 або 293) і інкубували при 37 °C/5 % CO₂ протягом 24-48 годин. Антитіла проти TAT211 додавали при 2-5 мкг/мл в середовище для росту або протягом ночі або протягом 2 годин разом з інгібіторами протеаз (50 мкг/мл Лейпептину і 5 мкг/мл Пепстатину). Ці інгібітори протеаз запобігають деградації первинного антитіла, забезпечуючи виявлення антитіла в лізосомах. Для живого мічення, клітини інкубували з

45 антитілами при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Всі клітини потім промивали, фіксували в 3 % формальдегіді протягом 10 хвилин, пермеабілізували з 0,05 % сапоніном протягом 5-10 хвилин і ділянки неспецифічного зв'язування антитіла блокували PBS+1 % BSA протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Клітини потім інкубували з вторинними антитілами, міченими Alexa-488 (Molecular Probes) при 37 °C протягом 1 години, промивали, і

50 потім камерні вкладиші видаляли, щоб нанести клітини на скляний слайд. Слайди встановлювали, застосовуючи VectaShield з DAPI для мічення ядер (Vector Laboratories), потім вміщували під покривне скло і герметизували прозорим лаком для нігтів.

Результати цих аналізів демонстрували, що різноманітні антитіла проти TAT211, описані в даній заявці, зв'язувалися з поліпептидом TAT211 на поверхні живих клітин і самостійно

55 інтерналізувались в клітині і розташовувалися в лізосомах клітини в межах менше ніж 20 годин після додавання антитіл до клітин. Як такі, антитіла проти TAT211, описані в даній заявці, являють собою чудові кандидати для токсин-кон'югованої пухлинної терапії для пухлин, які експресують поліпептиди TAT211.

ПРИКЛАД 11: Застосування TAT як гібридизаційного зонда

Наступний спосіб описує застосування нуклеотидної послідовності, яка кодує ТАТ, як гібридизаційного зонда для, тобто, діагностики присутності пухлини у ссавця.

ДНК, що містить кодуєчу послідовність непроцесованого або зрілого ТАТ, як описано в даній заявці, може також використовуватися як зонд для скринінгу гомологічних ДНК (таких як кодуючі варіанти ТАТ, що зустрічаються в природі) в бібліотеках кДНК тканин людини або геномних бібліотеках тканин людини.

Гібридизацію і промивання фільтрів, що містять будь-яку з двох бібліотек ДНК, здійснюють при наступних умовах високої суворості. Гібридизацію міченого радіоактивним ізотопом ТАТ-похідного зонда до фільтрів здійснюють в розчині 50 % формаміду, 5× SSC, 0,1 % SDS, 0,1 % пірофосфату натрію, 50 мМ фосфату натрію, рН 6,8, 2× Розчин Денхардта, і 10 % декстрансульфату при 42 °С протягом 20 годин. Промивання фільтрів здійснюють у водному розчині 0,1× SSC і 0,1 % SDS при 42 °С.

ДНК, що мають бажану ідентичність послідовності з ДНК, що кодує непроцесовану нативну послідовність ТАТ, можуть потім бути ідентифіковані з використанням стандартних методів відомих в даній галузі.

ПРИКЛАД 12: Експресія ТАТ в *E. coli*

Даний приклад ілюструє отримання неглікозилованої форми ТАТ за допомогою рекомбінантної експресії в *E. coli*.

Послідовність ДНК, що кодує ТАТ, первинно ампліфікують з використанням вибраних ПЛР праймерів.

Праймери повинні містити ділянки рестрикційних ферментів, які відповідають ділянкам рестрикційних ферментів на вибраному експресійному векторі. Можуть використовуватися різноманітні експресійні вектори. Прикладом відповідного вектора є pBR322 (отриманий з *E. coli*; див. Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)), який містить гени резистентності для ампіциліну і тетрацикліну. Вектор розщеплюють за допомогою рестрикційного ферменту і дефосфорилують. ПЛР ампліфіковані послідовності потім лігують у вектор. Вектор буде, переважно, включати послідовності, які кодують ген резистентності до антибіотиків, trp промотор, полі-his лідер (що включає перші шість STII кодонів, полі-his послідовність, і ділянка розщеплення для ентерокинази), ТАТ кодуєчу область, лямбда транскрипційний термінатор, і ген argU.

Лігуючу суміш потім застосовують для трансформації вибраного штаму *E. coli* з використанням способів, описаних у Sambrook et al., вище. Трансформанти ідентифікують по їх здатності рости на планшетах LB, і потім відбирають колонії, резистентні до антибіотиків. Плазмідна ДНК може бути виділена і підтверджена за допомогою рестрикційного аналізу і секвенування ДНК.

Вибрані клони можуть бути вирощені протягом ночі в рідкому культуральному середовищі, такому як бульйон LB, доповнений антибіотиком. Нічна культура може згодом застосовуватися для інокуляції культури в більш великому масштабі. Клітини потім вирощують до бажаної оптичної густини, під час якої експресійний промотор включається.

Після культивування клітин протягом декількох додаткових годин, клітини можуть бути зібрані центрифугуванням. Згусток клітин, отриманий центрифугуванням, може бути солюбілізований з використанням різноманітних агентів, відомих в даній галузі, і солюбілізований ТАТ білок може потім бути очищений з використанням хелатуючої метал колонки при умовах, які забезпечують міцне зв'язування білка.

ТАТ може експресуватися в *E. coli* в полі-His міченій формі, з використанням наступної методики. ДНК, що кодує ТАТ, первинно ампліфікують з використанням вибраних праймерів ПЛР. Праймери будуть містити ділянки для рестрикційних ферментів, які відповідають ділянкам для рестрикційних ферментів на вибраному експресійному векторі, і інші корисні послідовності, що надають ефективну і надійну ініціацію трансляції, швидке очищення на хелатуючій метал колонці, і протеолітичне видалення з допомогою ентерокинази. ПЛР-ампліфіковані, полі-His мічені послідовності потім лігують в експресійний вектор, який застосовують для трансформації хазяя *E. coli* на основі штаму 52 (W3110 fufiA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Трансформанти спочатку вирощують в LB, що містить 50 мг/мл карбенициліну при 30 °С зі струшуванням, до досягнення O.D., 600 з 3-5. Культури потім розбавляють 50-100-кратно середовищем CRAP (отриманим змішуванням 3,57 г (NH₄)₂SO₄, 0,71 г цитрату натрію · 2H₂O, 1,07 г KCl, 5,36 г дріжджового екстракта Difco, 5,36 г гідролізату казеїну Шеффільда в 500 мл води, а також 110 мМ MPOS, рН 7,3, 0,55 % (мас./об.) глюкози і 7 мМ MgSO₄) і вирощують протягом приблизно 20-30 годин при 30 °С зі струшуванням.

Зразки видаляють для верифікації експресії за допомогою SDS-PAGE аналізу, і об'ємну культуру центрифугують для згущення клітин. Згустки клітин заморожують до очищення і рефолдингу.

Пасту *E. coli* від 0,5 до 1 л ферментацій (6-10 г згустків) ресуспендують в 10 об'ємах (мас./об.) в буфері з 7 М гуанідином, 20 мМ Тріс, рН 8. Тверді сульфат натрію і тетрагідрат натрію додають для створення кінцевих концентрацій 0,1 М і 0,02 М, відповідно, і розчин перемішують протягом ночі при 4 °С. Ця стадія приводить в результаті до денатурованого білка, в якому всі цистеїнові залишки блоковані сульфітолізацією. Розчин центрифугують при 40000 об./хв. в ультрацентрифузі Beckman протягом 30 хв. Супернатант розбавляють 3-5 об'ємами буфера для метал-хелатуючої колонки (6 М гуанідин, 20 мМ Тріс, рН 7,4) і фільтрують через 0,22 мікронні фільтри для освітлення. Освітлений екстракт завантажують на 5 мл Qiagen Ni-NTA метал-хелатуючу колонку, що врівноважує в буфері для метал-хелатуючої колонки. Колонку промивають додатковим буфером, що містить 50 мМ імідазолу (Calbiochem, Utrol grade), рН 7,4. Білок елюють буфером, що містить 250 мМ імідазолу. Фракції, що містять бажаний білок, відбирають і зберігають при 4 °С. Концентрацію білка оцінюють по його поглинанню при 280 нм з використанням розрахованого коефіцієнта екстинкції, виходячи з його амінокислотної послідовності.

Білки піддають рефолдингу за допомогою розбавлення зразка повільно в свіжоотриманий буфер для рефолдингу, що складається з: 20 мМ Тріс, рН 8,6, 0,3 М NaCl, 2,5 М сечовини, 5 мМ цистеїну, 20 мМ гліцину і 1 мМ EDTA. Об'єми рефолдингу вибирають таким чином, що кінцева концентрація білка знаходиться в інтервалі від 50 до 100 мікрограмів/мл. Розчин для рефолдингу обережно перемішують при 4 °С протягом 12-36 годин. Реакцію рефолдингу гасять за допомогою додавання TFA до кінцевої концентрації, яка дорівнює 0,4 % (рН приблизно 3). Перед додатковим очищенням білка, розчин фільтрують через 0,22 мікронний фільтр і додають ацетонітрил до 2-10 % кінцевої концентрації. Після рефолдингу білок хроматографують на обернено-фазовій колонці Poros R1/H з використанням рухомого буфера з 0,1 % TFA з елюванням при градієнті ацетонітрилу від 10 до 80 %. Аліквоти фракцій з поглинанням при A280 аналізують на SDS поліакриламідних гелях, і фракції, що містять гомогенний білок після рефолдингу об'єднують. Як правило, належним чином види більшості білків після рефолдингу, елюють при найнижчих концентраціях ацетонітрилу, оскільки ці види є найбільш компактними, причому їх гідрофобні внутрішні частини екрановані від взаємодії із обернено-фазовою смолою. Агреговані види звичайно елюються при більш високих концентраціях ацетонітрилу. У доповнення до розділення неправильно упакованих форм білків від бажаної форми, на стадії із оберненою фазою також видаляють ендотоксин зі зразків.

Фракції, що містять бажаний складчастий поліпептид TAT, об'єднують, і ацетонітрил видаляють з використанням слабкого потоку азоту, направленою на розчин. Білки складають в 20 мМ HEPES, рН 6,8 з 0,14 М хлориду натрію і 4 % манітолу за допомогою діалізу або гель-фільтрацією з використанням G25 Superfine (Pharmacia) смол, врівноважують в буфері для складу і фільтрують в стерильних умовах.

Деякі з поліпептидів TAT, розкритих в даній заявці, були успішно експресовані і очищені з використанням цих методу(методів).

ПРИКЛАД 13: Експресія TAT в клітинах ссавців

Даний приклад ілюструє отримання потенційно глікозилованої форми TAT за допомогою рекомбінантної експресії в клітинах ссавців.

Вектор pRK5 (див. EP 307,247, опубліковану 15 березня 1989 р.), використовують як експресійний вектор. Необов'язково, ДНК TAT лігують в pRK5 з вибраними рестрикційними ферментами для забезпечення введення ДНК TAT з використанням способів лігування, таких як описані в Sambrook et al., вище. Отриманий в результаті вектор називають pRK5-TAT.

У одному варіанті здійснення, вибрані клітини-хазяї можуть являти собою клітини 293. Клітини 293 людини (ATCC CCL 1573) вирощують до злиття в чашках для тканинних культур в середовищі, такому як DMEM, доповненому сироваткою зародка телят, і необов'язково, поживні компоненти і/або антибіотики.

Приблизно 10 мкг ДНК pRK5-TAT змішують з приблизно 1 мкг ДНК, що кодує ген VA РНК [Thimmapaya et al, Cell, 31:543 (1982)] і розчиняють в 500 мкл 1 мМ Тріс-НCl, 0,1 мМ EDTA, 0,227 М CaCl₂. До цієї суміші додають, по краплях, 500 мкл 50 мМ HEPES (рН 7,35), 280 мМ NaCl, 1,5 мМ NaPO₄, і забезпечують утворення осаду протягом 10 хвилин при 25 °С. Осад суспендують і додають до клітин 293 і дають осісти протягом приблизно чотирьох годин при 37 °С. Культуральне середовище аспірують і 2 мл 20 % гліцерину в PBS додають протягом 30 секунд. Клітини 293 потім промивають середовищем, що не містить сироватки, додають свіже середовище, і клітини інкубують протягом приблизно 5 днів.

Приблизно через 24 години після трансфекцій, культуральне середовище видаляють і замінюють на культуральне середовище (окремо) або культуральне середовище, що містить 200 мкКі/мл ³⁵S-цистеїну і 200 мкКі/мл ³⁵S-метіоніну. Через 12 годин інкубації, кондиціоноване

середовище збирають, концентрують на відцентровому фільтрі, і завантажують на 15 % SDS гель. Оброблений гель може бути висушений і експонований на плівку протягом вибраного періоду часу, щоб відобразити присутність поліпептиду TAT. Культури, що містять трансфіковані клітини, можуть піддаватися додатковій інкубації (в середовищі, що не містить сироватки), і середовище тестують у вибраних біоаналізах.

У альтернативному методі, TAT може бути введений в клітини 293 тимчасово з використанням способу з декстрансульфатом, описаного Sompayrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Клітини 293 вирощують до максимальної густини в ролерній колбі і додають 700 мкг ДНК pRK5-TAT. Клітини спочатку концентрують з ролерної колби за допомогою центрифугування і промивають PBS. Осад ДНК-декстрану інкубують на згустку клітин протягом чотирьох годин. Клітини обробляють 20 % гліцерином протягом 90 секунд, промивають тканинним культуральним середовищем, і повторно вводять в ролерну колбу, що містить тканинне культуральне середовище, 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 0,1 мкг/мл бичачого трансферину. Через приблизно чотири дні, кондиціоноване середовище центрифугують і фільтрують для видалення клітин і дебрису. Зразок, що містить експресований TAT, потім може бути концентрований і очищений будь-яким вибраним способом, таким як діаліз і/або колонкова хроматографія.

У ще одному варіанті здійснення, TAT може бути експресований в CHO клітинах. pRK5-TAT може бути трансфікований в клітини CHO з використанням відомих реагентів, таких як CaPO₄ або DEAE-декстран. Як описано вище, клітинні культури можуть бути інкубовані, і середовище замінене на культуральне середовище (окремо) або середовище, що містить радіоактивну мітку, таку як ³⁵S-метіонин. Після визначення присутності поліпептиду TAT, культуральне середовище може бути замінене на середовище, що не містить сироватки. Переважно, культури інкубують протягом приблизно 6 днів, і потім кондиціоноване середовище збирають. Середовище, що містить експресований TAT, потім може бути концентроване і очищене за допомогою будь-якого вибраного способу.

Епітоп-мічений TAT також може бути експресований в хазяйських CHO клітинах. TAT може бути субклонований з вектора pRK5. Субклонова вставка може піддаватися ПЛР для гібридизації в рамці з вибраною епітопною міткою, такою як полі-his мітка в Бакуловірусному експресійному векторі. Полі-his мічена TAT вставка потім може бути субклонована в керований SV40 вектор, що містить селекційний маркер, такий як DHFR для селекції стабільних клонів. Зрештою, CHO клітини можуть бути трансфіковані (як описано вище) керованим SV40 вектором. Мічення може здійснюватися, як описано вище, для верифікації експресії. Культуральне середовище, що містить експресований полі-His мічений TAT, потім може бути концентрована і очищена за допомогою будь-якого вибраного способу, такого як Ni²⁺-хелатна афінна хроматографія.

TAT також може бути експресований в CHO і/або COS клітинах за допомогою методики транзитornoї експресії або в CHO клітинах за допомогою ще однієї методики стабільної експресії.

Стабільну експресію в CHO клітинах здійснюють з використанням наступної методики. Білки експресують як конструкцію IgG (імуноадгезин), в якій кодуєчі послідовності для розчинних форм (наприклад, позаклітинних доменів) відповідних білків рекомбінують з послідовністю константної області IgG1, що містить шарнір, CH₂ і CH₂ домени і/або є полі-His міченою формою.

Після ПЛР ампліфікації, відповідні ДНК субклонують в експресійному векторі CHO з використанням стандартних методів, як описано в Ausubel et al, Current Protocols Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Експресійні вектори CHO побудовані так, щоб мати сумісні рестрикційні сайти 5' і 3' у ДНК, що представляє інтерес, для забезпечення зручного зворотного-поступального руху кДНК. Вектор використовує експресію в CHO клітинах, як описано у Lucas et al, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), і використовує ранній промотор/енхансер SV40, щоб керувати експресією кДНК, що представляє інтерес, і дигідрофолатредуктази (DHFR). Експресія DHFR дозволяє провести селекцію для стабільної підтримки плазміди після трансфекції.

Дванадцять мікрограмів бажаної плазмідної ДНК вводять в приблизно 10 мільйонів CHO клітин з використанням доступних на ринку трансфекційних реагентів SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER® або FUGENE® (Boehringer Mannheim). Клітини вирощують, як описано у Lucas et al., вище. Приблизно 3 × 10⁷ клітини заморожують в ампулі для подальшого росту і вироблення, як описано нижче.

Ампули, що містять плазмідну ДНК, відморожують за допомогою вміщення у водяну баню і змішують за допомогою інтенсивного перемішування. Вміст переносять піпеткою в

центрифугальну пробірку, що містить 10 мл середовища, і центрифугують при 1000 об./хв. протягом 5 хвилин. Супернатант аспірують і клітини ресуспендують в 10 мл селективного середовища (через 0,2 мкм відфільтрований PS20 з 5 % 0,2 мкм діафільтрованою зародковою телячою сироваткою). Клітини потім аліквотують в 100 мл флакон, що містить 90 мл селективного середовища. Через 1-2 дні, клітини переносять в 250 мл флакон, заповнений 150 мл селективного середовища для росту, і інкубують при 37 °С. Через ще інші 2-3 дні, флакони об'ємом 250 мл, 500 мл і 2000 мл засівають 3×10^5 клітин/мл. Клітинне середовище замінюють на свіже середовище центрифугуванням і ресуспендуванням в середовищі для отримання. Незважаючи на те, що можуть використовуватися будь-які відповідні середовища для СНО, середовище для отримання, описане в Патенті США № 5,122,469, виданому 16 червня 1992 року, може дійсно застосовуватися. Колбу для отримання об'ємом 3L засівають при $1,2 \times 10^6$ клітин/мл. У день 0, визначають кількість клітин і рН. У день 1, з колби відбирають зразки і проводять продування фільтрованим повітрям. На день 2, з колби відбирають зразки, температуру змінюють до 33 °С, і додають 30 мл 500 г/л глюкози і 0,6 мл 10 % піногасника (наприклад, 35 % полідиметилсилоксанову емульсію, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Протягом всього отримання, рН регулюють за потреби, щоб втримувати його приблизно рівним 7,2. Через 10 днів, або доти, поки життєздатність не впаде нижче 70 %, клітинну культуру збирають за допомогою центрифугування і фільтрації через 0,22 мкм фільтр. Фільтрат або зберігали при 4 °С або негайно завантажували на колонки для очищення.

Для полі-His мічених конструкцій, білки очищають з використанням Ni-NTA колонки (Qiagen). Перед очищенням, імідазол додають до кондиціонованого середовища до концентрації, яка дорівнює 5 мМ. Кондиціоноване середовище подають насосом на Ni-NTA колонку об'ємом 6 мл, урівноважену в буфері 20 мМ Hepes, рН 7,4, що містить, 0,3 М NaCl і 5 мМ імідазолу, при швидкості потоку, яка дорівнює 4-5 мл/хв. при 4 °С. Після завантаження, колонку промивають додатковим врівноважуючим буфером і білок елюють врівноважуючим буфером, що містить 0,25 М імідазолу. Високоочищений білок далі знесолювали в буфері для зберігання, який містить 10 мМ Hepes, 0,14 М NaCl і 4 % манітолу, рН 6,8, за допомогою колонки об'ємом 25 мл з G25 Superfine (Pharmacia) і зберігають при -80 °С.

Імуноадгезинові (Fc-вмісні) конструкції очищають з кондиціонованого середовища таким чином. Кондиціоноване середовище подають насосом на колонку об'ємом 5 мл з Білком А (Pharmacia), яка була урівноважена в 20 мМ Na фосфатному буфері, рН 6,8. Після завантаження, колонку промивають великим об'ємом врівноважуючого буфера перед елюванням 100 мМ лимонної кислоти, рН 3,5. Елюований білок негайно нейтралізують за допомогою збору 1 мл фракцій в пробірки, що містять 275 мкл 1 М Tris буфера, рН 9. Високоочищений білок далі знесолювали в буфері для зберігання, як описано вище для полі-His мічених білків. Гомогенність оцінюють за допомогою SDS поліакриламідних гелів і N-кінцевого амінокислотного секвенування з деградацією по Едману.

Деякі з поліпептидів TAT, розкритих в даній заявці, були успішно експресовані і очищені з використанням цих методу(методів).

ПРИКЛАД 14: Експресія TAT в дріжджах

Наступний спосіб описує рекомбінантну експресію TAT в дріжджах.

Спочатку створюють дріжджові експресійні вектори для внутрішньоклітинного отримання або секреції TAT з ADH2/GAPDH промотору. ДНК, що кодує TAT, і промотор вводять у відповідні ділянки для рестрикційних ферментів у вибраній плазміді, щоб направити внутрішньоклітинну експресію TAT. Для секреції, ДНК, що кодує TAT, може бути клонувана у вибраній плазміді, разом з ДНК, що кодує ADH2/GAPDH промотор, нативний TAT сигнальний пептид або інший сигнальний пептид ссавців, або, наприклад, дріжджовий альфа-фактор або інвертаза-секреторну сигнальну/лідерну послідовність, і лінкерні послідовності (за потреби) для експресії TAT.

Дріжджові клітини, такі як дріжджовий штам AB110, можуть потім бути трансформовані з експресійними плазмідами, описаними вище, і культивовані у вибраних ферментаційних середовищах. Трансформовані дріжджові супернатанти можуть бути проаналізовані за допомогою осадження 10 % трихлороцтовою кислотою і розділення з допомогою SDS-PAGE, з подальшим фарбуванням гелів барвником Кумасі Синім.

Рекомбінантний TAT може далі бути виділений і очищений за допомогою видалення дріжджових клітин з ферментаційного середовища за допомогою центрифугування і потім концентрування середовища з використанням вибраних картриджних фільтрів. Концентрат, що містить TAT, може додатково бути очищений з використанням вибраних смол для колонкової хроматографії.

Деякі з поліпептидів ТАТ, розкритих в даній заявці, були успішно експресовані і очищені з використанням цих методу(методів).

ПРИКЛАД 15: Експресія ТАТ в клітинах комах, інфікованих бакуловірусом

Наступний спосіб описує рекомбінантну експресію ТАТ в клітинах комах, інфікованих бакуловірусом.

Послідовність, що кодує ТАТ, являє собою гібридну висхідну лінію епітопної мітки, що міститься всередині бакуловірусного експресійного вектора. Такі епітопні мітки включають полі-*his* мітки і імуноглобулінові мітки (подібно до Fc-областей IgG). Можуть використовуватися різноманітні плазмідні, включаючи плазмідні, які походять від промислово доступних плазмід, такі як pVL1393 (Novagen). Коротко, послідовність, що кодує ТАТ, або бажану частину кодуєчої послідовності ТАТ, таку як послідовність, що кодує позаклітинний домен трансмембранного білка, або послідовність, що кодує зрілий білок, якщо білок є позаклітинним, ампліфікують за допомогою ПЛР з праймерами, комплементарними 5' і 3' областям. 5' праймер може вводити фланкуючі (вибрані) ділянки для рестрикційних ферментів. Продукт потім розщеплюють цими вибраними рестрикційними ферментами і субклонують в експресійний вектор.

Рекомбінантний бакуловірус генерують за допомогою со-трансфекції вказаної вище плазміді і вірусної ДНК BACULOGOLD™ (Pharmingen) в клітини *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) з використанням ліпофектину (доступний на ринку від GIBCO-BRL). Через 4-5 днів інкубації при 28 °C, віруси, які вивільняються, збирають і застосовують для додаткових ампліфікацій. Вірусна інфекція і білкова експресія здійснюються, як описано O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

Експресований полі-*his* мічений ТАТ може потім бути очищений, наприклад, за допомогою Ni^{2+} -хелатної афінної хроматографії таким чином. Екстракти отримують з рекомбінантних вірус-інфікованих клітин Sf9, як описано Rupert et al, *Nature*, 362: 175-179 (1993). Коротко, клітини Sf9 відмивають, ресуспендують в буфері для руйнування ультразвуком (25 мл Hepes, pH 7,9; 12,5 mM MgCl_2 ; 0,1 mM EDTA; 10 % гліцерину; 0,1 % NP-40; 0,4 M KCl), і обробляють ультразвуком двічі протягом 20 секунд на льоду. Оброблені ультразвуком зразки освітлюють центрифугуванням, і супернатант розбавляють 50-кратно в завантажувальному буфері (50 mM фосфати, 300 mM NaCl, 10 % гліцерину, pH 7,8) і фільтрують через 0,45 мкм фільтр. Готують колонку з Ni^{2+} -NTA агарозою (доступна на ринку від Qiagen) з об'ємом шару, яка дорівнює 5 мл, промивають 25 мл води і врівноважують 25 мл завантажувального буфера. Відфільтрований клітинний екстракт завантажують на колонку при 0,5 мл на хвилину. Колонку промивають до базової лінії A280 завантажувальним буфером, і на цій відмітці починають збір фракцій. Далі, колонку промивають вторинним промивальним буфером (50 mM фосфату; 300 mM NaCl, 10 % гліцерину, pH 6,0), який елює неспецифічно зв'язаний білок. Після повторного досягнення базової лінії A280, колонку виявляють від 0 до 500 mM градієнтом імідазолу у вторинному промивальному буфері. Збирають фракції по одному мл і аналізують за допомогою SDS-PAGE і фарбування сріблом або Вестерн-блотингу з Ni^{2+} -NTA-кон'югованою з лужною фосфатазою (Qiagen). Фракції, що містять елюований His10-мічений ТАТ, об'єднують і діалізують проти завантажувального буфера.

Альтернативно, очищення IgG міченого (або Fc міченого) ТАТ може здійснюватися з використанням відомих хроматографічних методів, що включають, наприклад, колонкову хроматографію з білком А або білком G.

Деякі з поліпептидів ТАТ, розкритих в даній заявці, були успішно експресовані і очищені з використанням цих методу(методів).

ПРИКЛАД 16: Очищення поліпептидів ТАТ з використанням специфічних антитіл

Нативні або рекомбінантні поліпептиди ТАТ можуть бути очищені за допомогою різноманітних стандартних методів в галузі очищення білка. Наприклад, поліпептид про-ТАТ, зрілий поліпептид ТАТ, або поліпептид пре-ТАТ очищають за допомогою імуноафінної хроматографії з використанням антитіл, специфічних для поліпептиду ТАТ, що представляє інтерес. Загалом, імуноафінну колонку створюють за допомогою ковалентного сполучення антитіла проти поліпептиду ТАТ з активованою хроматографічною смолою.

Поліклональні імуноглобуліни отримують з імунної сироватки або осадженням сульфатом амонію або за допомогою очищення на іммобілізованому білку А (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Аналогічно, моноклональні антитіла отримують з асцитної рідини мишей осадженням сульфатом амонію або хроматографією на іммобілізованому Білку А. Частково очищений імуноглобулін ковалентно приєднують до хроматографічної смоли, такої як CnBr -активована SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). Антитіло сполучають зі смолою, смолу блокують, і похідну смолу промивають відповідно до інструкцій виготовника.

Таку імуноафінну колонку використовують при очищенні поліпептиду ТАТ за допомогою отримання фракції з клітин, що містять поліпептид ТАТ в розчинній формі. Цей препарат проводять за допомогою солюбілізації цільної клітини або субклітинної фракції, що отримується через диференціальне центрифугування за допомогою додавання детергенту або за допомогою інших способів, добре відомих в даній галузі. Альтернативно, розчинний поліпептид ТАТ, що містить сигнальну послідовність, може секретуватися в застосовній кількості в середовищі, в якому клітини вирощують.

Препарат, що містить розчинний поліпептид ТАТ, пропускають через імуноафінну колонку, і колонку промивають при умовах, які забезпечують переважну абсорбцію поліпептиду ТАТ (наприклад, буфери з високою іонною силою в присутності детергенту). Потім, колонку елюють при умовах, які руйнують зв'язування антитіло/поліпептид ТАТ (наприклад, буфер з низьким рН, таким як приблизно рН 2-3, або з високою концентрацією хаотропу, такого як сечовина або іон тіоціанату), і поліпептид ТАТ збирають.

Вважають, що приведений вище письмовий опис є достатнім, щоб дати можливість кваліфікованому фахівцю в даній галузі практично реалізувати винахід. Даний винахід не буде обмеженим по об'єму за допомогою збереженої побудови, оскільки збережений варіант здійснення призначений для одиначної ілюстрації деяких аспектів винаходу, і будь-які побудови, які є функціонально еквівалентними входять в об'єм домагань даного винаходу. Збереження матеріалу в даній заявці не складає допущення, що письмовий опис, що міститься в даному документі, є невідповідним, щоб забезпечити практичну реалізацію будь-якого аспекту винаходу, включаючи його найкращий режим, і не повинен розглядатися як таким, що обмежує об'єм правових домагань до конкретних ілюстрацій, який він представляє. Безсумнівно, різноманітні модифікації винаходу в доповнення до тих, що показані і описані в даній заявці, будуть очевидними для кваліфікованих фахівців в даній галузі зведеного вище опису і потрапляють в межі об'єму прикладеної формули винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> КОМПОЗИЦІЇ І СПОСОБИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ І ЛІКУВАННЯ ПУХЛИНИ

<130> P5041R1WO

<140> PCT/US2010/058197

<141> 2010-11-29

<150> US 61/384,467

<151> 2010-09-20

<150> US 61/265,262

<151> 2009-11-30

<160> 81

<210> 1

<211> 2366

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagcccagca cctgcggagg gagcgctgac catggctccc tggcctgaat 50

tgggagatgc ccagcccaac cccgataagt acctcgaagg ggccgcaggt 100

cagcagccca ctgccctga taaaagcaaa gagaccaaca aaacagataa 150

cactgaggca cctgtaacca agattgaact tctgccgtcc tactccacgg 200

ctacactgat agatgagccc actgaggtgg atgaccctg gaacctaccc 250

actcttcagg actcggggat caagtggta gagagagaca ccaaagggaa 300
 gattctctgt ttctccaag ggattgggag attgatttta ctctcggat 350
 5 ttcttactt ttctgtgtc tccctggata ttcttagtag cgccttcag 400
 ctggttgag gaaaaatggc aggacagttc ttcagcaaca gctctattat 450
 10 gtccaaccct ttgtggggc tgggatcgg ggtgctggtg accgtcttg 500
 tgcagagctc cagcacctca acgtccatcg ttgcagcat ggtgtcctct 550
 tcattgtca ctgttcgggc tgccatccc attatcatgg gggccaacat 600
 15 tgaacgtca atcaccaaca ctattgtgc gctcatgcag gtgggagatc 650
 ggagtgagtt cagaagagct ttgcaggag ccactgtcca tgactcttc 700
 20 aactggctgt ccgtgttgt gctctgccc gtggaggtg ccaccatta 750
 cctcagatc ataaccagc ttatagtga gagcttcac tcaagaatg 800
 gagaagatgc ccagatctt ctgaaagta tctaagcc cttcacaag 850
 25 ctattgtcc agctggataa aaaagttatc agccaaattg caatgaacga 900
 tgaaaaagcg aaaaacaaga gtctgtcaa gatttggtgc aaaacttta 950
 30 ccaacaagac ccagattaac gtcactgtc cctcgactgc taactgcacc 1000
 tcccctccc tctgttgac ggatggcatc caaaactgga ccatgaagaa 1050
 tgtgacctac aaggagaaca tcgcaaagc ccagcatatc ttgtgaatt 1100
 35 tccacctccc ggaactgtg gtgggcacca tctgtcat actctcctg 1150
 ctggtcctct gtggttcct gatcatgatt gtcaagatcc tgggctctgt 1200
 40 gctcaagggg caggctgcca ctgtcatca gaagaccatc aacactgatt 1250
 tccccttcc cttgcatgg ttgactggct acctggccat cctcgtcggg 1300
 gcaggcatga cctcatcgt acagagcagc tctgtgtca cgtcggcctt 1350
 45 gacccccctg attggaatc gcgtgataac cattgagagg gcttatccac 1400
 tcacgtggg ctccaacatc ggcaccacca ccaccgcat cctggccgcc 1450
 50 ttagccagcc ctggcaatgc attgaggagt tactccaga tcgccctgtg 1500
 ccacttttc tcaacatct ccggcatctt gctgtgttac ccgatcccgt 1550
 tactcgcct gccatccgc atggccaagg ggtgggcaa catctctgcc 1600
 55 aagtatcgt ggttcgccgt cttctacctg atcatctct tctctctgat 1650
 cccgctgacg gtgttgccc tctcgtggc cggctggcgg gtgctggtg 1700
 60 gtgtcgggt tccgctgtc tcatcatca tctggtact gtgcctccga 1750

ctcctgcagt ctcgctgccc acgcgtcctg ccgaagaaac tccagaactg 1800
 gaacttcctg ccgctgtgga tgcgctcgct gaagccctgg gatgccgtcg 1850
 5 tctccaagtt caccggctgc ttccagatgc gctgctgctg ctgctgccgc 1900
 gtgtgctgcc gcgctgctg cttgctgtgt ggctgcccc aagtgtgccg 1950
 10 ctgcagcaag tgctgcgagg acttgagga ggcgcaggag gggcaggatg 2000
 tcctgtcaa ggctcctgag accttgata acataacat tagcagagag 2050
 gctcaggggtg aggtccctgc ctcggactca aagaccgaat gcacggcctt 2100
 15 gtaggggacg cccagattg tcaggatgg ggggatggtc cttgagttt 2150
 gcatgctctc ctccctccca cttctgcacc cttcaccac ctcgaggaga 2200
 20 tttgtcccc attagcgaat gaaattgatg cagtcctacc taactcgatt 2250
 cccttggct tgggtggtag gcctgcaggg cactttatt ccaacccatg 2300
 gcctccatga cttttcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2350
 25 aaaaaaaaaa aaaaaa 2366

<210> 2

<211> 690

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

35 Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp
 1 5 10 15

Lys Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp
 20 25 30

40 Lys Ser Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val
 35 40 45

Thr Lys Ile Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile
 50 55 60

45 Asp Glu Pro Thr Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu
 65 70 75

50 Gln Asp Ser Gly Ile Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys
 80 85 90

Ile Leu Cys Phe Phe Gln Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu Leu
 95 100 105

55 Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser
 110 115 120

Ala Phe Gln Leu Val Gly Gly Lys Met Ala Gly Gln Phe Phe Ser
 125 130 135

60

	Asn Ser Ser Ile Met Ser Asn Pro Leu Leu Gly Leu Val Ile Gly	
	140 145 150	
5	Val Leu Val Thr Val Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser	
	155 160 165	
	Ile Val Val Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Leu Thr Val Arg Ala	
	170 175 180	
10	Ala Ile Pro Ile Ile Met Gly Ala Asn Ile Gly Thr Ser Ile Thr	
	185 190 195	
	Asn Thr Ile Val Ala Leu Met Gln Val Gly Asp Arg Ser Glu Phe	
15	200 205 210	
	Arg Arg Ala Phe Ala Gly Ala Thr Val His Asp Phe Phe Asn Trp	
	215 220 225	
20	Leu Ser Val Leu Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr	
	230 235 240	
	Leu Glu Ile Ile Thr Gln Leu Ile Val Glu Ser Phe His Phe Lys	
	245 250 255	
25	Asn Gly Glu Asp Ala Pro Asp Leu Leu Lys Val Ile Thr Lys Pro	
	260 265 270	
	Phe Thr Lys Leu Ile Val Gln Leu Asp Lys Lys Val Ile Ser Gln	
30	275 280 285	
	Ile Ala Met Asn Asp Glu Lys Ala Lys Asn Lys Ser Leu Val Lys	
	290 295 300	
35	Ile Trp Cys Lys Thr Phe Thr Asn Lys Thr Gln Ile Asn Val Thr	
	305 310 315	
	Val Pro Ser Thr Ala Asn Cys Thr Ser Pro Ser Leu Cys Trp Thr	
	320 325 330	
40	Asp Gly Ile Gln Asn Trp Thr Met Lys Asn Val Thr Tyr Lys Glu	
	335 340 345	
	Asn Ile Ala Lys Cys Gln His Ile Phe Val Asn Phe His Leu Pro	
45	350 355 360	
	Asp Leu Ala Val Gly Thr Ile Leu Leu Ile Leu Ser Leu Leu Val	
	365 370 375	
50	Leu Cys Gly Cys Leu Ile Met Ile Val Lys Ile Leu Gly Ser Val	
	380 385 390	
	Leu Lys Gly Gln Val Ala Thr Val Ile Lys Lys Thr Ile Asn Thr	
	395 400 405	
55	Asp Phe Pro Phe Pro Phe Ala Trp Leu Thr Gly Tyr Leu Ala Ile	
	410 415 420	
60	Leu Val Gly Ala Gly Met Thr Phe Ile Val Gln Ser Ser Ser Val	
	425 430 435	

	Phe Thr Ser Ala Leu Thr Pro Leu Ile Gly Ile Gly Val Ile Thr	
	440 445 450	
5	Ile Glu Arg Ala Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ser Asn Ile Gly Thr	
	455 460 465	
	Thr Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asn Ala	
	470 475 480	
10	Leu Arg Ser Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn	
	485 490 495	
	Ile Ser Gly Ile Leu Leu Trp Tyr Pro Ile Pro Phe Thr Arg Leu	
15	500 505 510	
	Pro Ile Arg Met Ala Lys Gly Leu Gly Asn Ile Ser Ala Lys Tyr	
	515 520 525	
	Arg Trp Phe Ala Val Phe Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Phe Leu Ile	
20	530 535 540	
	Pro Leu Thr Val Phe Gly Leu Ser Leu Ala Gly Trp Arg Val Leu	
	545 550 555	
25	Val Gly Val Gly Val Pro Val Val Phe Ile Ile Ile Leu Val Leu	
	560 565 570	
	Cys Leu Arg Leu Leu Gln Ser Arg Cys Pro Arg Val Leu Pro Lys	
30	575 580 585	
	Lys Leu Gln Asn Trp Asn Phe Leu Pro Leu Trp Met Arg Ser Leu	
	590 595 600	
	Lys Pro Trp Asp Ala Val Val Ser Lys Phe Thr Gly Cys Phe Gln	
35	605 610 615	
	Met Arg Cys Cys Cys Cys Cys Arg Val Cys Cys Arg Ala Cys Cys	
	620 625 630	
40	Leu Leu Cys Gly Cys Pro Lys Cys Cys Arg Cys Ser Lys Cys Cys	
	635 640 645	
	Glu Asp Leu Glu Glu Ala Gln Glu Gly Gln Asp Val Pro Val Lys	
45	650 655 660	
	Ala Pro Glu Thr Phe Asp Asn Ile Thr Ile Ser Arg Glu Ala Gln	
	665 670 675	
	Gly Glu Val Pro Ala Ser Asp Ser Lys Thr Glu Cys Thr Ala Leu	
50	680 685 690	
	<210> 3	
	<211> 91	
	<212> PRT	
55	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	
	1 5 10 15	
60		

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 20 25 30
 5 Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 50 55 60
 10 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 65 70 75
 Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 80 85 90
 15 Arg
 <210> 4
 20 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 25 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 30 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Leu
 35 40 45
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 35 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 40 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala
 95 100 105
 45 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 5
 50 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 60

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 5 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 10 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 15 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 6
 20 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 30 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 35 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 40 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 45 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 7
 50 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 60

His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 5 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 10 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 15 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 8
 20 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 30 His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 40 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 45 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 9
 50 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 60

His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 5 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 10 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 15 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 10
 20 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 30 His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 40 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 45 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 11
 50 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gly Thr Leu Arg
 20 25 30
 60

His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 5 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 10 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 15 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 12
 20 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 30 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 35 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 40 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110
 <210> 13
 50 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 55 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 60

Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Arg Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 35 40 45
 5 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 65 70 75
 10 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp
 80 85 90
 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 15 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ala
 110 115 120
 <210> 14
 20 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 30 Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 40 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 45 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 <210> 15
 50 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 60

Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 5 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 10 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 15 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 <210> 16
 20 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 30 Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 40 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 45 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 <210> 17
 50 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 60

Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 5 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ser Phe His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Val Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 10 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 15 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 <210> 18
 20 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 30 Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 40 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 45 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 <210> 19
 50 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30
 60

Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 5 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 10 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105
 15 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 <210> 20
 20 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Gly Arg Val Ala
 20 25 30
 30 Ser His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 35 40 45
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 35 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg
 65 70 75
 40 Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 80 85 90
 Val Thr Val Ser Ser
 95
 45 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 21
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
 5 10
 55 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 22

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

5 Glu

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 23
Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

15 Glu

<210> 24
20 <211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
25 Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Glu

30 <210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 25
Arg Ser Ser Gly Thr Leu Arg His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

40 Glu

<210> 26
45 <211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Arg Ser Ser Gly Thr Leu Leu His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
50 1 5 10 15

Glu

55 <210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <400> 27

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

5 Glu

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 28
Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

15 Glu

<210> 29
20 <211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
25 Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Glu

30 <210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 30
Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

40 Glu

<210> 31
<211> 16
45 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
50 Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Asn Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Glu

55 <210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <400> 32

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Lys Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

5 Glu

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 33
Arg Ser Ser Arg Thr Leu Glu His Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

15 Glu

<210> 34
20 <211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
25 Arg Ser Ser Gln Thr Leu Gln His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Glu

30 <210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 35
Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
5

40 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 36
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
5

50 <210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 37
Arg Val Ser Gln Arg Phe Thr
5

60 <210> 38
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 38
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Arg
 5 5
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr
 15 5
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 Phe Gln Gly Ser His Asn Pro Leu Thr
 5
 25 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 41
 Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr
 5
 35 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 40 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 5 10
 <210> 43
 <211> 10
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe Ala Met Ser
 50 5 10
 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Ser Ser Ser Phe Ser Asp Phe Ala Leu Ser
 60 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 45
 Gly Phe Asn Phe Arg Gly Phe Ala Met Ser
 5 10
 10
 <210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 46
 Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly
 20
 <210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 30 Met Lys Gly
 <210> 48
 35 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 40 Ala Thr Ile Gly Arg Val Ser Phe His Thr Tyr Tyr Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Met Lys Gly
 45
 <210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 49
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 55 Met Lys Gly
 <210> 50
 <211> 18
 60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50
 Ser Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr Pro Val Gly
 5 1 5 10 15

Met Thr Gly

10 <210> 51
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Trp Tyr His Arg Tyr Tyr Pro Asp Ser
 1 5 10 15

Met Val Arg

20

 <210> 52
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 52
 Gly Thr Ile Gly Trp Met Val Ser His Thr Tyr Tyr Pro Gln Arg
 1 5 10 15

30 Leu Asn Gly

 <210> 53
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

 <400> 53
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Thr Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
 1 5 10 15

Met Lys Gly

45

 <210> 54
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

 <400> 54
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Tyr Arg His Thr Tyr Tyr Pro Thr Ser
 1 5 10 15

55 Met Lys Gly

 <210> 55
 <211> 18
 <212> PRT

60

<213> Homo sapiens

<400> 55
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Pro Leu His Thr Tyr Tyr Pro Arg Ser
 5 1 5 10 15

Met Lys Gly

10 <210> 56
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 56
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Pro Leu His Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Met Lys Gly

20

 <210> 57
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 57
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Pro Leu His Thr Tyr Tyr Pro Ala Ser
 1 5 10 15

30 Met Lys Gly

 <210> 58
 <211> 18
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 58
 40 Ala Thr Ile Gly Arg Val Glu Gln His Thr Tyr Tyr Pro Gln Ser
 1 5 10 15

Met Lys Gly

45

 <210> 59
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 59
 Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser
 1 5 10 15

55 Met Lys Gly

 <210> 60
 <211> 18
 60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60
Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Leu His Thr Tyr Tyr Pro Gln Ser
5 1 5 10 15

Met Lys Gly

10 <210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 61
 Ala Arg Gly Phe Asp Tyr
 5

20 <210> 62
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 62
 Val Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe
 5 10

30 <210> 63
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 63
 Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Val Phe
 5 10

40 <210> 64
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 64
 Ala Arg His Arg Gly Trp Val Val Gly His Phe Asp Leu
 5 10

50 <210> 65
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 65
 Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe
 5 10

60 <210> 66
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 5 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
 35 40 45
 Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 10 50 55 60
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 15 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85
 <210> 67
 20 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 25 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 30 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 35 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 40 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80
 <210> 68
 <211> 80
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 50 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 55 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 5 80
 <210> 69
 <211> 79
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 20 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 25 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 65 70 75
 Thr Val Ser Ser
 30
 <210> 70
 <211> 87
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 40 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
 35 40 45
 45 Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 50 65 70 75
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85
 55 <210> 71
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 71

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 5 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 10 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 15 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80
 <210> 72
 20 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 25 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 30 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 35 50 55 60
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 40 Val Thr Val Ser Ser
 80
 <210> 73
 <211> 79
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 50 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 55 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

5

<210> 74
<211> 79
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

15 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
20 35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

25 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

30

<210> 75
<211> 79
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

40 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

45 Asn Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
50 65 70 75

Thr Val Ser Ser

55 <210> 76
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <400> 76

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 5 20 25 30
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 10 50 55 60
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 15 65 70 75
 Val Glu Ile Lys Arg
 80
 <210> 77
 20 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 30 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
 35 50 55 60
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Lys Val Glu Ile Lys
 40 80
 <210> 78
 <211> 80
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 50 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 55 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 50 55 60
 60

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

 Lys Val Glu Ile Lys
 5 80

 <210> 79
 <211> 80
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 79
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 15 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30

 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 20 35 40 45

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60
 25 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

 Lys Val Glu Ile Lys
 80
 30
 <210> 80
 <211> 449
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 80
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 20 25 30

 Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 45
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr
 50 55 60

 Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 50 65 70 75

 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 55 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly
 95 100 105

 His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 60

	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser	125	130	135
5	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys	140	145	150
	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	155	160	165
10	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	170	175	180
	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	185	190	195
15	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	200	205	210
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215	220	225
20	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	230	235	240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245	250	255
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
30	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
35	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305	310	315
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320	325	330
	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335	340	345
45	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350	355	360
	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365	370	375
50	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	380	385	390
	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	395	400	405
	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	410	415	420
60				

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
5 440 445

<210> 81
<211> 219
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 81
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

15 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
20 25 30

His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
20 35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

25 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

30 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
35 110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

40 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

45 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
50 185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

55 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло або його функціональні фрагменти, яке специфічно зв'язується з TAT211, що містить:
 - a) CDR-L1 послідовність SEQ ID NO:23,
 - b) CDR-L2 послідовність SEQ ID NO:36,
 - c) CDR-L3 послідовність SEQ ID NO:41,
 - d) CDR-H1 послідовність SEQ ID NO:43,
 - e) CDR-H2 послідовність SEQ ID NO:49, і
 - f) CDR-H3 послідовність SEQ ID NO:65.
2. Кон'югат, який специфічно зв'язує TAT211, який містить антитіло за п. 1 і агент, який інгібує ріст.
3. Кон'югат, який специфічно зв'язує TAT211, який містить антитіло за п. 1 і цитотоксичний агент.
4. Кон'югат за п. 3, де цитотоксичний агент вибраний з групи, яка складається з токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів і нуклеолітичних ферментів.
5. Кон'югат за п. 3, де цитотоксичний агент являє собою токсин.
6. Кон'югат за п. 3, де токсин вибраний з групи, яка складається з майтансиноїду і каліхеаміцину.
7. Кон'югат за п. 5, де токсин являє собою ауристатин.
8. Кон'югат за п. 7, де токсин являє собою монометилауристатин E (MMAE).
9. Кон'югат за п. 7, де токсин являє собою монометилауристатин F (MMAF).
10. Кон'югат, який специфічно зв'язує TAT211, який містить антитіло за п. 1 і MC-val-cit-PAB-MMAE.
11. Антитіло за п. 1, яке продукується в бактеріях.
12. Антитіло за п. 1, яке продукується в CHO клітинах.
13. Антитіло за п. 1, яке індукує смерть клітини раку яєчника і/або раку легень.
14. Антитіло за п. 1, яке мітять для виявлення.
15. Виділене антитіло, яке зв'язує TAT211, що містить послідовність VL SEQ ID NO:9 і послідовність VH SEQ ID NO:18.
16. Виділене антитіло, яке зв'язує TAT211, що містить послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:80 і послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:81.
17. Кон'югат, який специфічно зв'язує TAT211, який містить антитіло за п. 15 і MC-val-cit-PAB-MMAE.
18. Кон'югат, який специфічно зв'язує TAT211, який містить антитіло за п. 16 і MC-val-cit-PAB-MMAE.
19. Клітина, яка продукує антитіло за п. 1.
20. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за п. 1.
21. Спосіб ідентифікації першого антитіла, яке зв'язується з антигенним епітопом TAT211, зв'язаним з другим антитілом, де вказане друге антитіло являє собою антитіло за п. 1, вказаний спосіб включає визначення здатності вказаного першого антитіла блокувати зв'язування вказаного другого антитіла з поліпептидом TAT211, де здатність вказаного першого антитіла блокувати зв'язування вказаного другого антитіла з вказаним поліпептидом TAT211 на щонайменше 40 %, і при однакових концентраціях антитіла вказує на те, що вказане перше антитіло має здатність до зв'язування з епітопом, зв'язаним з вказаним другим антитілом.
22. Спосіб інгібування росту клітини, яка експресує поліпептид TAT211, де вказаний спосіб включає приведення в контакт вказаної клітини з антитілом за п. 1 і кон'югатом за п. 17 або 18, де зв'язування вказаного антитіла з вказаним поліпептидом TAT211 викликає інгібування росту вказаної клітини.
23. Спосіб за п. 22, де вказаний поліпептид TAT211 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2 або її позаклітинний домен.
24. Спосіб за п. 22, де вказана клітина являє собою клітину раку яєчника.
25. Спосіб за п. 22, де вказана клітина являє собою клітину раку легень.
26. Спосіб терапевтичного лікування ссавця, який має ракову пухлину, що містить клітини, які експресують поліпептид TAT211, де вказаний спосіб включає введення вказаному ссавцеві терапевтично ефективної кількості антитіла за п. 1 і кон'югата за п. 17 або 18, за допомогою чого ефективно виліковуючи вказаного ссавця.
27. Спосіб за п. 26, де вказаний поліпептид TAT211 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2 або її позаклітинний домен.
28. Спосіб за п. 26, де вказані клітини являють собою клітини раку яєчника.

29. Спосіб за п. 26, де вказані клітини являють собою клітини раку легень.
30. Спосіб визначення присутності TAT211 білка в зразку, що підозрюється на вміст вказаного білка, де вказаний спосіб включає піддання вказаного зразка впливу антитіла за п. 1 або кон'югата за п. 17 або 18 і визначення зв'язування вказаного антитіла з вказаним білком у вказаному зразку, де зв'язування антитіла з вказаним білком вказує на присутність вказаного білка у вказаному зразку.
31. Спосіб за п. 30, де вказаний зразок містить клітину, що підозрюється на експресію вказаного білка.
32. Спосіб за п. 31, де вказана клітина являє собою клітину раку легень.
33. Спосіб за п. 31, де вказане антитіло є міченим для виявлення.
34. Спосіб діагностики присутності пухлини у ссавця, що включає приведення в контакт тестованого зразка клітин тканини, отриманих від вказаного ссавця, з антитілом за п. 1 і кон'югатом за п. 17 або 18 і виявлення утворення комплексу між вказаним антитілом і TAT211 білком в тестованому зразку, де утворення комплексу вказує на присутність пухлини у вказаного ссавця.
35. Спосіб за п. 34, де вказаний тестований зразок клітин тканини отримують від індивідуума, що підозрюється на наявність ракової пухлини.
36. Спосіб за п. 35, де вказана пухлина являє собою пухлину яєчника або легені.
37. Спосіб за п. 34, де вказаний поліпептид TAT211 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2 або її позаклітинний домен.

CAGCCAGCACCTGCGGAGGGAGCGCTGACC**ATG**GCTCCCTGGCCTGAATTGGGAGATGCCAGCCCAACCC
 CGATAAGTACCTCGAAGGGGCCGCGAGGTCAGCAGCCCACTGCCCTGATAAAAGCAAAGAGACCAACAAAAC
 AGATAACACTGAGGCACCTGTAACCAAGATTGAACCTCTGCCGTCTACTCCACGGCTACACTGATAGATGA
 GCCCACTGAGGTGGATGACCCCTGGAACCTACCCACTCTTCAGGACTCGGGGATCAAGTGGTCAGAGAGAGA
 CACCAAAGGGAAGATTCTCTGTTCTTCCAAGGGATTGGGAGATTGATTTACTTCTCGGATTTCTCTACTT
 TTTGCTGTGCTCCCTGGATATTCTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGAGGAAAAATGGCAGGACAGTTCTT
 CAGCAACAGCTCTATTATGTCCAACCCCTTGTGGGGCTGGTGATCGGGGTGCTGGTGACCGTCTTGGTGCA
 GAGCTCCAGCACCTCAACGTCCATCGTTGTGAGCATGGTGTCTCTTCATTGCTCACTGTTGGGCTGCCAT
 CCCCATTATCATGGGGGCCAACATTGGAACGTCAATCACCACACTATTGTTGCGCTCATGCAGTGGGAGA
 TCGGAGTGAGTTCAGAAGAGCTTTTGCAGGAGCCACTGTCCATGACTTCTTCAACTGGCTGTCCGTGTGGT
 GCTCTTGCCCGTGGAGGTGGCCACCCATTACCTCGAGATCATAACCCAGCTTATAGTGGAGAGCTTCCACTT
 CAAGAATGGAGAAGATGCCCCAGATCTTCTGAAAGTCATCACTAAGCCCTTCACAAAGCTCATTGTCCAGCT
 GGATAAAAAAGTTATCAGCCAAATTGCAATGAACGATGAAAAAGCGAAAAACAAGAGTCTTGTCAAGATTTG
 GTGCAAACTTTTACCAACAAGACCCAGATTAAACGTCACTGTTCCCTCGACTGCTAACTGCACCTCCCTTC
 CCTCTGTTGGACGGATGGCATCCAAAATGGACCATGAAGAATGTGACCTACAAGGAGAACATCGCCAAATG
 CCAGCATATCTTTGTGAATTTCCACCTCCCGGATCTTGCTGTGGGCACCATCTTGCTCATACTCTCCCTGCT
 GGTCTCTGTGGTTGCTGATCATGATTGTCAAGATCCTGGGCTCTGTGCTCAAGGGGCAGGTGCGCACTGT
 CATCAAGAAGACCATCAACACTGATTTCCCTTTCCCTTTGCTGGTTGACTGGCTACCTGGCCATCCTCGT
 CGGGGCAGGCATGACCTTCATCGTACAGAGCAGCTCTGTGTTACGTGCGCCTTGACCCCTTGATTGGAAT
 CGGCGTGATAACCATTGAGAGGGCTTATCCACTCAGCTGGGCTCCACATCGGCACCACCACCACCGCCAT
 CCTGGCCGCCCTTAGCCAGCCCTGGCAATGCATTGAGGAGTTCACCTCAGATCGCCCTGTGCCACTTTTCTT
 CAACATCTCCGGCATCTTGCTGTGGTACCCGATCCCGTTCACTCGCCTGCCCATCCGCATGGCCAAAGGGCT
 GGGCAACATCTTGCCAAGTATCGCTGGTTGCGCGTCTTCTACCTGATCATCTTCTTCTTCTGATCCCGCT
 GACGGTGTTTGGCCTCTCGCTGGCCGGCTGGCGGGTGTGTTGTTGTTGTCGGGGTTCCCGCTGCTTCAICAT
 CATCCTGGTACTGTGCCTCCGACTCCTGCAGTCTCGCTGCCCACGCTCCTGCCGAAGAACTCCAGAAGTG
 GAACTTCCTGCCGCTGTGGATGCGCTCGCTGAAGCCCTGGGATGCCGTGCTCTCCAAGTTCACCGGCTGCTT
 CCAGATGCGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGTGTGCTGCGCGCGTGTGCTGCTGCTGTGTGGCTGCCCAAGTG
 CTGCCGCTGCAGCAAGTGTGCGAGGACTTGGAGGAGGCGCAGGAGGGGAGGATGTCCCTGTCAAGGCTCC
 TGAGACCTTTGATAACATAACCATTAGCAGAGAGGCTCAGGGTGAGGTCCCTGCCCTCGGACTCAAAGACCGA
 ATGCACGGCCTT**Tag**GGGACGCCCCAGATTGTGAGGGATGGGGGGATGGTCCCTTGAGTTTGCATGCTCTC
 CTCCCTCCCACTTCTGCACCTTTTACCACCTCGAGGAGATTGCTCCCATTAGCGAATGAAATGTATGCA
 GTCTTACCTAACTCGATTCCCTTTGGCTTGGTGGGTAGGCCTGCAGGGCACTTTTATTCCAACCCATGCGCT
 CCATGACTTTTTCAA

Фиг. 1

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTVEVDDPWNLEPTL
QDSGIKWSEKDTKGKILCFFQGGIGRLILLGLFYFFVCSLEILSSAFQLVGGKMGAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIG
VLVTVLVQSSSTSTSIIVSMVSSSLTVRAAIPIMGANIGTSITNTIVALMQVGRSEFRRAFAGATVHDFFNW
LSVLVLLPVEVATHYLEIITQLIVESFHEKNGEDAPDLLKVITKPFCKLIVQLDRKVISQIAMNDEKAKNKSIVK
IWCKTFTNKTQINVTVPSTANCTSPSLCWTGDIQNWTKMKNVTYKENIAKQHI FVNPHLPDLAVGTILLILSLLV
LCGCLIMIVKILGSLVKGQVATVIKKTINTDFPFPFAWLTYGLALLVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPILIGIGVIT
IERAYPLTLGSNIGTTTATILAAALASPGNALRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLPIRMAGLGNISAKY
RWFAYFYLIIFFLIPLTVFGLSLAGWRVLVGVGVVVFIIILVLCRLQLLQSRCPRVLPKKLQNNFPLWMRSL
KPWDVVSKFTGCFQMRCCCCRVCCACCLLCGCPKCCRCCKCEDLEEAQEGQDVPVKAPETFDNITISREAQ
GEVPASDSKTECTAL

Трансмембранні домени

амінокислоти 96-116, 136-156, 178-198, 219-239, 356-376, 372-392, 406-426,
445-465, 488-508, 523-543, 547-567, 563-583, 592-612

ділянки М-глікозилювання

амінокислоти 36-39, 136-139, 295-298, 308-311, 313-316, 321-324, 335-338,
340-343, 495-498, 520-523, 667-670

ділянки М-міристоїлування

амінокислоти 23-28, 79-84, 126-131, 131-136, 146-151, 150-155, 187-192, 191-
196, 393-398, 423-428, 460-465, 464-469, 519-524, 546-551, 634-639

4Fe-4S фередоксини, сигнатура області зв'язування заліза-сірки

амінокислоти 635-645

Сигнатура сімейства інсуліну

амінокислоти 621-635

Ka+/P±-котранспортер

амінокислоти 118-549

Фіг. 2

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mu10H1-L	D	I	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C
10H1-гpaфT	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.2B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.4B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.5B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.6B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mu10H1-L	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	L
10H1-гpaфT	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.1	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.2B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.4B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.5B	R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.6B	R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P

Fig. 3A

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
huKI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mulOH1-L	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S
10H1-гpaфr	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.2B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.4B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.5B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.6B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S

Kabat#	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
huKI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mulOH1-L	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	L	E	A	E	D	L	G	V	Y
10H1-гpaфr	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.1	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.2B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.4B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.5B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.6B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y

Фиг. 3B

Kabat#	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
huKI	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:3)
mulOH1-L	Y	C	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:4)
10H1-гpaфr	Y	C	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:5)
10H1.11	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:6)
10H1.11.1	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:7)
10H1.11.2B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:8)
10H1.11.4B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:9)
10H1.11.5B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:10)
10H1.11.6B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:11)

Фиг. 3C

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
mul0H1-H	E	V	M	L	V	E	S	G	G	G	L	V	R	P	G	G	S	L	K	V	S	C	A	A	S
10H1-гpaфr	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.2B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.4B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.5B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.6B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
hum III	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V
mul0H1-H	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	R	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T
10H1-гpaфr	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.1	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.2B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.4B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.5B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.6B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T

Fig. 4A

Kabat#	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
hum III	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
mul0H1-H	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A
10H1-гpaфr	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.1	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.2B	I	G	R	V	S	F	H	T	Y	Y	P	V	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.4B	I	G	R	V	A	F	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.5B	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.6B	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S

Kabat#	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
hum III	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	
mul0H1-H	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	S	D	D	T	A	I	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1-гpaфr	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11.1	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11.2B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.4B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.5B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.6B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R

Fig. 4B

Kabat#	97	98	99	100	A	B	...	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
hum III								F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:12)
mulOH1-H	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	L	T	V	S	A	(SEQ ID NO:13)
10H1-rpadfr	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:14)
10H1.11	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:15)
10H1.11.1	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:16)
10H1.11.2B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:17)
10H1.11.4B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:18)
10H1.11.5B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:19)
10H1.11.6B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:20)

Fig. 4C

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34
	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A (SEQ ID NO:21)
	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:22)
	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:23)
	R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:24)
	R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:25)
	R	S	S	G	T	L	L	H	N		N	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:26)
	R	S	S	E	T	L	V	H	R		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:27)
	R	S	S	E	T	L	V	H	T		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:28)
	R	S	S	E	T	L	V	H	G		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:29)
	R	S	S	E	T	L	V	H	A		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:30)
	R	S	S	E	T	L	V	H	N		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:31)
	R	S	S	E	T	L	V	H	K		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:32)
	R	S	S	R	T	L	E	H	A		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:33)
	R	S	S	Q	T	L	Q	H	W		S	G	N	T	Y	L	E (SEQ ID NO:34)

Fig. 5

Kabat#	50	51	52	53	54	55	56	
	A	A	S	S	L	E	S	(SEQ ID NO:35)
	R	V	S	N	R	F	S	(SEQ ID NO:36)
	R	V	S	Q	R	F	T	(SEQ ID NO:37)
	R	V	S	N	R	F	R	(SEQ ID NO:38)

Fig. 6

Kabat#	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	(SEQ ID NO:39)
	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	(SEQ ID NO:40)
	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	(SEQ ID NO:41)

Fig. 7

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	(SEQ ID NO:42)
	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	(SEQ ID NO:43)
	S	S	S	F	S	D	F	A	L	S	(SEQ ID NO:44)
	G	F	N	F	R	G	F	A	M	S	(SEQ ID NO:45)

Fig. 8

Kabat#	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	(SEQ ID NO:46)
	A	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	(SEQ ID NO:47)
	A	T	I	G	R	V	S	F	H	T	Y	Y	P	V	S	M	K	G	(SEQ ID NO:48)
	A	T	I	G	R	V	A	F	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	(SEQ ID NO:49)
	S	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	V	G	M	T	G	(SEQ ID NO:50)
	A	T	I	G	R	V	W	Y	H	R	Y	Y	P	D	S	M	V	R	(SEQ ID NO:51)
	G	T	I	G	W	M	V	S	H	T	Y	Y	P	Q	R	L	N	G	(SEQ ID NO:52)
	A	T	I	G	R	V	T	S	R	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	(SEQ ID NO:53)
	A	T	I	G	R	V	Y	R	H	T	Y	Y	P	T	S	M	K	G	(SEQ ID NO:54)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	Y	P	R	S	M	K	G	(SEQ ID NO:55)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	Y	P	G	S	M	K	G	(SEQ ID NO:56)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	Y	P	A	S	M	K	G	(SEQ ID NO:57)
	A	T	I	G	R	V	E	Q	H	T	Y	Y	P	Q	S	M	K	G	(SEQ ID NO:58)
	A	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	G	S	M	K	G	(SEQ ID NO:59)
	A	T	I	G	R	V	A	L	H	T	Y	Y	P	Q	S	M	K	G	(SEQ ID NO:60)

Fig. 9

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	K	101	102	
	A	R	G								F	D	Y	(SEQ ID NO:61)
	V	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	D	F	(SEQ ID NO:62)
	A	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	V	F	(SEQ ID NO:63)
	A	R	H	R	G	W	V	V	G	H	F	D	L	(SEQ ID NO:64)
	A	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	D	F	(SEQ ID NO:65)

Fig. 10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFT [-H1-] WVRQAPGQGLEWMG [-H2-] RVTITAD
TSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:66)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKAS [-H1-] WVRQAPGQGLEWM [-H2-] RVTITADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYCAR [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:67)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKAS [-H1-] WVRQAPGQGLEWM [-H2-] RVTITADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYCA [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:68)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKAS [-H1-] WVRQAPGQGLEWM [-H2-] RVTITADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYC [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:69)

QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSLTCTVSGGSVS [-H1-] WIRQPPGKGLEWIG [-H2-] RVTISVD
TSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCAR [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:70)

QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSLTCTVS [-H1-] WIRQPPGKGLEW I [-H2-] RVTISVDTSKNQF
SLKLSSTAAADTAVYYCAR [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:71)

QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSLTCTVS [-H1-] WIRQPPGKGLEW I [-H2-] RVTISVDTSKNQF
SLKLSSTAAADTAVYYCA [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:72)

QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSLTCTVS [-H1-] WIRQPPGKGLEW I [-H2-] RVTISVDTSKNQF
SLKLSSTAAADTAVYYC [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [-H1-] WVRQAPGKGLEWV [-H2-] RFTISRDN SKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYC [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:74)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [-H1-] WVRQAPGKGLEWV [-H2-] RFTISRDN SKNTF
YLQMNSLRAEDTAVYYC [-H3-] WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:75)

Fig. 11

DIQMTQSPFSSLSASVGD RVTITC [-L1-] WYQQKPKPKAPKLLI [-L2-] GVP SRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYC [-L3-] FGQGT KVEI KR (SEQ ID NO:76)

DIQMTQSPFSLSPVTFGEPAISIC [-L1-] WY LQKPGQSPQLLIY [-L2-] GVPDRFSGSGSGT
DFTLTKISRVEAEDVGVYYC [-L3-] FGQGT KVEI K (SEQ ID NO:77)

EIVLTQSPFGTL SLS PGERATLS C [-L1-] WYQQKPGQAPRLLIY [-L2-] GI PDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYC [-L3-] FGQGT KVEI K (SEQ ID NO:78)

DIQMTQSPDLSAVSLGERATINC [-L1-] WYQQKPGQP PPKLLIY [-L2-] GVPDRFSGSGSGT
DFTLTISSLQAEDVAVYYC [-L3-] FGQGT KVEI K (SEQ ID NO:79)

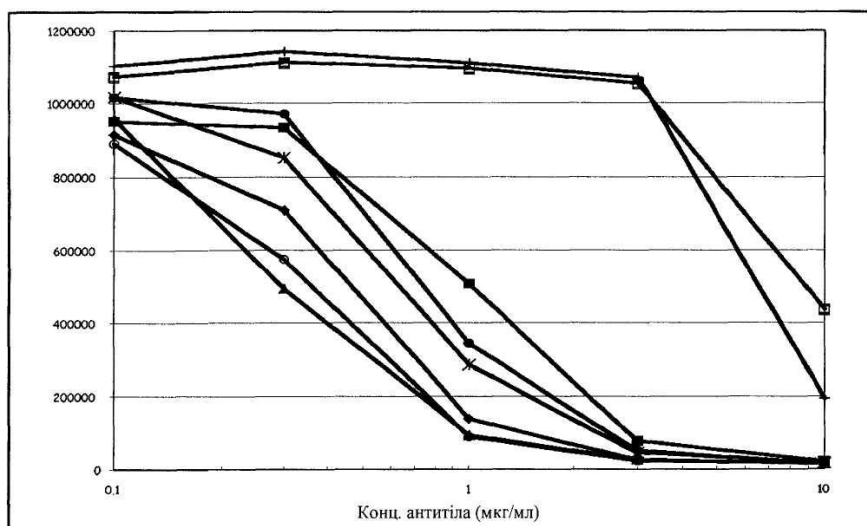
Fig. 12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSD FAMS WVRQAPGKLEWVATIGRAFTHTYYPDSMKGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGFDPVGHDFWQGT L V
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHRFSNTKVDKVEPKSCDHTHTCPFC
PAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNARTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPFPVLDSDGSEFLYISKLTVDKSRWQOGNVPSCVMHEALNNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:80)

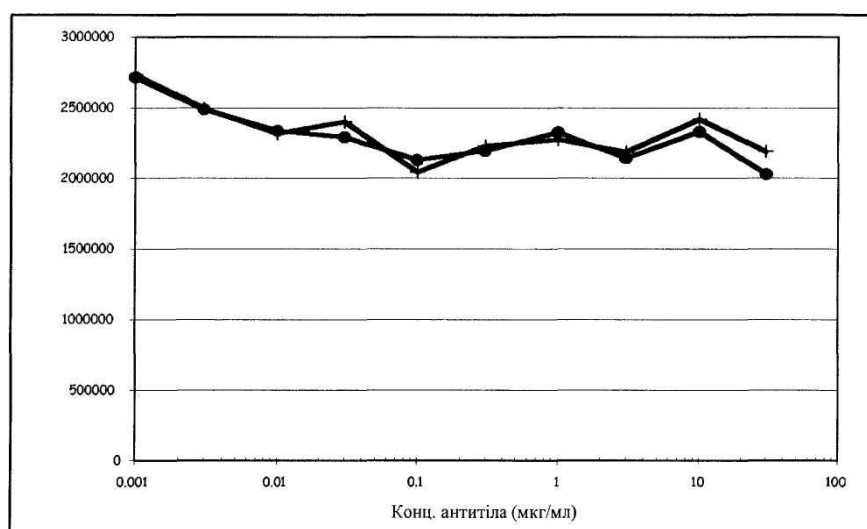
Fig. 13

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRSSSETLVHSSGNTYLEWYQKPKGAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNPLTFQGT KVEIKRTVA
APSVEIFPPSDEQLKGTASVVLNNFYPRKACVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLTITLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSFPVTKSPNRGEC (SEQ ID
NO:81)

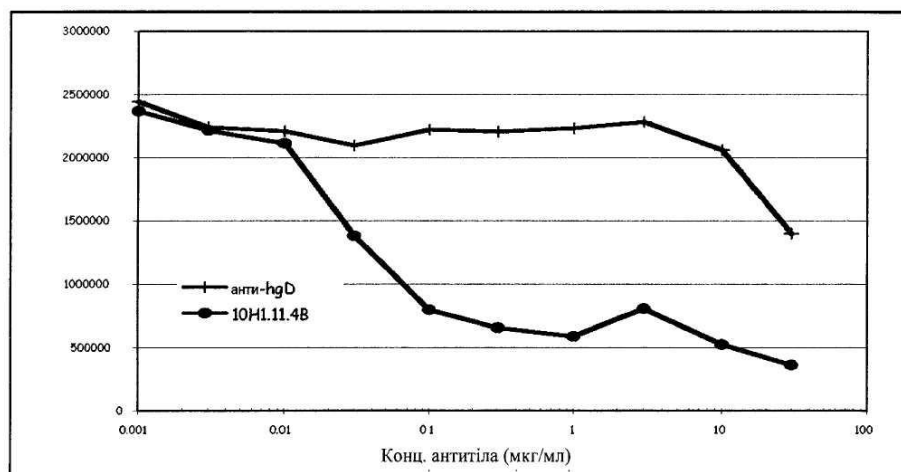
Fig. 14



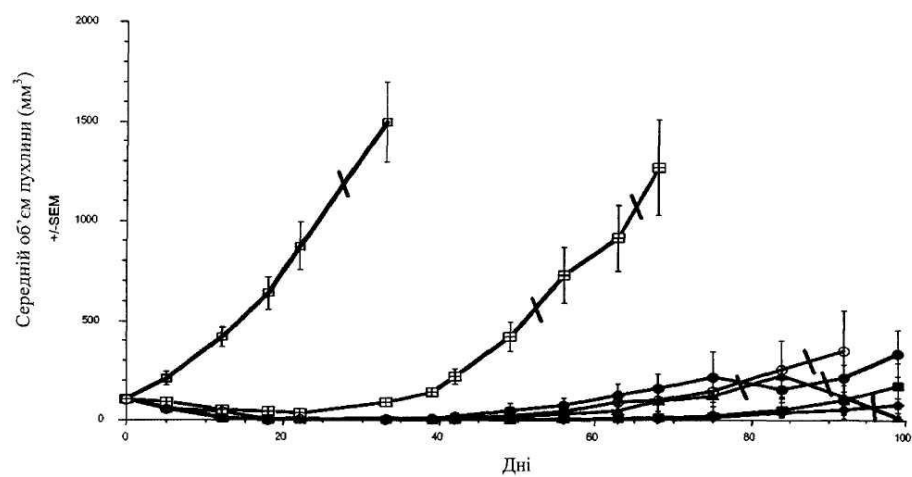
Фіг. 15



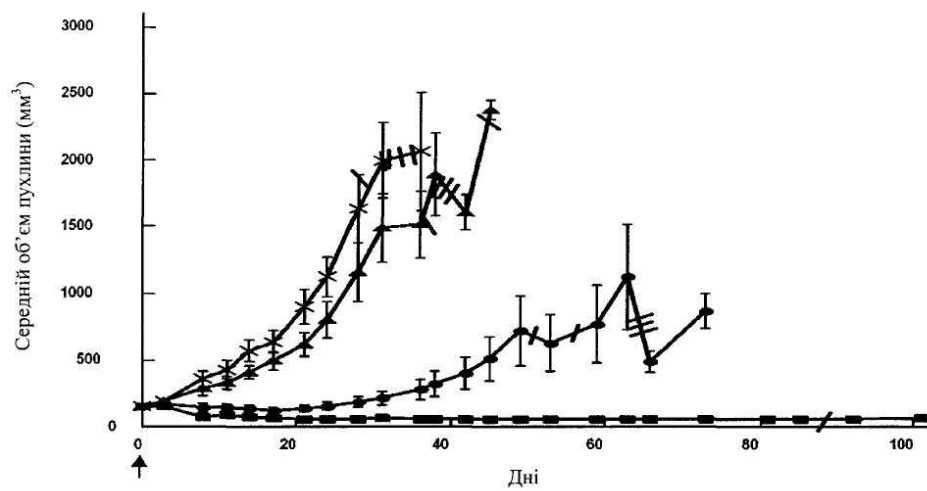
Фіг. 16



Фіг. 17



Фіг. 18



Фіг. 19

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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