



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114108** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 01025</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Моллдрем Джеффрі (US), Сергєєва Анна (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>03.07.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>БОРД ОФ РІДЖЕНТС, ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ ТЕХАС СІСТЕМ, 201 West 7th St., Austin, TX 78701, United States of America (US)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.04.2017</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/669,967, 61/702,916</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 20110293620 A1, 01.12.2011 US 20100003254 A1, 07.01.2010 US 20060167230 A1, 27.08.2006 WO 2009073163 A1, 11.06.2009 WO 2010065962 A2, 10.06.2010 Sergeeva A. et al. "An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediates complement- dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells.", BLOOD, Vol.117, no. 16, 21.04.2011, pages 4262-4272
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>10.07.2012, 19.09.2012</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву:	<b>US, US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заяву:	<b>12.10.2015, Бюл.№ 19</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.04.2017, Бюл.№ 8</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2013/049368, 03.07.2013</b>		

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В ДІАГНОСТИЦІ І ТЕРАПІЇ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН І АУТОІМУННОГО ЗАХВОРЮВАННЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується гуманізованого антитіла, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при зв'язуванні з рецептором HLA-A2, нуклеїнової кислоти, клітини-хазяїна, вектора, способу одержання та застосування вказаного антитіла для діагностики і лікування злоякісних пухлин і імунно-споріднених захворювань.

UA 114108 C2



За даною заявкою вимагається пріоритет попередньої заявки США із серійним № 61/669967, поданої 10 липня 2012 року, і 61/702916, поданої 19 вересня 2012 року, повний зміст яких включений в даний опис як посилання.

#### ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

Винахід був здійснений за підтримки Уряду грантом номер P50 CA100632, присудженим Національним інститутом раку/Національним інститутом здоров'я. Уряд має певні права на даний винахід.

##### 1. Галузь техніки винаходу

Даний винахід загалом стосується галузі злоякісних пухлин і імунотерапії. Зокрема, винахід стосується імунодіagnostичних і імунотерапевтичних антитіл для лікування і профілактики злоякісних пухлин і аутоімунного захворювання.

##### 2. Опис передумов винаходу

Імунну систему довгий час безпосередньо пов'язують з регулюванням раку; при цьому, свідчення про конкретні й ефективні імунні реакції при злоякісних пухлинах у людини є недостатніми. При хронічному мієлогенному лейкозі (CML) ні аlogenна трансплантація кісткового мозку (BMT), ні терапія інтерфероном- $\alpha 2b$  (IFN- $\alpha 2b$ ) не приводили до повної ремісії, але механізм контролю захворювання невідомий і може включати імунні протилейкозні відповіді.

На підставі даних рівня техніки вважається, що лімфоцити відіграють важливу роль в опосередкуванні протилейкозного ефекту. Дослідження показали, що інфузії алогенних донорських лімфоцитів (DLI) були використані для лікування рецидиву мієлобластного лейкозу після алогенної BMT (Giralt and Kolb, 1996; Kolb and Holler, 1997; Kolb et al., 1995; Kolb et al., 1996; Antin, 1993). Трансфузія лімфоцитів від вихідного донора кісткового мозку (BM) індукує як гематологічні, так і цитогенетичні відповіді приблизно у 70-80 % пацієнтів із хронічним мієлоцитарним лейкозом (CML) при хронічній формі (CP) (Kolb et al., 1996, Kolb and Holler, 1997). Ремісії після DLI при AML (гострий мієлобластний лейкоз), як правило, не такі тривалі, як ремісії, одержані при хронічній формі CML, що може відображати швидку кінетику пухлинного росту, що випереджає кінетику розвитку імунної відповіді. Крім того, більшість пацієнтів з мієлоїдними формами лейкозу вмирають від хвороби, якщо не проходять лікування алогенною трансплантацією кісткового мозку, при якому пов'язаний з ним ефект "трансплантат проти лейкозу" (GVL) виликовує пацієнтів. Однак, реакція "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) і пов'язана з трансплантатом токсичність обмежує таке лікування. Вважається, що GVL може бути відділений від GVHD і націлювання імунної відповіді на пов'язані з лейкозом антигени дозволить передавати пацієнтам GVL без GVHD.

Таким чином, якщо визначити більше антигенів (тобто антигени лейкозу або антигени інших видів злоякісних пухлин) і якщо одержати більшу кількість найбільш ефективних антигенспецифічних цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL), то це дозволило б розробити лейкозспецифічну терапію, терапію, специфічну для раку молочної залози й ін., використовуючи антигени як мішені для вакцин або для генерування специфічних Т-клітин для використання в адаптивній імунотерапії.

PR1, HLAА2.1-рестрикований нонамер, одержаний із протеїнази 3 (P3) і еластази, був ідентифікований як асоційований з лейкозом антиген (Molldrem et al., 2000; Molldrem et al., 1996; Molldrem et al., 1997; Molldrem et al., 1999; Molldrem et al., 2003, кожний з яких включений у даний опис як посилання в повному обсязі). Висновок про те, що PR1 являє собою пов'язаний з лейкозом антиген, був незалежно підтверджений Burchert et al. (2002) і Scheibenbogen et al. (2002). CTL, специфічних для PR1, знищують клітини AML, CML і MDS, але не нормальні клітини кісткового мозку. У дійсній фазі I/II дослідження вакцини пептид PR1 вводили пацієнтам з AML, CML і MDS, і PR1-специфічний CTL-імунітет був викликаний у 47 % пацієнтів і клінічні відповіді спостерігалися у 26 %. Таким чином, цей антиген представляє інтерес як база для подальшого дослідження протиракових імунних відповідей, а також для розробки нових терапевтичних засобів.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Таким чином, даний винахід стосується виділеного й очищеного антитіла, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO:45) у випадку зв'язування з рецептором HLA-A2, зазначене антитіло має CDR важкого ланцюга, включаючи SEQ ID NO:3, 60 і 5, і CDR легкого ланцюга, включаючи SEQ ID NO:8, 9 і 10. Антитіло може являти собою антитіло миші, одноланцюжкове антитіло, біспецифічне антитіло, злите з пептидним або поліпептидним сегментом, відмінним від пептидного або поліпептидного сегмента антитіла, зв'язаним з діагностичним реагентом (наприклад, флуорофором, хромофором, барвником, радіоактивним ізотопом, хемілюмінесцентною молекулою, парамагнітним іоном або реагентом спінової пастки), зв'язаним з терапевтичним реагентом (наприклад, цитокином, хіміотерапевтичним засобом,

радіотерапевтичним засобом, гормоном, Fc-фрагментом антитіла, агоністом TLR, CpG-вмісною молекулою або імунною костимуляторною молекулою), гуманізованим антитілом або комбінацією перерахованого вище. Біспецифічне антитіло може мати, на доповнення до афінності зв'язування з SEQ ID NO:45, афінність зв'язування з В-клітинами (CD19, CD20), NK-клітинами, фагоцитами (CD16) або моноцитами (CD14). Зокрема, гуманізоване антитіло може мати послідовності легкого ланцюга/важкого ланцюга SEQ ID NO:40 і 38 або SEQ ID NO:42 і 38 і SEQ ID NO:42 і 44.

В іншому варіанті здійснення винахід стосується нуклеїнової кислоти, що кодує CDR легкого ланцюга, кодовані SEQ ID NO:8, 9 і 10. Нуклеїнова кислота може кодувати SEQ ID NO:7 або SEQ ID NO:14 або може кодувати SEQ ID NO:25 і SEQ ID NO:27. Нуклеїнова кислота може додатково містити промоторну послідовність, розташовану в 5'-напрямку від нуклеїнової кислоти, що кодує CDR легкого ланцюга, наприклад промоторну послідовність, активну в клітинах еукаріот або клітинах прокаріот. Нуклеїнова кислота може бути розташована в реплікованому векторі, такому як вірусний вектор або вектор, відмінний від вірусного вектора. Нуклеїнова кислота може додатково містити кодуючі лінкер сегменти, де зазначені кодуючі лінкер сегменти розташовуються між зазначеними сегментами, що кодують CDR, такими як сегменти, що кодують мотив спіраль-петля-спіраль.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується штучного антитіла, яке містить кодуючий важкий ланцюг сегмент, який містить CDR, що містять послідовності SEQ ID NO:3, 60 і 5; і яке містить кодуючий легкий ланцюг сегмент, який містить CDR, що містять послідовності SEQ ID NO:8, 9 і 10. CDR можуть бути з'єднані синтетичними лінкерами. Важкий ланцюг може бути злитий з пептидним або поліпептидним сегментом, відмінним від пептидного або поліпептидного сегмента антитіла. Антитіло може бути з'єднане з діагностичним реагентом, таким як флуорофор, хромофор, барвник, радіоактивний ізотоп, хемілюмінесцентна молекула, парамагнітний іон або реагент спінової пастки. Антитіло може бути з'єднане з терапевтичним реагентом, таким як цитокін, токсин, хіміотерапевтичний засіб, радіотерапевтичний засіб, гормон, Fc-фрагмент антитіла, еластаза нейтрофілів, протеїназа 3, агоніст TLR, CpG-вмісна молекула або імунна костимуляторна молекула. Легкий ланцюг може містити SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:25 і SEQ ID NO:27, і/або важкий ланцюг містить SEQ ID NO:38 або SEQ ID NO:44.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується способу одержання антитіла, який включає (а) введення в клітину-хазяїна (i) послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг, що містить CDR з послідовностями SEQ ID NO:3, 60 і 5, і (ii) послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг, що містить CDR з послідовностями SEQ ID NO:8, 9 і 10; і (b) культивування зазначеної клітини-хазяїна в умовах, підтримуючих експресію зазначених легких і важких ланцюгів. Спосіб може додатково включати виділення зазначеного антитіла. Спосіб може додатково включати стадію з'єднання зазначеного антитіла з діагностичним або терапевтичним засобом.

У додатковому варіанті здійснення винахід стосується способу детекції патологічних клітин у зразку, що передбачувано містить патологічні клітини, який включає приведення зазначеного зразка в контакт з антитілом або штучним антитілом, як описано вище. Антитіло або штучне антитіло може бути кон'юговане з діагностичним засобом (наприклад, флуорофором, хромофором, барвником, радіоактивним ізотопом, хемілюмінесцентною молекулою, парамагнітним іоном або реагентом для спінової пастки). Антитіло або штучне антитіло може бути детектоване з використанням вторинної зв'язувальної речовини, такої як антитіло проти Fc-рецептора. Зразок може являти собою (а) пухлину тканини голови і шиї, мозку, стравоходу, молочної залози, легень, печінки, селезінки, шлунка, тонкої кишки, товстої кишки, прямої кишки, яєчників, матки, шийки матки, простати, яєчок або шкірної тканини, або (b) рідину, таку як кров, лімфа, сеча, аспірат кісткового мозку або аспірат соска. Зразок може бути взятий з резекції основи пухлини. Спосіб може додатково включати прийняття лікувального рішення на основі наявності, відсутності або ступеня детекції, наприклад рішення про лікування зазначеного індивідуума пептидною вакциною на основі PR-1. Спосіб дозволяє проводити детекцію первинних злоякісних клітин, метастатичних злоякісних клітин або мієлоїдних диспластичних клітин.

У додатковому варіанті здійснення винахід стосується способу лікування індивідуума, що має злоякісну пухлину, який включає введення зазначеному індивідууму антитіла або штучного антитіла, як описано вище. Антитіло або штучне антитіло може бути кон'юговане з терапевтичним засобом. Злоякісна пухлина може являти собою солідну пухлину, таку як пухлина голови і шиї, пухлина головного мозку, пухлина стравоходу, пухлина молочної залози, пухлина легень, пухлина печінки, пухлина селезінки, пухлина шлунка, пухлина тонкого



кишечнику, пухлина товстої кишки, пухлина прямої кишки, пухлина яєчника, пухлини матки, пухлина шийки матки, пухлина передміхурової залози, пухлина яєчка або пухлина шкіри. Злоякісна пухлина може являти собою рак крові, такий як лейкомія або лімфома. Терапевтичний засіб може являти собою цитокін, хіміотерапевтичний засіб, радіотерапевтичний засіб, гормон, Fc-фрагмент антитіла, агоніст TLR, CpG-вмісну молекулу або імунну коstimуляторну молекулу. Спосіб може додатково включати проведення у зазначеного індивідуума додаткової протипухлинної терапії, такої як генна терапія, хіміотерапія, променева терапія, гормональна терапія, токсинотерапія або хірургія. Антитіло або штучне антитіло можна вводити зазначеному індивідууму більше одного разу. Злоякісна пухлина може являти собою рецидивуючий або метастатичний рак. Антитіло можна вводити зазначеному індивідууму більше одного разу.

У ще одному додатковому варіанті здійснення винахід стосується способу лікування індивідуума, що страждає на аутоімунне захворювання, який включає введення зазначеному індивідууму антитіла або штучного антитіла, як описано вище. Аутоімунне захворювання може являти собою гранулематоз Вегенера, синдром Черга-Стросса або системний васкуліт невеликих судин. Антитіло або штучне антитіло може бути кон'юговане з терапевтичним засобом, таким як токсин або індукуючий апоптоз засіб. Спосіб може додатково включати проведення у зазначеного індивідуума другої антиаутоімунної терапії. Друга антиаутоімунна терапія може являти собою терапію протизапальними засобами. Антитіло можна вводити зазначеному індивідууму більше одного разу.

Крім того, винахід стосується способу індукції комплемент-опосередкованої цитотоксичності HLA-A2 злоякісні клітини, який включає приведення зазначеної злоякісної клітини в контакт з антитілом або штучним антитілом, як описано вище.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується способу детекції патологічних клітин у зразку, що передбачувано містить патологічні клітини, який включає приведення зазначеного зразка в контакт з антитілом або штучним антитілом, як описано вище. Антитіло або штучне антитіло може бути кон'юговане з діагностичним засобом (таким як флуорофор, хромофор, барвник, радіоактивний ізотоп, хемілюмінесцентна молекула, парамагнітний іон або реагент спінової пастки). Детекцію антитіла або штучного антитіла можна проводити з використанням вторинної зв'язувальної речовини, такої як антитіло проти Fc-рецептора. Зразок може являти собою (а) пухлину тканини голови і шиї, мозку, стравоходу, молочної залози, легень, печінки, селезінки, шлунка, тонкої кишки, товстої кишки, прямої кишки, яєчника, матки, шийки матки, простати, яєчка або шкірної тканини, або (б) рідину, таку як кров, лімфа, сеча, аспірат кісткового мозку або аспірат соска. Зразок може бути узятий з резекції основи пухлини. Спосіб може додатково включати прийняття лікувального рішення на основі наявності, відсутності або ступеня детекції, наприклад рішення про лікування зазначеного пацієнта пептидною вакциною на основі PR-1. Спосіб дозволяє проводити детекцію первинних злоякісних клітин, метастатичних злоякісних клітин або мієлоїдних диспластичних клітин.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується способу лікування індивідуума, що має злоякісну пухлину, який включає введення зазначеному індивідууму антитіла або штучного антитіла, як описано вище. Антитіло або штучне антитіло може бути кон'юговане з терапевтичним засобом, таким цитокін, хіміотерапевтичний засіб, радіотерапевтичний засіб, гормон, Fc-фрагмент антитіла, агоніст TLR, CpG-вмісна молекула або імунна коstimуляторна молекула. Злоякісна пухлина може являти собою солідну пухлину, таку як пухлина голови і шиї, пухлина головного мозку, пухлина стравоходу, пухлина молочної залози, пухлина легень, пухлина печінки, пухлина селезінки, пухлина шлунка, пухлина тонкого кишечника, пухлина товстої кишки, пухлина прямої кишки, пухлина яєчника, пухлина матки, пухлина шийки матки, пухлина передміхурової залози, пухлина яєчка або пухлина шкіри. Крім того, злоякісна пухлина може являти собою рак крові, такий як лейкомія або лімфома. Злоякісна пухлина може бути рецидивуючим або метастатичним раком. Спосіб може додатково включати проведення у зазначеного індивідуума другої антиракової терапії, такої як генна терапія, хіміотерапія, променева терапія, гормональна терапія, токсинотерапія або хірургія. Антитіло або штучне антитіло можна вводити зазначеному індивідууму більше одного разу.

У додатковому варіанті здійснення винахід стосується способу лікування індивідуума, що страждає на аутоімунне захворювання, який включає введення зазначеному індивідууму антитіла або штучного антитіла, як описано вище. Аутоімунне захворювання може являти собою гранулематоз Вегенера, синдром Чарга-Стросса або системний васкуліт невеликих судин. Антитіло або штучне антитіло може бути кон'юговане з терапевтичним засобом, таким як токсин або індукуючий апоптоз засіб. Спосіб може додатково включати проведення у

зазначеного індивідуума другої антиаутоімунної терапії, такої як терапія протизапальними засобами. Антитіло можна вводити зазначеному індивідууму більше одного разу.

Додаткові способи включають: (i) лікування індивідуума з мієлоїдним диспластичним захворюванням, що включає введення зазначеному індивідууму антитіла або штучного антитіла, описаного вище; і (ii) індукування комплемент-опосередкованої цитотоксичності злоякісної клітини HLA-A2, що включає приведення зазначеної злоякісної клітини в контакт з антитілом або штучним антитілом, описаним вище.

Hu1-8F4 і Hu2-8F4 належать до Hu8F4-1 і Hu8F4-2, відповідно. Крім того, термін "Hu8F4" у даному документі стосується, як правило, обох гуманізованих форм 8F4 (Hu8F4-1 і Hu8F4-2).

Інші об'єкти й ознаки даного винаходу стануть очевидні з наступного докладного опису. Варто розуміти, однак, що докладний опис і конкретні приклади, при указанні переважних варіантів здійснення винаходу, наведені як ілюстрація, оскільки різні зміни і модифікації без відхилення від суті й обсягу винаходу стануть очевидними для фахівця в даній галузі з цього докладного опису.

#### КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Наступні креслення складають частину даного опису і включені для додаткової демонстрації певних аспектів даного винаходу. Винахід можна краще зрозуміти при звертанні до одного або декількох з цих креслень у сполученні з докладним описом конкретних варіантів здійснення, представлених у даному документі.

Фіг. 1. Специфічність 8F4 до PR1/HLA-A2. ELISA з рекомбінантним пептидом/мономерами HLA-A2, навантаженими PR1 або аналогами PR1 з модифікованими окремими амінокислотами. Для визначення положень амінокислот у PR1-послідовності, які необхідні для оптимального 8F4-зв'язування, мономери HLA-A2 навантажували пептидами, що містять заміни аланіну в PR1 (ALA1-ALA9), що покриває ямки планшета для мікротитрування в зростаючих концентраціях. Ямки потім інкубували з 8F4 у фіксованій концентрації або контрольним антитілом bb7.2 (HLA-A\*0201 алелеспецифічне мишаче моноклональне антитіло Ig2a). Зв'язування визначали способом ELISA з використанням кон'югованих з пероксидазою козячих антимишачих антитіл. 8F4 зв'язувалося з HLA-A2, навантаженим PR1 і більшістю PR1-аналогів, значно менше зв'язувалося з аналогом ALA1 (заміна аланіну на валін у положенні 1 пептиду) і не зв'язувалося з контрольним пептидом pp65/HLA-A2. Контрольне антитіло bb7.2 зв'язувалося однаково добре з PR1- і pp65-навантаженим HLA-A2.

Фіг. 2. Афіність моноклонального антитіла 8F4 до PR1/HLA-A2. Вимірювання афіності зв'язування пептид/HLA-A2 з антитілами 8F4 і bb7.2 проводили за допомогою поверхневого плазмонного резонансу з використанням BIAcore 3000. Тестовані антитіла захоплювалися покритими антимишачими антитілами поверхнями. Аналіт, пептид/HLA-A2, розбавляли до 100 нМ і тестували в двох повторностях на зв'язування з покритими антитілами поверхнями. Аналіз проводили при 25°C з використанням PBS з 0,005 % Tween-20, 0,1 мг/мл BSA, pH 7,4, як робочого буфера. Для одержання афіності зв'язування експериментальні дані були узгоджені з кінетичною моделлю першого порядку (показано оранжевими лініями на Фігурах) і надалі визначали  $K_D$  для 8F4 і bb7.2.

Фіг. 3. Специфічність 8F4 до HLA-A2+AML. Багатопараметрична проточна цитометрія лейкемії і нормальних PBMC з 8F4 і антитілами клітинної поверхні. PBMC з AML-пацієнтів і здорових донорів стробували на живих клітинах за допомогою aqua і потім забарвлювали 8F4 (кон'югованим з ALEXA Fluor 647), bb7.2 (кон'югованим з FITC) і антитілами поверхневого фенотипу для CD13 і CD33, і аналізували способом проточної цитометрії. Використовували наступну стратегію стробування: aqua-живі клітини аналізували на експресію CD13 і CD33, і подвійні позитивні клітини аналізували на експресію PR1/HLA-A2 (8F4) і загальну HLA-A2-експресію (bb7.2). Негативний квадрант стробування був установлений за допомогою HLA-A2-негативних AML контрольних клітин.

Фіг. 4A-B. Антитіло 8F4 індукує комплементзалежну цитотоксичність (CDC) AML. Клітини-мішені промивали і ресуспендували в 10-RPMI/HEPES до концентрації  $5 \times 10^5$  клітин/мл. Двадцять мікролітрів (мкл) антитіл і 100 мкл клітин змішували і підігрівали до 37 °C у 96-ямкових планшетах, потім 20 мкл охолодженого в льоду стандартного кролячого комплементу (Cedarlane, Онтаріо, Канада) додавали і інкубували при 37 °C протягом 90 хв. Цитотоксичність визначали за допомогою Cyto-Tox Glo Cytotoxicity Assay (Promega). Антитілоспецифічну CDC (AB-CDC) розраховували як:  $AB-CDC = ((L_{C+AB} - L_{C-AB}) / (L_{max} - L_s)) \times 100 \%$ , де  $L_{C+AB}$  являє собою лізис клітини-мішені в присутності комплементу плюс антитіло;  $L_{T+C}$  являє собою лізис у присутності тільки комплементу;  $L_{spont}$  і  $L_{max}$  вимірювали до і після додавання цитотоксичного засобу дигітоніну до клітин, відповідно до інструкцій виробника. (Фіг. 4A) Інкубація з 20 мкг 8F4 індукувала комплементзалежну цитотоксичність PBMC і лейкофerezних (LP) клітин, взятих від

HLA-A2+AML пацієнтів, але не лізувала контрольні зразки PBMC від HLA-A2-негативних AML або PBMC від HLA-A2+ нормального донора. (Фіг. 4B) 8F4-опосередкований лізис HLA-A2+AML був залежним від дози антитіла, у той час як ізотипічне контрольне антитіло (Ig2a миші проти KLH) і внутрішньовенний імуноглобулін людини (комерційних IVIG) показали відсутність лізису AML.

Фіг. 5. Специфічність 8F4 до AML, але не до нормальних PBMC. Поверхнєве забарвлення AML, PBMC і T2-клітин на PR1 і HLA-A2. Клітини забарвлювали антитілом анти-PR1/HLA-A2 (8F4)-алеа-647 (червоний) і анти-HLA-A2-FITC кон'югованим (зелений), фіксували 1 % параформальдегідом, а потім вивчали за допомогою конфокальної мікроскопії. T2-клітини піддавали імпульсу PR1-пептидом (20 мкг/мл) як позитивним контролем і CMV пептидом pp65 (20 мкг/мл) як негативним контрольним пептидом. Експресія PR1/HLA-A2 видна на поверхні клітин AML і підданих PR1-імпульсу T2-клітин, але не на поверхні HLA-A2+ PBMC або підданих pp65-імпульсу T2-клітин. DAPI синій був використаний для ядерного забарвлення.

Фіг. 6. Антитіл 8F4 запобігає приживленню AML у in vivo моделі. Первинні HLA-A2+ лейкозні клітини ( $10^6$ ) відмивали, ресуспендували в PBS (100 мкл), змішували з 8F4 або контрольним ізотипічним антитілом (20 мкг) і внутрішньовенно ін'єктували в 200 сГр-опромінених HLA-A2+ трансгенних NOD/SCID мишей. Через два тижні мишей забивали, розтинали і тканини гомогенізували й аналізували на наявність лейкозних клітин способом проточної цитометрії за допомогою маркерів клітинної поверхні людини і миші. Наведені результати проточної цитометрії клітин, виділених з кісткового мозку (BM) миші. Контрольні (PBS-оброблені) і експериментальні тварини, що одержали клітини AML плюс 8F4 (AML+ антитіло 8F4), не демонстрували ніяких клітин лейкозу людини у BM. На відміну від цього тварини, що одержували клітини AML плюс контрольне антитіло (AML+ ізотипічний контроль), продемонстрували наявність клітин CD33+CD45+ людини в кістковому мозку, з таким же фенотипом, що і AML, що вводяться.

Фіг. 7. Стратегія імунізації для одержання антитіла анти-PR1/HLA-A2. Схематичне зображення молекули MHC класу I. Клас MHC складається з важкого ланцюга і ланцюга  $\beta 2$  мікроглобуліну. Пептидний антиген зв'язується з канавкою MHC-I, що фланкована  $\alpha 1$  і  $\alpha 2$  спіральними доменами ланцюга.

Фіг. 8A-B. Антитіло 8F4 запобігає приживленню AML людей у HLA-A2 Tg ксенотрансплантатної моделі. Первинні HLA-A2+AML клітини ( $10^6$ ) відмивали, ресуспендували в PBS (250 мкл), змішували з 20 мкг 8F4 або контрольного ізотипічного антитіла і внутрішньовенно вводили в сублетально опромінених (200 сГр) HLA-A2 Tg NOD/SCID мишей. У призначений час периферичну кров, кістковий мозок і тканини аналізували на наявність лейкозу за допомогою гістохімії (Фіг. 8A) і проточної цитометрії (Фіг. 8B). Опромінених мишей без передачі AML і з попередньо переданими AML клітинами використовували як негативний і позитивний контроль, відповідно. (Фіг. 8A) AML-інфільтрація в тканинах експериментальних мишей після ін'єкції клітин AML плюс 8F4 (у лівій панелі), ін'єкція клітин AML плюс контрольне ізотипічне антитіло (iso, центральна панель) і контрольні миші без передачі AML (права панель). (Фіг. 8B) Клітини AML (показана препередача, ліва панель) не детектувалися у кістковому мозку (дві верхні панелі) і периферичної крові (дві нижні панелі) контрольних і експериментальних 8F4-мишей без передачі. Миші, що одержували клітини AML, змішані з ізотипічним відповідним контрольним антитілом (iso), показали приживлення AML1 і AML5 через два або чотири тижні після передачі AML. Розширена панель, що включає специфічний маркер клітин миші (mCD45), 3-6 маркерів людини (CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, HLA-DR) і Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen), використовували для проточного цитометричного аналізу приживлення AML. Усі зображення демонструють життєздатні клітини mCD45.

Фіг. 9A-C. 8F4 індукує тимчасову (21 день) нейтропенію у HLA-A2 трансгенних NOD/SCID через експресію консервативної PR1-послідовності на HLA-A2-експресуючих гемопоетичних клітинах миші. HLA-A2 Tg NOD/SCID мишам ін'єктували 200 мкг (10 мг/кг) 8F4 або ізотипічного контрольного Ab. Ці тварини, як було показано, представляють ендогенний PR1. Через дев'ять днів клітини кісткового мозку збирали й забарвлювали mAb, направленими на антигени миші (B220-PE, Gr-1-PB, CD11b-APC, F4/80-PE-Cy7, CD3-FITC і LIVE/DEAD Fixable Aqua), і досліджували способом проточної цитометрії. (Фіг. 9A) Зниження гранулоцитів було очевидним у розсіяних профілях кісткового мозку (ліва панель). Gr-1lo незрілі нейтрофіли були присутні, але Gr-1hi зрілі нейтрофіли були менш численними в кістковому мозку 8F4-оброблених мишей (центральні панелі). Крім того, моноцити (SSC lo CD11b+; нижнє праве вікно правої панелі) були знижені у 8F4-оброблених тварин. (Фіг. 9B) Внутрішньовенна ін'єкція 8F4 (5 мг/кг) індукувала тимчасове зниження абсолютного числа циркулюючих зрілих гранулоцитів, макрофагів і моноцитів у HLA-A2 Tg NOD/SCID мишей. Через три тижні після лікування вся популяція

зберігається. Вікна, показані на фіг. 9A, були використані для визначення частоти кожного типу клітин як відсотка живих клітин. Величини помилки являли собою стандартні відхилення  $n=2$  тварин на групу. Показаний один характерний експеримент із трьох. (Фіг. 9C) Ніяких значних патологічних змін не спостерігалось в печінці, легенях, селезінці, нирках, серці або мозку HLA-A2 Tg NOD/SCID мишей через 7 днів після ін'єкцій 200 мкг (10 мг/кг) 8F4. Показані H&E зрізи характерних тканин 2 мишей.

Фіг. 10A-B. 8F4 індукує тимчасову лейкопенію створених гемопоетичних клітин людини після передачі пуповинної крові людини, збагаченої клітинами CD34+, у NOD/SCID мишей. Порції (50-150 мл) свіжої HLA-A2+ пуповинної крові (CB) обробляли фиконом за допомогою Histopaque1077, промивали PBS, потім буфером CliniMACS (0,5 % HSA у PBS, pH 7,2/1 mM EDTO, Miltenyi).  $10^8$  клітин ресуспендували в 300 мл буфера MACS, змішаного з 100 мл CD34 мікробус (Miltenyi) і інкубували при 4°C протягом 30 хвилин і промивали. Клітини CD34+, мічені магнітними бусами, очищали за допомогою колонок 2 LS (Miltenyi). Клітини CD34+ елюювали з колонки, підраховували і i.v. ін'єктували опроміненим (400 рад) NOD/SCID мишам (1-2,5 $\times 10^6$  клітин на мишу). Контрольна миша CB1-5 не одержала клітин CB. (Фіг. 10A) Починаючи з 4 тижня після трансплантації, периферичну кров мишей відбирали раз на тиждень або раз на два тижні, щоб контролювати приживлення трансплантата по пуповинній крові за допомогою FACS з використанням CD45 миші, CD45 людини і маркерів HLA. Через 9-12 тижнів після перенесення мишам i.v. ін'єктували 20 мкг (1 мг/кг) 8F4 два рази з тижневим інтервалом між ін'єкціями (пунктирні стрілки). (Фіг. 10B) Через чотири тижні після другої ін'єкції 8F4 мишей забивали. Кров, селезінку і кістковий мозок аналізували на приживлення клітин людини, як описано вище.

Фіг. 11. Схематична структура рCh8F4, рHu8F4-1, рHu8F4-2 і рHu8F4-2-AA (колективний вектор експресії). По годинниковій стрілці, починаючи від сайту Sall на вершині, плазміда містить транскрипційний блок важкого ланцюга, починаючи з основного швидкого раннього промотору, і енхансер цитомегаловірусу (CMV) людини (промотору CMV) для ініціації транскрипції гена важкого ланцюга антитіла. За CMV-промотором ідуть VH-екзон, геномна послідовність, що містить константну область важкого ланцюга гамма-1 людини, включаючи CH1, шарнір, екзони CH2 і CH3 з проміжними інтронами, і сайт поліаденілювання після CH3-екзона. Після послідовності гена важкого ланцюга починається транскрипційний блок легкого ланцюга з CMV-промотором, за яким іде VL-екзон і геномна послідовність, що містить людський екзон константної області каппа-ланцюга людини (CL) з частиною інтрона, що їй передував, і сайт поліаденілювання після CL-екзона. Ген легкого ланцюга потім іде за раннім промотором SV40 (SV40-промотор), ген ксантингуанінафосфорибозилтрансферази (gpt) E. coli і сегмент, що містить сайт поліаденілювання SV40 (полі(а) сайт SV40). Нарешті, плазміда містить частину плазмиди рUC19, що містить бактеріальну ділянку початку реплікації (рUC ori) і ген бета-лактамази ( $\beta$ -лактамази).

Фіг. 12. Вирівнювання амінокислотних послідовностей VH 8F4, VH гуманізованого 8F4 (Hu8F4) і VH людського акцепторного U96282. Амінокислотні залишки представлені у вигляді однобуквеного коду. Цифри вище послідовностей указують на положення, згідно з Kabat et al. (1991). Послідовності CDR, визначені Kabat et al. (1991), підкреслені. Залишки CDR у VH U96282 опускаються на Фігурі.

Фіг. 13. Вирівнювання амінокислотних послідовностей VL 8F4, двох версій гуманізованого VL 8F4 (VL1 і VL2 Hu8F4) і VL акцепторного AY043146 людини. Амінокислотні залишки представлені у вигляді однобуквеного коду. Цифри вище послідовностей указують на положення, згідно з Kabat et al. (1991). Послідовності CDR, визначені Kabat et al. (1991), підкреслені. Підкреслені залишки в VL1 Hu8F4, як було прогнозовано, зв'язуються з CDR і відповідний залишок миші залишався в цьому положенні в VL1 Hu8F4. CDR залишків у VL AY043146 опускаються на Фігурі.

Фіг. 14. SDS-PAGE-аналіз очищеного антитіла 8F4. Антитіла (5 мкг кожного) розганяли в 4-20 % SDS-PAGE-гелі у відновних умовах. Попередньо забарвлений стандарт SeeBluePlus2 від Invitrogen (Cat # LC5925) був використаний як стандарт молекулярних мас (смуги 1, 7 і 8). Зразки: 8F4.3.3 (доріжка 2), 8F4-4 (доріжка 3), Ch8F4 (доріжка 4), Hu8F4-1 (доріжка 5), Hu8F4-2 lot 9/9/10 (доріжка 6), Hu8F4-2 lot 1/23/11 (доріжка 9) і Hu8F4-2-AA (доріжка 10).

Фіг. 15. ELISA-аналіз зв'язування Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA з PR-1/HLA-A2. Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA тестували в різних концентраціях, починаючи з 1 мкг/мл і серійними 3-кратними розведеннями, для зв'язування з PR-1/HLA-A2.

Фіг. 16A-C. Специфічність зв'язування Hu8F4 і механізм дії. (Фіг. 16A) Тест на специфічність. (Фіг. 16B) Тест на афінність. (Фіг. 16C) CDC-аналіз.

Фіг. 17. Лікування Hu8F4 виключає встановлення AML. Аналіз визначає відсоток приживлення трансплантата AML, одержаного за 3 тижні до лікування антитілом.

Фіг. 18. 8F4 викликає оборотну панцитопенію: ефекти на нормальні гемопоетичні клітини-попередники у SCID-мишей.

Фіг. 19. 8F4 викликає оборотну панцитопенію: ефекти на нормальні клітини крові у імунокомпетентних мишей.

5 Фіг. 20A-C. 8F4 затримує ріст раку пухлини грудей і продовжують життя. (Фіг. 20A) Пухлинозв'язані нейтрофіли в 231 BrCA ксенотрансплантатних пухлинах. (Фіг. 20B) Модель первинної пухлини. (Фіг. 20C). Модель метастатичної пухлини.

10 Фіг. 21A-B. Поглинання NE і P3 клітинними лініями твердих пухлин. Клітинні лінії, що представляють солідні пухлини, інкубували з (Фіг. 21A) NE (10 мг/мл) або (Фіг. 21B) P3 (10 мг/мл), а потім пермеалізували й забарвлювали антитілами анти-NE або анти-P3. Дані представляють середнє 6 SEM кратне збільшенню поглинання NE або P3 проти клітин, що не піддавалися імпульсу, від ямок у трьох повторностях від двох незалежних експериментів. MDA-MB-231, карцинома молочної залози; MIA PaCa-2, карцинома підшлункової залози; Mel 624 і Mel 526, меланоми; OVCAR3, аденокарцинома яєчника; SW-620, аденокарцинома товстої кишки.

15 Фіг. 22A-D. Рак молочної залози ендогенно не експресує P3. мРНК екстрагували з (Фіг. 22A) лінії клітин раку молочної залози і (Фіг. 22B) первинної тканини раку молочної залози. ЗТ-ПЛР проводили з використанням праймерів P3, що показує відсутність експресії мРНК P3 у клітинних лініях раку молочної залози і первинному раку молочної залози. Клітинна лінія Jurkat і лейкозна клітинна лінія HL-60 були використані як негативний і позитивний контролю, відповідно. Клітини 20 первинного раку молочної залози з тканин пацієнта, зразки з молочної залози 1-3, були одержані шляхом LCM-представлення на пухлині, одержаній від пацієнтів під час хірургічної резекції. Мамаглобін-1 (MGB-1) був використаний для підтвердження аналізу клітин раку молочної залози.  $\beta$ -актин і GAPDH використовували як контроль навантаження. (Фіг. 22C) Імуноблоти демонструють відсутність білка P3 у WCL з п'яти різних клітинних ліній раку 25 молочної залози. Гелі були навантажені 20 мг білка. Очищений P3 (5 мг) використовували як позитивний контроль і GAPDH використовували як контроль навантаження. (Фіг. 22D) Імуноблот, що показує відсутність P3 у тканині молочної залози пацієнта (молочна залоза 3). Ліва панель, зріз H&E (початкове збільшення 3200), що показує погано диференційовану карциному з домішкою нейтрофілів. Права панель, Імуногістохімічне забарвлення на P3 показує 30 позитивне забарвлення P3 (коричневий) у домішаних нейтрофілах, але не в клітинах раку молочної залози. Вставка (початкове збільшення 3400) показує рідку пухлинну клітину, що поглинає нейтрофіл. Обидва зображення одержані з одного і того ж пацієнта і є типовими для п'яти тканин. Стрілки вказують нейтрофіли.

35 Фіг. 23A-C. P3 поглинається клітинними лініями раку молочної залози і локалізується в лізосомальних компартментах. (Фіг. 23A) Лінії клітин MDA-MB-231, MCF-7 і MCF-7-HER18 інкубували з розчинним P3 (10 мг/мл) протягом 1, 4 і 24 год., а потім внутрішньоклітинно забарвлювали за допомогою анти-P3 Ab. MFI вимірювали для експериментальних груп у трьох повторностях і нормували MFI клітин, що не піддавалися імпульсу. Кратне збільшення в MFI у 40 порівнянні з клітинами, що не піддавалися імпульсу, наноситься на у-вісь. Дані означають 6 стандартних похибок середнього і представляють два незалежних експерименти. (Фіг. 23B) Клітини MDA-MB-231 інкубували зі зростаючими дозами розчинного P3 або OVA (ova) і аналізували способом проточної цитометрії на внутрішньоклітинне поглинання P3 або OVA за допомогою антитіл анти-P3 або анти-OVA, відповідно. Дані означають 6 стандартних похибок 45 середнього від повторюваних експериментів. (Фіг. 23C) Клітини MDA-MB-231 культивували з розчинними P3 (10 мг/мл) і потім забарвлювали внутрішньоклітинно для P3 (червоний) і LAMP-2 (зелений). Зображення конфокальної мікроскопії демонструють локалізацію P3 у лізосомальних компартментах через 4 год. після поглинання, що показано шляхом накладення зображень (жовтий). Ядра здаються синіми за рахунок DAPI. Масштабні лінійки, 5 мм.

50 Фіг. 24A-F. Поглинання P3 і крос-представлення P3 і NE збільшує сприйнятливість раку молочної залози до знищення за допомогою PR1-CTL і анти-PR1/HLA-A2. (Фіг. 24A) Клітини MDA-MB-231 раку молочної залози інкубували з розчинними P3, опроміненими PMN або PBMC протягом 4 год. Клітини пермеалізували, забарвлювали анти-P3 Ab і аналізували способом проточної цитометрії. Для клітинно-зв'язаного поглинання, розсіювання світла спостерігається 55 на проточній цитометрії за умови чіткої відмінності між клітинами PBMC, PMN і MDA-MB-231. PBMC і PMN самі по собі використовувалися як негативний і позитивний контролю, відповідно. ANOVA з наступним Tukey-тестом проводили з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*p, 0,05). Дані являють собою середні значення 6 СПС для повторюваних експериментів. (Фіг. 24B) Клітини MDA-MB-231 раку молочної залози культивували з розчинними P3 або NE (10 60 мг/мл) зі збільшенням часових точок і потім аналізували експресію PR1/HLA-A2. Середнє значення 6 СПС кратного збільшення MFI PR1/HLA-A2 проти клітин, що не піддавалися

імпульсу, наведене з повторюваних експериментів. ANOVA з наступним Tukey-тестом проводили з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*p=0,01, \*\*p=0,0001). (Фіг. 24C-D) Клітини MDA-MB-231 культивували протягом 24 год. у середовищі, що містить NE або P3 (10 мг/мл) і інгібітори Ag-представлення брэфелдин або лактацистин. Клітини потім аналізували на експресію PR1/HLA-A2. Середнє значення 6 СПС MFI PR1/HLA-A2 показане для повторюваних ямок типового експерименту. ANOVA з наступним Tukey-тестом проводили з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*p=0,01, \*\*p=0,0001). (Фіг. 24E) Клітини MDA-MB-231 культивували протягом ночі в середовищах, що містять P3 або NE (10 мг/мл), навантажених кальцеїном-AM, а потім спільно культивували з PR1-CTL протягом 4 год. Цитотоксичність визначали шляхом вимірювання вивільненого кальцеїну-AM. NE- або P3-імпульсні клітини демонструють більш високий рівень знищення проти клітин MDA-MB-231, що не піддавалися імпульсу. PR1-імпульсні і клітини T2, що не піддавалися імпульсу, використовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Дані являють собою середні значення 6 СПС для повторюваних ямок типового експерименту. (Фіг. 24F) Клітини MDAMB-231 культивували з NE (10 мг/мл) або P3 (10 мг/мл) протягом 24 год. Клітини інкубували з анти-PR1/HLA-A2 (8F4) Ab протягом 60 хв., а потім додавали комплемент. Комплементзалежну цитотоксичність вимірювали за допомогою вивільнення кальцеїну-AM і показує конкретні знищення NE- або P3-імпульсних клітин MDA-MB-231 за допомогою 8F4 Ab. Дані по цитотоксичності являють собою середні значення 6 СПС для повторюваних ямок типового експерименту. Непарний t-тест був проведений з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*p=0,05).

Фіг. 25A-D. PR1/HLA-A2 і PR1-CTL детектуються у пацієнтів з раком молочної залози і меланою. (Фіг. 25A) Резектовані тканини раку молочної залози HLA-A2+-пацієнти (молочні залози 1 і 4) забарвлювали анти-PR1/HLA-A2 (8F4)-647 (червоний) і анти-CK7-FITC (зелений), і потім відображали за допомогою конфокальної лазерної мікроскопії. Виявилось, що PR1/HLA-A2 експресується клітинами раку молочної залози, що показано спільним забарвленням 8F4 з CK7. DAPI-синій використовували для забарвлення ядер клітин. (Фіг. 25B) Послідовні зрізи резектованої HLA-A2+-тканини раку молочної залози забарвлювали анти-CD45-647 (червоний) (ліва панель) або анти-CK7-FITC (зелений) і 8F4-647 (червоний) (права панель), а потім відображали за допомогою конфокальної лазерної мікроскопії. PR1/HLA-A2 експресується клітинами раку молочної залози (8F4+/CK7+) в областях, що містять мінімальну кількість лейкоцитів (CD452), тим самим підтверджуючи експресію PR1/HLA-A2 клітинами раку молочної залози. DAPI-синій використовували для забарвлення ядер клітин. (Фіг. 25C) Графік з боксами і "вусиками" показує PR1-CTL у периферичній крові від HLA-A2+-пацієнтів з раком молочної залози (n=11), меланою (n=7) і здорових (n=9) HLA-A2+-донорів. Mann-Whitney U-тест проводили з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*p=0,05). (Фіг. 25D) Резектовані тканини HLA-A2+ (меланоми 1) і HLA-A22 (меланоми 2) пацієнтів забарвлювали 8F4-647 (червоний) і анти-MITF-FITC (зелений), і потім відображали за допомогою конфокальної лазерної мікроскопії. Виявилось, що PR1/HLA-A2 експресується в зразку HLA-A2+ меланоми (меланоми 1), що показано спільним забарвленням 8F4 з MITF. DAPI-синій використовувався для забарвлення ядер клітин. Масштабні лінійки, 20 мм.

Фіг. 26A-F. Крос-представлення P3 і NE клітинами меланоми збільшує сприйнятливість до PR1-CTL. (Фіг. 26A) Подвійне забарвлення NE (коричневий) і MITF (рожевий) або (Фіг. 26B) P3 (коричневий) і MITF (рожевий) у зразках від пацієнтів з первинною меланою показує відсутність NE і P3 у меланомі. Зображення були одержані при початковому збільшенні 3100. Вставка, початкове збільшення 3400, показує розкидані NE- або P3-позитивні клітини, які, швидше за все, є запальними клітинами. (Фіг. 26C) Вестерн-блот, що показує відсутність NE і P3 у клітинних лініях меланоми. Лейкозну клітинну лінію U-937 використовували як позитивний контроль для NE і P3. Тубулін використовували як контроль навантаження. M=маркер молекулярних мас. (Фіг. 26D-E) Лінію клітин меланоми 526 HLA-A2+ культивували з розчинними NE (10 мг/мл) або P3 (10 мг/мл) зі збільшенням часових точок і потім аналізували (Фіг. 26D) поглинання NE і P3 і (Фіг. 26E) крос-представлення (тобто експресію PR1/HLA-A2). -Кратне збільшення MFI NE або P3 (Фіг. 26D), або PR1/HLA-A2 (Фіг. 26E) проти не підданих імпульсу клітин показане на осі y. ANOVA з наступним Tukey-тестом проводили з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*\*p=0,0001, \*p=0,05). Дані представляють середнє значення 6 СПС для повторюваних експериментів. (Фіг. 26F) Кальцеїн-AM-аналіз на цитотоксичність показує знищення NE (10 мг/мл) і P3 (10 мг/мл) 24 год.-імпульсованих клітин меланомної лінії 526 HLA-A2+ за допомогою PR1-CTL проти не підданих імпульсу (Unp) Mel 526. Не піддані імпульсу (T2 Unp) і PR1-імпульсні (T2 PR1) T2-клітини були використані як негативний і позитивний контролю, відповідно. Дані являють собою середні значення 6 СПС для

повторюваних ямок типового експерименту. Непарний t-тест був проведений з використанням програмного забезпечення Prism 5.0 (\*p=0,05).

#### ОПИС ІЛЮСТРАТИВНИХ ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ

PR-1 внутрішній пептид (VLQELNVTV; SEQ ID NO:45), як було показано, розпізнається на мембраноекспресованому HLA-A\*0201 лейкозної клітини за допомогою CD8+ цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL), і PR1-специфічні CTL специфічно лізують клітини мієлоїдного лейкозу, але не нормальні клітини кісткового мозку. Вакцинація HLA-A2+-пацієнтів з AML, CML і MDS PR1-пептидом індукувала PR-1-CTL-імунітет у 58 % пацієнтів і реальні клінічні відповіді у 13 з 66 (20 %) пацієнтів. Хоча ці результати є обнадійливими, високе пухлинне навантаження залишається бар'єром для успішної вакцинації.

На основі того, що PR1-пептид експресується в достатній кількості тільки на поверхні клітин мієлоїдної лейкемії, а не на нормальних клітинах кісткового мозку, автори винаходу намагалися розробити антитіла, націлені на PR1/HLA-A\*0201, які можуть бути використані в терапевтичних цілях для лікування пацієнтів з мієлоїдним лейкозом або які могли б бути використані для визначення того, які пацієнти можуть бути чутливі до імунотерапії на основі PR1, наприклад вакцини або адоптивна Т-клітинна передача. Оскільки HLA-A2+ є найбільше часто експресованою алеллю HLA (40 % загального населення білої європеїдної раси), терапія на основі антитіл до Т-клітинного епітопа, унаслідок цього, була б новою і могла б мати широке застосування. Шляхом імунізації імунотермічних мишей BALB/c рекомбінантними мономерами PR1/HLA-A\*0201, заявники одержали моноклональне антитіло IgG2a-kappa (8F4) зі специфічністю до комбінованого епітопа PR1/HLA-A\*0201. Антитіло 8F4, як було показано, має високу афінність до PR1/HLA-A\*0201 ( $K_D=9,9$  наноомів) і, як було показано, розпізнає тільки PR1-імпульсні Т2-клітини-мішені, але не контрольні пептид-імпульсні клітини. 8F4 зв'язується з HLA-A2+AML за допомогою як FACS, так і конфокальної мікроскопії для мічення клітин, але не з нормальними клітинами периферичної крові HLA-A2+.

Крім того, 8F4 індукувало дозозалежну комплемент-опосередковану цитотоксичність (CDC) HLA-A2+ первинного лейкозу людини, але не нормальних клітин кісткового мозку. По суті, антитіло 8F4 специфічно запобігало приживленню AML людини в HLA-A2 трансгенній NOD/SCID тваринній моделі з однократним лише впливом антитіла під час адоптивної передачі у тварину. Крім того, 8F4 затримує ріст пухлини раку молочної залози і збільшує тривалість життя, незважаючи на той факт, що P3 і NE не експресуються в клітинах раку молочної залози. Узяті разом, ці результати показують, що створене антитіло зі специфічністю до клітинного мембранозв'язаного PR1/HLA-A\*0201 епітопа, важливого Т-клітинного антигену-мішені, що специфічно виявляє і знищує людські лейкози і солідні пухлини.

#### I. Визначення

Вираз "виділений" або "біологічно чистий" стосується речовини, яка значною мірою або по суті не містить компонентів, звичайно супутніх речовині в той час як вона знаходиться у своєму нативному стані. Таким чином, виділені пептиди відповідно до винаходу, переважно, не містять речовин, що звичайно зв'язані з пептидами в їх навколишньому середовищі *in situ*.

"Головний комплекс гістосумісності" або "MHC" являє собою кластер генів, що відіграють роль у контролі клітинних взаємодій, відповідальних за фізіологічні імунні реакції. В організмі людини комплекс MHC також відомий як комплекс HLA. Для докладного опису комплексів MHC і HLA дивіться Paul (1993).

"Лейкоцитарний антиген людини" або "HLA" являє собою білок класу I або класу II головного комплексу гістосумісності (MHC) людини (див., наприклад, Stites, 1994).

"Супертип або сімейство HLA", як використовується в даному описі, описує набори молекул HLA, згрупованих на основі загальних пептидзв'язувальних специфічностей. Молекули HLA класу I, які розділяють до деякої міри подібну афінність зв'язування з пептидами, що несуть визначені амінокислотні мотиви, згруповані в супертипи HLA. Терміни суперсімейство HLA, HLA-сімейство супертипів, сімейство HLA і молекули HLA-xx-подібного супертипу (де xx позначає конкретний тип HLA) є синонімами.

Термін "мотив" стосується структури залишків у пептиді визначеної довжини, звичайно пептиді довжиною приблизно від 8 до приблизно 13 амінокислоти для мотиву HLA класу I і приблизно від 6 до приблизно 25 амінокислоти для мотиву HLA класу II, який розпізнається конкретно молекулою HLA. Пептидні мотиви, як правило, є різними для кожного білка, кодованого кожною алеллю HLA людини, і відрізняються в структурі первинного і вторинного ядрних залишків.

"Патологічна клітина" являє собою будь-яку клітину, яка, як вважається, має характеристики, притаманні для цього типу клітин, у тому числі атипичний ріст, типовий ріст в атипичному

розташуванні або типову дію відносно атиполої мішені. Такі клітини включають злоякісні клітини, доброякісні гіперпластичні або диспластичні клітини, запальні клітини або аутоімунні клітини.

## II. PR-1- і HLA-рестрикція

### A. PR-1

5 Внутрішній пептид PR-1 (VLQELNVTV; SEQ ID NO:45) є похідним протеїнази 3 (P3) і еластази нейтрофілів (NE), кожна з яких аберадно експресується при лейкозі. Було показано, що він розпізнається на мембраноекспресованому HLA-A\*0201 лейкозної клітини CD8+ цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTL). PR-1-специфічні CTL специфічно лізують мієлоїдний лейкоз, у тому числі гострий мієлогенний лейкоз (AML), хронічний мієлогенний лейкоз (CML) і мієлодиспластичний синдром (MDS), але не нормальні клітини кісткового мозку. Раніше, автори винаходу показали, що PR-1-вакцинація HLA-A2+-пацієнтів з AML, CML і MDS PR1-пептидом у Montanide ISA-51- і GM-CSF-індукувала PR-1-CTL-імунітет у 58 % пацієнтів і об'єктивні клінічні відповіді у 13 з 66 (20 %) пацієнтів.

### B. HLA-A2

15 Лейкоцитарна антигенна система (HLA) людини являє собою назву головного комплексу гістосумісності (MHC) в організмі людини. Суперлокус містить велику кількість генів, пов'язаних з функцією імунної системи в організмі людини. Ця група генів знаходиться на 6-ій хромосомі і кодує білки, що представляють антиген клітинної поверхні, і багато інших генів. Білки, кодовані визначеними генами, також відомі як антигени, як результат їх історичного відкриття як факторів при пересадженні органів. Основні антигени HLA є суттєвими елементами імунної функції. Різні класи мають різні функції.

20 Антигени HLA класу I (A, B і C) представляють пептиди внутрішньої частини клітини (у тому числі і вірусні пептиди при наявності). Ці пептиди утворюються з розщеплених білків, які розщеплюються в лізосомах. Пептиди, як правило, являють собою невеликі полімери довжиною близько 9 амінокислот. Чужорідні антигени залучають кілерні Т-клітини (також називані CD8+-клітини), що руйнують клітини. Антигени HLA класу II (DR, DP і DQ) представляють антигени з зовнішньої сторони клітини Т-лімфоцитам. Ці специфічні антигени стимулюють Т-хелперні клітини до відтворення, і ці Т-хелперні клітини потім стимулюють продукує антибіла В-клітини, внутрішні антигени пригнічуються супресорними Т-клітинами.

30 HLA-A2 (A2) являє собою серотип лейкоцитарного антигену людини в межах серотипної групи HLA-A "A". Серотип ідентифікує генні продукти багатьох HLA-A\*02-алелей, у тому числі генні продукти HLA-A\*0201, \*0202, \*0203, \*0206 і \*0207. A\*02 є більш розповсюдженим, однак A\*0201 зустрічається з високою частотою в Північній Азії і Північній Америці. A2 є найбільш різноманітним серотипом, показуючи різноманітність у Східній Африці і Південно-Західній Азії. Незважаючи на те, що частота A\*0201 у Північній Азії є високою, її різноманітність обмежена менш розповсюдженими азіатськими варіантами A\*0201-\*0203,\*0206.

35 Серотип визначається за допомогою розпізнавання антибілом  $\alpha^2$ -підмножини HLA-A  $\alpha$ -ланцюгів. Для A2,  $\alpha$  "A" ланцюг кодується групою HLA-A\*02-алелей, а  $\beta$ -ланцюг кодується локусом B2M. A2 і A\*02 практично є синонімами за змістом. A2 є більш розповсюдженим у Північній Азії і Північній Америці, ніж в інших країнах, і він є частиною декількох довгих гаплотипів.

### III. Антибіла

Даний винахід стосується продукції і використання антибіл, які зв'язуються з PR1 у контексті презентації HLA-A2. Антибіла здатні до "специфічного зв'язування" з конкретною мішенню або серією антигенно споріднених мішеней. Як використовується в даному документі, антибіла, як говорять, здатне до "специфічного зв'язування" з антигеном, якщо антиген відрізняється від антигенно різних молекул по зв'язуванню з варіабельною областю антибіла. Такі взаємодії відрізняються від неспецифічного зв'язування, що включає класи сполук, незалежно від їх хімічної структури (наприклад, зв'язування білків з нітроцелюлозою і ін.). Зокрема, антибіла за даним винаходом може виявляти "високоспецифічне зв'язування" таким чином, що воно буде нездатне або практично нездатне зв'язуватися навіть із близькоспорідненими молекулами.

Моноклональні антибіла можуть бути легко одержані за допомогою добре відомих способів, таких, які наведені як приклад у патенті США № 4196265, включеному в даний опис як посилання. Як правило, методика передбачає першу імунізацію придатної тварини вибраним антигеном (наприклад, поліпептидом або полінуклеотидом за даним винаходом) способом, достатнім для забезпечення імунної відповіді. Гризуни, такі як миші і щури, є переважними тваринами. Клітини селезінки імунізованих тварин потім зливають з клітинами безсмертної мієломної лінії. Успішні злиття потім перевіряють на продукцію відповідних антибіл.

60 В одному з варіантів здійснення молекули антибіла містять фрагменти (такі як F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>), які одержуються, наприклад, при протеолітичному розщепленні mAb, або одноланцюжкові



імуноглобуліни, які одержуються, наприклад, за допомогою рекомбінантних засобів. Такі похідні антитіл є одновалентними. В одному з варіантів здійснення, такі фрагменти можуть бути об'єднані один з одним або з іншими фрагментами антитіл або рецепторними лігандами з утворенням "химерних" молекул зв'язування. По суті, такі химерні молекули можуть містити

5 заміщувальні групи, здатні зв'язуватися з різними епітопами однієї і тієї ж молекули, або вони можуть бути здатні зв'язуватися з активованим епітопом протеїну С і неактивованим епітопом протеїну С.

Якщо антитіла або їх фрагменти призначені для лікувальних цілей, то бажано "гуманізувати" їх для ослаблення будь-якої імунної реакції. Такі гуманізовані антитіла можуть бути вивчені в

10 контексті *in vitro* або *in vivo*. Гуманізовані антитіла можуть бути одержані, наприклад, шляхом заміни імуногенної частини антитіла відповідною, але не імуногенною частиною (тобто химерні антитіла). Заявка PCT PCT/U.S. 86/02269; заявка EP 184187; заявка EP 171496; заявка EP 173494; заявка PCT WO 86/01533; заявка EP 125023; Sun et al. (1987); Wood et al. (1985); Shaw et al. (1988); кожна з яких включена в даний опис як посилання. Загальні огляди "гуманізованих"

15 химерних антитіл наведені в статті Morrison (1985); також включена в даний опис як посилання). "Гуманізовані" антитіла також можуть бути одержані шляхом заміщення CDR або CEA. Jones et al. (1986); Verhoeven et al. (1988); Beidler et al. (1988); кожне з посилань включене в даний опис як посилання.

#### A. Варіанти

Нижче наведене обговорення, яке стосується зміни амінокислот білка для одержання модифікованого білка. В одержанні таких заміни може розглядатися індекс гідрофобності амінокислот. Важливість індексу гідрофобності амінокислот у наданні інтерактивної біологічної

20 функції білку звичайно ясна в даній галузі (Kyte and Doolittle, 1982). Прийнято вважати, що відносний гідрофобний характер амінокислоти додає внесок у вторинну структуру одержуваного в результаті білка, що, у свою чергу, визначає взаємодію білка з іншими молекулами, наприклад ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антитілами, антигенами і тому подібним.

З рівня техніки також відомо, що заміну подібних амінокислот можна ефективно виконувати на основі гідрофільності. У патенті США № 4554101, наведеному у даному описі як посилання, описано, що найбільша локальна середня гідрофільність білка, яка регулюється гідрофільністю

30 сусідніх амінокислот, корелює з біологічною властивістю білка. Як описано в патенті США № 4554101, амінокислотним залишкам були надані наступні значення гідрофільності: основні амінокислоти: аргінін (+3,0), лізин (+3,0) і гістидин (-0,5); кислі амінокислоти: аспарагінова кислота (+3,0±1), глутамінова кислота (+3,0±1), аспарагін (+0,2), глутамін (+0,2); гідрофільні, неіонні амінокислоти: серин (+0,3), аспарагін (+0,2), глутамін (+0,2), треонін (-0,4), сірковмісні

35 амінокислоти: цистеїн (-1,0) і метіонін (-1,3); гідрофобні, неароматичні амінокислоти: валін (-1,5), лейцин (-1,8), ізолейцин (-1,8), пролін (-0,5±1), аланін (-0,5) і гліцин (0); гідрофобні ароматичні амінокислоти: триптофан (-3,4), фенілаланін (-2,5) і тирозин (-2,3).

Зрозуміло, що амінокислота може бути замінена іншою амінокислотою, яка має аналогічну гідрофільність і продукує біологічно або імунологічно модифікований білок. При таких змінах

40 заміна амінокислот зі значеннями гідрофільності в межах  $\pm 2$  є переважною, амінокислота з гідрофільністю в межах  $\pm 1$  є особливо переважною і амінокислота з гідрофільністю в межах  $\pm 0,5$  ще більш переважною.

Як зазначено вище, амінокислотні заміни, як правило, основані на відносній подібності бічного ланцюга амінокислот-замісників, наприклад їх гідрофобності, гідрофільності, заряду,

45 розміру і т. п. Типові заміни, що враховують різні вищевказані характеристики, добре відомі фахівцям у даній галузі і до них належать аргінін і лізин; глутамінова й аспарагінова кислоти; серин і треонін; глутамін і аспарагін; і валін, лейцин і ізолейцин.

У даному винаході також може використовуватися застосування пептидних міметиків при одержанні поліпептидів (див., наприклад, Johnson, 1993), що мають багато які з природних

50 властивостей антитіла, але зі зміненими і/або поліпшеними характеристиками. Розумним обґрунтуванням використання міметиків є те, що пептидний кістяк білків існує в основному для орієнтації бічних ланцюгів амінокислот так, щоб полегшити молекулярні взаємодії, наприклад, антитіла й антигену. Ці принципи можуть бути використані, у сполученні з принципами, викладеними вище, при конструюванні молекул другого покоління, що мають велике число

55 природних властивостей антитіла, але зі зміненими і навіть поліпшеними характеристиками.

Вважають, що в даному винаході можна також використовувати варіанти послідовності, такі як інсерційні або делеційні варіанти. У делеційних варіантів відсутні один або більше залишків нативного білка. Під інсерційними мутантами, як правило, розуміють додавання речовини в нетермінальну точку поліпептиду. Також варто розуміти, що варіанти з інсерційними

60 послідовностями можуть включати N- або C-кінцеві амінокислоти, і, проте, усе ще будуть по суті

такими, як викладено в одній з послідовностей, описаних тут, за умови, що послідовність задовольняє критерії, викладені вище, у тому числі збереження біологічної активності.

Даний винахід також стосується ізотипічної модифікації. Як обговорюється нижче, було визначено, що антитіло 8F4 являє собою Ig2a-к. Для одержання іншого ізотипу можна досягти різних функціональних властивостей шляхом модифікації Fc-області. Наприклад, зміна в IgG1 може збільшити антитілозалежну клітинну цитотоксичність, переключення в клас A може поліпшувати тканинний розподіл і переключення в клас M може поліпшувати валентність.

Модифіковані антитіла можуть бути одержані будь-яким способом, відомим фахівцям у даній галузі, у тому числі експресією стандартними молекулярно-біологічними способами або хімічним синтезом поліпептидів. Способи рекомбінантної експресії розглядаються в інших розділах даного документа.

#### В. Одноланцюжкове антитіло

Одноланцюжковий варіабельний фрагмент (scFv) являє собою злиття варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, зв'язаних разом коротким (як правило серин, гліцин) лінкером. Ця химерна молекула зберігає специфічність вихідного імуноглобуліну, незважаючи на відсутність константних областей і введення пептидного лінкера. На зображенні праворуч показано, як ця модифікація звичайно залишає специфічність у незміненому вигляді. Ці молекули історично були створені для полегшення фагового дисплея, де дуже зручно є експресія антигензв'язувального домену як єдиного пептиду. Крім того, scFv можуть бути одержані безпосередньо із субклонованих важкого і легкого ланцюгів, одержаних з гібридами. Одноланцюжкові варіабельні фрагменти не містять константної Fc-області, присутньої у повнорозмірній молекулі антитіла, і тому загальні сайти зв'язування (наприклад, білок A/G) використовувалися для очищення антитіл. Ці фрагменти часто можна очищати/імобілізувати з використанням білка L, оскільки білок L взаємодіє з варіабельною областю легких ланцюгів каппа.

Гнучкі лінкери, як правило, складаються зі спіральних амінокислотних залишків, що сприяють повороту, таких як аланін, серин і гліцин. При цьому інші залишки також можуть функціонувати. Tang et al. (1996) використовували фаговий дисплей як засіб швидкого селектування спеціалізованих лінкерів для одноланцюжкових антитіл (scFv) з бібліотек білкових лінкерів. Була сконструйована бібліотека випадкових лінкерів, у якій гени варіабельних доменів важкого і легкого ланцюгів були зв'язані сегментом, що кодує 18-амінокислотний поліпептид змінного складу. Спектр scFv (приблизно  $5 \times 10^6$  різних членів) був показаний на ниткоподібних фагах і підданий афінній селекції з гаптенем. Популяція вибраних варіантів виявляла значне збільшення активності зв'язування, але зберегла значну різноманітність послідовностей. Скринінг 1054 окремих варіантів надалі утворював каталітично активне scFv, що ефективно продукувалося у розчинній формі. Аналіз послідовності виявив консервативний пролін у лінкері через два залишки після С-кінця VH і велику кількість аргінінів і пролінів в інших положеннях, як єдині загальні особливості вибраних границь.

Рекомбінантні антитіла за даним винаходом також можуть включати послідовності або частини, які забезпечують димеризацію або мультимеризацію рецепторів. Такі послідовності включають такі, одержані з IgA, що дозволяють формувати мультимери в сполученні з J-ланцюгом. Інший домен мультимеризації являє собою димеризаційний домен Gal4. В інших варіантах здійснення ланцюги можуть бути модифіковані речовинами, такими як біотин/авідин, що дозволяє комбінувати два антитіла.

В одному з варіантів здійснення винаходу одноланцюжкове антитіло може бути одержане шляхом з'єднання легких і важких ланцюгів рецепторів з використанням непептидного лінкера або хімічної ланки. Як правило, легкі і важкі ланцюги потрібно продукувати у різних клітинах, очищати і надалі з'єднувати їх один з одним належним чином (тобто N-кінець важкого ланцюга прикріплюється до С-кінця легкого ланцюга через відповідний хімічний місток).

Зшивальні реагенти використовуються для формування молекулярних містків, які зв'язують функціональні групи двох різних молекул, наприклад стабілізуючий і коагулюючий засіб. Однак передбачається, що можуть бути створені димери або мультимери одного і того ж аналогового або гетеромерного комплексу, що складається з різних аналогів. Для з'єднання двох різних сполук покрововим чином, можуть бути використані гетеробіфункціональні перехреснозшивальні реагенти, які усувають утворення небажаних гомополімерів. Таблиця 3 ілюструє деякі перехреснозшивальні реагенти.

Таблиця 3

## Гетеробіфункціональні перехреснозшивальні реагенти

Лінкер	Реагує з	Переваги і застосування	Довжина плечей спейсера/ після перехресного зшивання
SMPT	Сульфгідрили первинних амінів	Велика стабільність	11,2 А
SPDP	Сульфгідрили первинних амінів	Тіолування Розщеплюване перехресне зшивання	6,8 А
LC-SPDP	Сульфгідрили первинних амінів	Подовжене плече спейсера	15,6 А
Sulfo-LC-SPDP	Сульфгідрили первинних амінів	Подовжене плече спейсера Водорозчинний	15,6 А
SMCC	Сульфгідрили первинних амінів	Стабільна малеїмідна реактивна група Кон'югація фермент-антитіло Кон'югація гаптен-білок-носій	11,6 А
Sulfo-SMCC	Сульфгідрили первинних амінів	Стабільна малеїмідна реактивна група Водорозчинний Кон'югація фермент-антитіло	11,6 А
MBS	Сульфгідрили первинних амінів	Кон'югація фермент-антитіло Кон'югація гаптен-білок-носій	9,9 А
Sulfo-MBS	Сульфгідрили первинних амінів	Водорозчинний	9,9 А
SIAB	Сульфгідрили первинних амінів	Кон'югація фермент-антитіло	10,6 А
Sulfo-SIAB	Сульфгідрили первинних амінів	Водорозчинний	10,6 А
SMPB	Сульфгідрили первинних амінів	Подовжене плече спейсера Кон'югація фермент-антитіло	14,5 А
Sulfo-SMPB	Сульфгідрили первинних амінів	Подовжене плече спейсера Водорозчинний	14,5 А
EDC/Sulfo-NHS	Карбоксильні групи первинних амінів	Кон'югація гаптен-носій	0
ABH	Неселектовані карбогідрати	Реагує з цукровими групами	11,9 А

Характерний гетеробіфункціональний перехреснозшивальний реагент містить дві реактивні групи: одну, реагуючу з первинною аміногрупою (наприклад, N-гідроксисукцинімідом), і іншу, реагуючу з тіольною групою (наприклад, піридилдисульфідом, малеїнімідами, галогенами і т. д.). Через первинний амін реактивної групи перехреснозшивальний реагент може реагувати з залишком(ами) лізину одного білка (наприклад, вибраного антитіла або фрагмента), а через тіольну реактивну групу перехреснозшивальний реагент, вже приєднаний до першого білка, реагує з залишком цистеїну (вільною сульфгідрильною групою) іншого білка (наприклад, селективний реагент).

Бажано, щоб був використаний перехреснозшивальний реагент, який має достатню стабільність в крові. Відомі численні види лінкерів, що містять дисульфідний зв'язок, які можна успішно використовувати для кон'югатного націлювання і лікувальних/профілактичних засобів. Лінкери, що містять дисульфідні зв'язки, які є стерично утрудненими, можуть дати велику стабільність *in vivo*, запобігаючи вивільненню націленого пептиду до досягнення ділянки дії. Ці лінкери є, таким чином, однією групою зшивальних реагентів.

Інший перехреснозшивальний реагент являє собою SMPT, який є біфункціональним перехреснозшивальним реагентом, що містить дисульфідний зв'язок, який є "стерично утрудненим" сусіднім бензольним кільцем і метильними групами. Вважається, що стеричне утруднення дисульфідного зв'язку служить функцією захисту зв'язку від впливу тіолатних аніонів, таких як глутатіон, що можуть бути присутніми у тканинах і крові, і тим самим допомогти в запобіганні від'єднанню кон'югата до доставки приєднаного реагенту до ділянки-мішені.

Перехреснозшивальний реагент SMPT, як і багато інших відомих зшивальних реагентів, надає здатність перехресно зшивати функціональні групи, такі як SH цистеїну або первинних амінів (наприклад, епсилон-аміногрупа лізину). Інший можливий тип перехреснозшивального реагенту включає гетеробіфункціональні фотореактивні фенолази, що містять розщеплюваний дисульфідний зв'язок, такі як сульфосукцинімідил-2-(p-азидосаліциламід)етил-1,3'-дитіопропіонат. N-гідроксисукцинімідильна група реагує з первинними аміногрупами, і фенолазид (при фотолізисі) реагує неселективно з будь-яким амінокислотним залишком.

На доповнення до утруднених перехреснозшивальних реагентів, неутруднені лінкери також можуть бути використані відповідно до даного документа. Інші корисні перехреснозшивальні реагенти, як вважають, що не містять або не утворюють захищений дисульфід, включають SATA, SPDP і 2-імінотіолан (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Використання таких перехреснозшивальних реагентів добре відоме в даній галузі. Інший варіант здійснення включає використання гнучких лінкерів.

У патенті США № 4680338 описані біфункціональні лінкери, які можна використовувати для одержання кон'югатів лігандів з аміновмісними полімерами і/або білками, особливо для утворення кон'югатів антитіл з хелатуючими реагентами, лікарськими препаратами, ферментами, детектованими мітками і т. п. У патентах США №№ 5141648 і 5563250 описані розщеплювані кон'югати, які містять лабільні зв'язки, розщеплювані при різних м'яких умовах. Цей лінкер є особливо ефективним, оскільки реагент, що представляє інтерес, може бути зв'язаний безпосередньо з лінкером, при розщепленні, що приводить до вивільнення активного реагенту. Конкретні варіанти застосування включають додавання вільної аміної або вільної сульфгідрильної групи до білка, такого як антитіло або лікарський препарат.

У патенті США № 5856456 описані пептидні лінкери для використання при з'єднанні поліпептидних компонентів для одержання злитих білків, наприклад одноланцюжкових антитіл. Лінкер складає до приблизно 50 амінокислот у довжину, містить щонайменше одну заряджену амінокислоту (переважно, аргінін або лізин), за якою іде пролін, і характеризується більшою стабільністю і зниженою агрегацією. У патенті США № 5880270 описані амінокисломісні лінкери, ефективні в різноманітності імунодіагностичних методик і методик розділення.

### С. Очищення

У деяких варіантах здійснення антитіла за даним винаходом можуть бути очищені. Термін "очищений", як використовується в даному документі, призначений для позначення композиції, яку можна відділити від інших компонентів, де білок очищають до будь-якого ступеня відносно його природно доступного стану. Очищений білок, отже, також належить до білка, вільного від середовища, у якому він може природно бути присутній. Якщо використовується термін "по суті очищений", то це позначення стосується композиції, у якій білок або пептид утворює основний компонент композиції, наприклад, що складає приблизно 50 %, приблизно 60 %, приблизно 70 %, приблизно 80 %, приблизно 90 %, приблизно 95 % або більше білків композиції.

Способи очищення білків добре відомі фахівцям у даній галузі. Ці способи включають, на одному рівні, грубе фракціонування клітинного оточення на поліпептидну і відмінну від поліпептидної фракції. Після відділення поліпептиду від інших білків, поліпептид, що представляє інтерес, може бути додатково очищений за допомогою хроматографічного і електрофоретичного способів для досягнення часткового або повного очищення (або очищення до гомогенності). Аналітичні способи, особливо придатні для підготовки чистого пептиду, являють собою іонообмінну хроматографію, ексклюзійну хроматографію; електрофорез у поліакриламідному гелі; ізоелектричне фокусування. Інші способи очищення білка включають осадження сульфатом амонію, ПЕГ, антитілами і т. п., або шляхом теплової денатурації з наступним центрифугуванням; гель-фільтрацію, обернену фазу, гідроксилапатит і афінну хроматографію; і комбінацію цих і інших способів.

При очищенні антитіла за даним винаходом може бути бажаним експресувати поліпептид у прокаріотичній або еукаріотичній системі експресії й екстрагувати білок з використанням денатуруючих умов. Поліпептид може бути очищений від інших клітинних компонентів за допомогою афінної колонки, що зв'язується з тег-вмісною частиною поліпептиду. Як відомо в даній галузі, вважається, що порядок проведення різних стадій очищення може бути змінений або що деякі стадії можуть бути опущені і, проте, давати в результаті придатний спосіб одержання в суттєвому ступені очищеного білка або пептиду.

Звичайно, повнорозмірні антитіла фракціонують з використанням засобів (наприклад, білок А), які зв'язують Fc-частину антитіла. Крім того, можна використовувати антигени, щоб одночасно очищати і відбирати відповідні антитіла. Такі способи часто використовують зв'язувальні засоби селекції з підтримкою, такою як колонка, фільтр або буси. Антитіла

зв'язують з підтримкою, забруднення видаляють (наприклад, змивають) і антитіла вивільняють з використанням умов (сіль, тепло й ін.).

Різні способи кількісної оцінки ступеня очищення білка або пептиду відомі фахівцям у даній галузі у світлі даного опису. До них належать, наприклад, визначення специфічної активності активної фракції або оцінка кількості поліпептидів у фракції шляхом аналізу методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію. Інший спосіб оцінки чистоти фракції для розрахунку питомої активності фракції являє собою розрахунок специфічної активності фракції, порівняння її зі специфічною активністю вихідного екстракту і, таким чином, обчислення ступеня чистоти. Фактичні одиниці, використовувані для представлення кількості активності, будуть, звичайно, залежати від конкретного способу, вибраного для аналізу очищення, і від того, виявляє чи ні експресований білок або пептид детектовану активність.

Відомо, що міграція поліпептиду може відрізнитися, іноді значно, при різних умовах електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (Capaldi et al., 1977). Тому варто враховувати, що при різних умовах електрофорезу уявна молекулярна маса очищених або частково очищених продуктів експресії може відрізнитися.

D. Кон'югування антитіл з терапевтичними або діагностичними засобами

В одному з варіантів здійснення антитіла за даним винаходом можуть бути з'єднані з різними реагентами для використання в діагностиці і терапії захворювання. Зв'язування може бути виконане з використанням множини добре відомих хімічних реакцій і засобів, деякі з яких описані в інших розділах даного опису.

#### 1. Діагностичні реагенти

Багато які діагностичні/візуалізуючі засоби відомі фахівцям у даній галузі, як і способи їх приєднання до білків, включаючи антитіла (див., наприклад, патенти США №№ 5021236; 4938948 і 4472509, кожний з яких наведений у даному описі як посилання). Використовувані для візуалізації речовини можуть являти собою парамагнітні іони, радіоактивні ізотопи, флуорохроми, ЯМР-детектовані речовини і засоби рентгенівської візуалізації.

У випадку парамагнітних іонів, можна відзначити, як приклад, іони, такі як хром(III), марганець(II), залізо(III), залізо(II), кобальт(II), нікель(II), мідь(II), неодим(III), самарій(III), ітербій(III), гадоліній(III), ванадій(II), тербій(III), диспрозій(III), гольмій(III) і/або ербій(III), гадоліній є особливо переважним. Іони, корисні в інших контекстах, таких як рентгенівська візуалізація, включають, як необмежувальні приклади, лантан(III), золото(III), свинець(II) і особливо вісмут(III).

У випадку радіоактивних ізотопів для використання в терапевтичних і/або діагностичних додатках можна відзначити аstat<sup>211</sup>, <sup>14</sup>вуглець, <sup>51</sup>хром, <sup>36</sup>хлор, <sup>57</sup>кобальт, <sup>58</sup>кобальт, мідь<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, галій<sup>67</sup>, <sup>3</sup>водень, йод<sup>123</sup>, йод<sup>125</sup>, йод<sup>131</sup>, індій<sup>111</sup>, <sup>59</sup>залізо, <sup>32</sup>фосфор, реній<sup>186</sup>, реній<sup>188</sup>, <sup>75</sup>селен, <sup>35</sup>сірку, технецій<sup>99m</sup> і/або ітрій<sup>90</sup>, <sup>125</sup>I часто є переважним для використання у визначених варіантах здійснення, і технецій<sup>99m</sup> і/або індій<sup>111</sup> також часто є переважними через їх низьку енергію і придатність для детекції з великим радіусом дії. Радіоактивно мічені рецептори за даним винаходом можуть бути одержані згідно зі способами, відомими в даній галузі. Наприклад, рецептори можуть йодуватися при контакті з йодидом натрію і/або калію і хімічним окисним засобом, таким як гіпохлорит натрію, або ферментативним окислювальним засобом, таким як лактопероксидаза. TcR відповідно до винаходу може бути мічений технецієм<sup>99m</sup> за допомогою процесу обміну лігандів, наприклад шляхом редукування пертехнату розчином олова, хелатування редукованого технецію на колонці із Сефадексом і застосування антитіла до цієї колонки. Крім того, можуть бути використані способи прямого маркування, наприклад, шляхом інкубації пертехнату, відновлювального засобу, такого як  $\text{SnCl}_2$ , буферного розчину, такого як розчин фталату натрію-калію й антитіла. Проміжні функціональні групи, які часто використовуються для зв'язування радіоізотопів, що існують як металеві іони, з антитілом являють собою діетилентриамінпентаоцтову кислоту (DTPA) або етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТО).

Серед флуоресцентних міток, передбачених для використання як кон'югатів, є Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5, 6-FAM, ізотіоціанат флуоресцину, HEX, 6-JOE, Орегон зелений 488, Орегон зелений 500, Орегон зелений 514, Pacific Blue, REG, родамін зелений, родамін червоний, ренографін, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамін і/або Техас червоний.

#### 2. Терапевтичні реагенти

Створена широка різноманітність терапевтичних засобів, що зв'язуються з антитілами за даним винаходом. Наприклад, радіоізотопи, які обговорювалися вище, хоча і корисні в діагностичних контекстах, можуть бути також використані як терапевтичні засоби. Хіміотерапевтичні засоби також можна кон'югувати з антитілами і вони включають цисплатин

(CDDP), карбоплатин, прокарбазин, меклоретамін, циклофосфамід, камптотецин, іфосфамід, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нітросурею, дактиноміцин, даунорубіцин, доксорубіцин, блеоміцин, плікоміцин, мітоміцин, етопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, зв'язувальні речовини рецептора естрогену, таксол, гемцитабін, навелбін, інгібітори фарнезилпротеїнтрансферази, трансплатинум, 5-фторурацил, вінкристин, вінбластин і метотрексат.

Інший клас терапевтичних засобів являє собою токсини. Передбачені холерний токсин, токсин ботулізму, коклюшний токсин, А- і В-ланцюги рицину, а також інші природні або синтетичні токсини.

Цитокіни і лімфокіни являють собою ще один клас терапевтичних засобів, що можуть зв'язуватися з TcR за даним винаходом, і включають IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, TNF $\alpha$ , GM-CSF, INF $\alpha$ , INF $\beta$  і IFN $\gamma$ .

В інших варіантах здійснення протизапальні засоби передбачені як терапевтичні засоби, які можуть бути кон'юговані з антитілами. Протизапальні засоби включають засоби нестероїдної протизапальної терапії, стероїди, рапаміцин, інфліксимаб і онтек. Імуносупресивні засоби включають FK-506 і циклоспорин А.

Агоніст TLR може бути зв'язаний з антитілом, наприклад, через Fc-частину молекули. Агоністи TLR є сполуками, які стимулюють або "вмикають" імунну систему. Природними агоністами для TLR9 є компоненти ДНК, що є загальними для бактерій і вірусів. Природними агоністами для TLR7 і 8 є структури РНК, що виявляються у вірусах. Після розпізнавання своїх природних ДНК- і РНК-агоністів, кожний з TLR7, 8 і 9 ініціює каскад різних захисних імунних реакцій. Агоністи TLR включають олігодезоксинуклеотиди, фрагменти гіалуронової кислоти, іміквімод, лавендустин С, ліпід А, лороксибін, LPS, монофосфорилліпід А, міристицин, резиквімод, флагелін *S. typhimurium*, HKLM, PAM3CSK4 і polyI:C.

#### IV. Нуклеїнові кислоти й експресія

##### А. Нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла

В одному з аспектів винахід стосується нуклеїнових кислот, що кодують різні фрагменти важкого і легкого ланцюгів антитіла, варіабельних і константних доменів. Сегмент нуклеїнової кислоти може бути одержаний з геномної ДНК, комплементарної ДНК (кДНК) або синтетичної ДНК. Якщо бажаним є включення у вектор експресії, нуклеїнова кислота також може включати природний інтрон або інтрон, одержаний від іншого гена, а також інші некодуючі (наприклад, регуляторні) і кодуючі області (наприклад, лінкери). Як використовується в даному документі, термін "кДНК" призначений для позначення ДНК, одержаної з використанням матричної РНК (мРНК) як матриці. Перевага використання кДНК, на відміну від геномної ДНК або ДНК, полімеризованої з геномної, необробленої або частково обробленої матриці РНК, кДНК, у першу чергу, містить кодуючі послідовності відповідного білка.

Термін "рекомбінантний" може використовуватися в сполученні з поліпептидом або назвою конкретного поліпептиду і, як правило, означає поліпептид, продукований з молекули нуклеїнової кислоти, на якій здійснювалися маніпуляції *in vitro* або яка являє собою реплікований продукт такої молекули. Рекомбінантні вектори і виділені сегменти нуклеїнової кислоти можуть різним чином включати власне кодуючі антитіло області, що несуть вибрані зміни або модифікації в основній кодуючій області, або вони можуть кодувати більш великі поліпептиди, що включають області, відмінні від областей антитіла.

"Нуклеїнова кислота", як використовується в даному документі, включає одноланцюжкові і дволанцюжкові молекули, а також ДНК, РНК, хімічно модифіковані нуклеїнові кислоти й аналоги нуклеїнових кислот. Передбачається, що нуклеїнова кислота в межах обсягу даного винаходу може складатися з приблизно 10, приблизно 20, приблизно 30, приблизно 40, приблизно 50, приблизно 60, приблизно 70, приблизно 80, приблизно 90, приблизно 100, приблизно 110, приблизно 120, приблизно 130, приблизно 140, приблизно 150, приблизно 160, приблизно 170, приблизно 180, приблизно 190, приблизно 200, приблизно 210, приблизно 220, приблизно 230, приблизно 240, приблизно 250, приблизно 275, приблизно 300, приблизно 325, приблизно 350, приблизно 375, приблизно 400, приблизно 425, приблизно 450, приблизно 475, приблизно 500, приблизно 525, приблизно 550, приблизно 575, приблизно 600, приблизно 625, приблизно 650, приблизно 675, приблизно 700, приблизно 725, приблизно 750, приблизно 775, приблизно 800, приблизно 825, приблизно 850, приблизно 875, приблизно 900, приблизно 925, приблизно 950, приблизно 975, приблизно 1000, приблизно 1100, приблизно 1200, приблизно 1300, приблизно 1400, приблизно 1500, приблизно 1750, приблизно 2000, приблизно 2250, приблизно 2500 або більше нуклеотидних залишків у довжину.

Передбачається, що антитіло може кодуватися за допомогою будь-якої послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує відповідну амінокислотну послідовність, таку як послідовності в SEQ ID NO:3, 60, 5, 8, 9, 10 (важкі CDR1, 2 і 3; легкі CDR1 і 2, 3/JK) і SEQ ID NO:11 або 27, що включають важкі CDR і каркасні області 1, 2 і 3, які фланкують вверх за течією важких CDR 1, 2 і 3, відповідно, і SEQ ID NO:23, що включає легкі CDR і каркасні області 1, 2 і 3, що фланкують вверх за течією легких CDR 1, 2 і 3, відповідно. Конструювання і продукція нуклеїнових кислот, що кодують бажані послідовності амінокислот, добре відомі фахівцям у даній галузі, з використанням стандартизованих таблиць кодонів (Таблиця 4). У конкретних варіантах здійснення кодони, вибрані для кодування кожної амінокислоти, можуть бути змінені для оптимізації експресії нуклеїнової кислоти в клітині-хазяїні, що представляє інтерес. Термін "функціонально еквівалентний кодон" використовується в даному документі для позначення кодонів, які кодують однакові амінокислоти, такі як шість кодонів для аргініну або серину, а також стосується кодонів, які кодують біологічно еквівалентні амінокислоти. Кодонові переваги для різних видів клітини-хазяїна добре відомі в даній галузі. Кодони, переважні для використання в організмі людини, добре відомі фахівцям у даній галузі (Wada et al., 1990). Кодонові переваги для інших організмів також добре відомі фахівцям у даній галузі (Wada et al., 1990, наведений у даному описі в повному обсязі як посилання).

Таблиця 4

Таблиця кодонів

Амінокислоти			Кодони
Аланін	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Цистеїн	Cys	C	UGC UGU
Аспарагінова кислота	Asp	D	GAC GAU
Глутамінова кислота	Glu	E	GAA GAG
Фенілаланін	Phe	F	UUC UUU
Гліцин	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Гістидин	His	H	CAC CAU
Ізолейцин	Ile	I	AUA AUC AUU
Лізін	Lys	K	AAA AAG
Лейцин	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метіонін	Met	M	AUG
Аспарагін	Asn	N	AAC AAU
Пролін	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Глутамін	Gln	Q	CAA CAG
Аргінін	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонін	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Валін	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAC UAU

## 20 В. Експресія нуклеїнових кислот

Системи на основі прокаріот і/або еукаріот можуть бути використані для продукції послідовностей нуклеїнових кислот або їх споріднених поліпептидів, білків і пептидів. Даний винахід стосується використання такої експресійної системи для продукції антитіл, що зв'язують PR-1/HLA-A2. Одна ефективна експресійна технологія використовує систему клітин коммах/бакуловірусів. Система клітин коммах/бакуловірусів може забезпечувати високий рівень білкової експресії сегмента гетерологічної нуклеїнової кислоти так, як описано в патентах США №№ 5871986 і 4879236, кожний з яких представлений у даному описі як посилання, і яку можна придбати, наприклад, за назвою MAXBAC® 2.0 від INVITROGEN® і BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM від CLONTECH®.

Крім того, існує множина інших систем експресії, які комерційно і широко доступні. Одним із прикладів такої системи є індукцйбельна система експресії ссавців STRATAGENE®'s COMPLETE CONTROL, що включає синтетичний екдизон-індукований рецептор, або його систему експресії pET, систему експресії в E. coli. Інший приклад індукованої системи експресії доступний від INVITROGEN®, що несе систему T-REX™ (тетрациклін-регульована експресія), індукована

система експресії ссавців, що використовує повнорозмірний промотор CMV. INVITROGEN® також надає дріжджову систему експресії, названу *Pichia methanolica* Expression System, яка призначена для високого рівня продукції рекомбінантних білків у метилотрофних дріжджах *Pichia methanolica*. Будь-який фахівець у даній галузі знає, як експресувати вектор, такий як експресійна конструкція, щоб продукувати послідовність нуклеїнової кислоти або спорідненого з нею поліпептиду, білка або пептиду.

#### 1. Вірусні вектори і доставка

Існує ряд способів, у яких вектори експресії можуть бути введені в клітини. Віруси є потужним інструментом для експресії білкових продуктів, кодованих нуклеїновими кислотами. Таким чином, у визначених варіантах здійснення винаходу, вектор експресії містить вірусний або сконструйований вектор, що походить від вірусного геному. Здатність деяких вірусів проникати в клітини за допомогою рецептор-опосередкованого ендоцитозу, інтегруватися в геном клітини-хазяїна і експресувати вірусні гени стабільно й ефективно зробили їх привабливими кандидатами для перенесення чужорідних генів у клітини ссавців (Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986). Перші віруси, використовувані як генні вектори, являли собою ДНК-вмісні віруси, у тому числі паповавіруси (вакуолізуючий мавпячий вірус 40, вірус бичачої папіломи і вірус полііоми) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986) і аденовіруси (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986).

Аденовірусні вектори. Конкретний спосіб для доставки нуклеїнової кислоти включає використання аденовірусного вектора експресії. Незважаючи на те, що аденовірусні вектори, як відомо, мають низький потенціал для інтеграції в геномну ДНК, ця особливість врівноважується високою ефективністю перенесення генів, що надається цими векторами. Під "аденовірусним вектором експресії" маються на увазі ті конструкції, які містять аденовірусні послідовності, достатні для (а) забезпечення упакування конструкції і (b) щоб, у кінцевому рахунку, експресувати тканино- або клітиноспецифічну конструкцію, яка була клонована в ньому. Знання генетичної організації або аденовірусу, вірус з 36 т.п.н. лінійної дволанцюжкової ДНК, дозволяє заміщати великі фрагменти ДНК аденовірусу чужорідними послідовностями до 7 т.п.н. (Grunhaus and Horwitz, 1992).

Вектори AAV. Нуклеїнову кислоту можна вводити в клітину з використанням аденовірусної асистованої трансфекції. Підвищена ефективність трансфекції була зареєстрована в клітинних системах з використанням аденовірус-зв'язаних систем (Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994). Аденоасоційований вірус (AAV) являє собою привабливу векторну систему для використання у вакцинах за даним винаходом (Muzyczka, 1992). AAV має широке коло хазяїнів для інфекційності (Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988). Подробиці, що стосуються одержання і використання векторів rAAV, описані в патентах США №№ 5139941 і 4797368, кожний з яких представлений у даному описі як посилання.

Ретровірусні вектори. Ретровіруси подають надію як вектори генної доставки у вакцинах через здатність інтегрувати свої гени в геном хазяїна, переносючи велику кількість чужорідного генетичного матеріалу, заражаючи широкий спектр видів і типів клітин і будучи упакованими в спеціальних клітинних лініях (Miller, 1992).

Щоб сконструювати ретровірусний вектор, нуклеїнова кислота (наприклад, кодує антиген, що представляє інтерес) вставляється у вірусний геном у ділянку визначених вірусних послідовностей для продукування вірусу, що є дефектним по реплікації. Для продукування віріонів конструюється пакувальна клітинна лінія, яка містить гени gag, pol і env, але без LTR і компонентів упакування (Mann et al., 1983). Коли рекомбінантна плазміда, що містить кДНК, разом з ретровірусною LTR і послідовностями упакування вводяться в спеціальну клітинну лінію (наприклад, за допомогою преципітації у фосфаті кальцію), пакувальна послідовність забезпечує упакування РНК-транскрипту рекомбінантної плазміди у вірусні частинки, які потім секретуються в культуральне середовище (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Середовище, що містить рекомбінантні ретровіруси, потім збирають, при необхідності концентрують і використовуються для перенесення генів. Ретровірусні вектори здатні інфікувати множину типів клітин. При цьому інтеграція і стійка експресія вимагають поділу клітин хазяїна (Paskind et al., 1975).

Лентивіруси являють собою складні ретровіруси, які, на доповнення до загальних ретровірусних генів gag, pol і env містять інші гени з регуляторною або структурною функцією. Лентивірусні вектори добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; патенти США №№ 6013516 і 5994136). Деякі приклади лентивірусів включають віруси імунodefіциту людини: ВІЛ-1, ВІЛ-2, і мавпячий вірус імунodefіциту: SIV.



Лентивірусні вектори були одержані шляхом багаторазового ослаблення генів вірулентності ВІЛ, наприклад гени *env*, *vif*, *vpr*, *vri* і *nef* видаляються, роблячи вектор біологічно безпечним.

Рекомбінантні лентивірусні вектори здатні інфікувати клітини, що не діляться, і можуть бути використані для перенесення генів як *in vivo*, так і *ex vivo* і експресії послідовностей нуклеїнових кислот. Наприклад, рекомбінантний лентивірус, здатний інфікувати клітину, що не ділиться, де придатна клітина-хазяїн трансфікується двома або більше векторами, що несуть функції упакування, а саме *gag*, *pol* і *env*, а також *rev* і *tat*, описаний у патенті США № 5994136, що включений у даний опис як посилання. Можна націлити рекомбінантний вірус шляхом зв'язування білка оболонки з антитілом або конкретним лігандом для націлювання на рецептор конкретного клітинного типу. Шляхом вбудовування послідовності, що представляє інтерес (у тому числі регуляторної області), у вірусний вектор, поряд з іншим геном, який кодує ліганд для рецептора на конкретній клітині-мішені, наприклад вектор тепер стає мішенеспецифічним.

Інші вірусні вектори. Інші вірусні вектори можуть бути використані як вакцинні конструкції за даним винаходом. Вектори, одержані з вірусів, таких як вірус вісповакцини (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988), вірус Синдбіс, цитомегаловірус і вірус простого герпесу, можуть використовуватися. Вони мають ряд привабливих особливостей для різних клітин ссавців (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990). Лентивіруси також були вивчені як вакцинні вектори (VandenDriessche et al., 2002).

Доставка за допомогою модифікованих вірусів. Нуклеїнові кислоти, що доставляються, можуть бути розміщені в інфекційному вірусі, який був сконструйований для експресії специфічного ліганду зв'язування. Вірусна частинка, таким чином, буде специфічно зв'язуватися зі спорідненими рецепторами клітини-мішені і доставляти вміст до клітини. Новий підхід, спланований для забезпечення конкретного націлювання ретровірусних векторів, був розроблений на основі хімічної модифікації ретровірусу за допомогою хімічного додавання залишку лактози до оболонки вірусу. Ця модифікація може забезпечити специфічне інфікування гепатоцитів через сіалоглікопротеїнові рецептори.

Інший підхід до націлювання рекомбінантних ретровірусів був розроблений, у ньому були використані біотинільовані антитіла проти ретровірусного білка оболонки і проти специфічного клітинного рецептора. Антитіла були з'єднані через компоненти біотину за допомогою стрептавідину (Roux et al., 1989). За допомогою антитіл проти антигенів класу I і класу II головного комплексу гістосумісності вони продемонстрували інфікування множини клітин людини, що несли ці поверхневі антигени з екотропним вірусом *in vitro* (Roux et al., 1989).

## 2. Невірусна доставка нуклеїнових кислот

Придатні невірусні способи доставки нуклеїнової кислоти для ефективної експресії композиції за даним винаходом, як вважають, включають практично будь-який спосіб, за допомогою якого нуклеїнова кислота (наприклад, ДНК) може бути введена в органелу, клітину, тканину або організм, як описано в даному документі або як може бути відомо будь-якому фахівцю в даній галузі. Такі способи включають, без обмеження, пряму доставку ДНК, наприклад, шляхом ін'єкції (патенти США №№ 5994624, 5981274, 5945100, 5780448, 5736524, 5702932, 5656610, 5589466 і 5580859, кожний з яких включений у даний опис як посилання), включаючи мікроін'єкцію (Harland and Weintraub, 1985; патент США № 5789215, включений у даний опис як посилання); шляхом електропорації (патент США № 5384253, включений у даний опис як посилання); шляхом преципітації фосфатом кальцію (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); з використанням DEAE-декстрану з наступним поліетиленгліколем (Gopal, 1985); шляхом безпосереднього завантаження при соніфікації (Fechheimer et al., 1987); шляхом ліпосома-опосередкованої трансфекції (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991); шляхом мікропроекційного бомбардування (заявки PCT №№ WO 94/09699 і 95/06128; патенти США №№ 5610042; 5322783, 5563055, 5550318, 5538877 і 5538880, і кожний з яких включений у даний опис як посилання); шляхом збовтування з карбідкремнієвими волокнами (Kaerpler et al., 1990; патенти США №№ 5302523 і 5464765, кожний з яких включений у даний опис як посилання) або шляхом ПЕГ-опосередкованої трансформації протопластів (Omirulleh et al., 1993; патенти США №№ 4684611 і 4952500, кожний з яких включений у даний опис як посилання); за допомогою висушування/інгібування-опосередкованого поглинання ДНК (Potrykus et al., 1985). Використання способів, таких як ці, можна стабільно або тимчасово трансформувати органелу(и), клітину(и), тканину(и) або організм(и).

## V. Антитіла для діагностики ракових або гіперпластичних або диспластичних порушень

В одному з варіантів здійснення за даним винаходом запропоновані способи діагностики злоякісної пухлини, такої як лейкемія (наприклад, AML, CML, MDS), а також мієлодиспластичних

розладів. Мієлодисплазія (MDS) належить до групи захворювань, при яких кістковий мозок не функціонує нормально і виробляє недостатню кількість нормальних клітин крові. MDS впливає на продукування будь-яких, а іноді всіх типів клітин крові, включаючи еритроцити, тромбоцити і білі клітини крові (цитопенії). Близько 50 % дитячої мієлодисплазії можна розділити на п'ять типів МДС: рефрактерна анемія, рефрактерна анемія з кільцевими сидеробластами, рефрактерна анемія з надлишком бластів, рефрактерна анемія з надлишком бластів при трансформації і хронічний мієломоноцитарний лейкоз. 50 %, що залишилися, як правило, присутні з виділеними або об'єднаними цитопеніями, такими як анемія, лейкопенія і/або тромбоцитопенія (низька кількість тромбоцитів). Незважаючи на хронічний характер, MDS прогресує, щоб стати гострим мієлоїдним лейкозом (AML) у 30 % пацієнтів.

Також передбаченими для діагностики за даним винаходом є тверді пухлинні форми раку. Такою злоякісною пухлиною є рак легені, рак голови і шиї, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак нирок, рак кістки, рак яєчка, рак шийки матки, рак дванадцятипалої кишки, лімфоми, передпухлинні ураження в легенях, рак товстої кишки, меланома і рак сечового міхура. Інші гіперпластичні, пухлинні і диспластичні захворювання, включаючи доброякісні гіперпроліферативні захворювання, також знаходяться в сфері застосування діагностичних процедур, описаних у даному документі.

#### А. Введення діагностичних реагентів

Введення діагностичних реагентів добре відоме фахівцям у даній галузі і повинно варіюватися залежно від діагнозу, якого потрібно досягти. Наприклад, у випадку, де передбачається дискретна пухлинна маса або маси, може застосовуватися місцеве або регіонарне введення (наприклад, у кровоносні судини пухлини, локальну лімфатичну систему або місцеві артерії або вени). Крім того, можна надавати діагностичні реактиви регіонально або системно. Це може бути спосіб введення вибору, де бажана візуалізація всієї кінцівки або організму, де була визначена відома специфічна пухлинна маса, або при підозрі на метастази.

#### В. Ін'єкційні композиції і склади

Одним зі способів доставки лікарських засобів за даним винаходом є системний спосіб. Проте, фармацевтичні композиції, розкриті в даному описі, можна також вводити парентерально, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньом'язово, черезшкірно або навіть внутрішньоочеревинно, як описано в патенті США № 5543158; патенті США № 5641515 і патенті США № 5399363 (кожний з яких конкретно включений у даний опис як посилання у всій його повноті).

Ін'єкцію лікарських засобів можна проводити за допомогою шприца або будь-якого іншого способу, використовуюваного для ін'єкції розчину, за умови, що засіб може пройти через голку специфічного розміру, необхідну для ін'єкції. Була описана нова безгольова система упорскування (патент США № 5846233), яка має випускний отвір, що визначає камеру ампули для подачі розчину й енергетичний пристрій для подачі розчину з випускного отвору в ділянку доставки. Також була описана шприцева система для застосування в генній терапії, яка дозволяє здійснювати множинні ін'єкції заданої кількості розчину точно на будь-яку глибину (патент США № 5846225).

Розчини активних сполук у вигляді вільної основи або фармакологічно прийнятних солей можуть бути приготовлені у воді, відповідним чином змішаній з поверхнево-активною речовиною, такою як гідроксипропілцелюлоза. Дисперсії також можуть бути одержані в гліцерині, рідких поліетиленгліколях і їх сумішах і оліях. При звичайних умовах зберігання і використання ці препарати містять консервант для запобігання росту мікроорганізмів. Фармацевтичні форми, придатні для ін'єкцій, включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій для негайного прийому (патент США № 5466468, спеціально включений у даний опис як посилання в повному обсязі). В усіх випадках форма повинна бути стерильною і повинна бути рідкою до такої міри, щоб легко вводилася через шприц. Вона повинна бути стабільною в умовах продукування і зберігання і повинна бути збережена від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і грибки. Носій може бути розчинником або дисперсійним середовищем, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь і т. п.), придатні їх суміші і/або рослинні олії. Належна плинність може підтримуватися, наприклад, шляхом використання покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і використанням поверхнево-активних речовин. Запобігання дії мікроорганізмів може бути досягнуте за допомогою різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад парабенів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти, тимеросалу тощо. У багатьох випадках буде переважно включати ізотонічні засобу, наприклад цукри або хлорид натрію. Пролонгована абсорбція ін'єктованих композицій

може бути досягнута за рахунок використання в композиціях засобів, що затримують абсорбцію, наприклад моностеарату алюмінію і желатину.

Для парентерального введення у водному розчині, наприклад, розчин повинний бути відповідним чином забуферений, якщо необхідно, і рідкий розріджувач спочатку стає ізотонічним за допомогою достатньої кількості фізіологічного розчину або глюкози. Ці конкретні водні розчини особливо придатні для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, внутрішньопухлинного і внутрішньоочеревинного введення. У зв'язку з цим, стерильні водні середовища, які можуть використовуватися, повинні бути відомі фахівцям у даній галузі у світлі даного розкриття. Наприклад, одну дозу можна розчинити в 1 мл ізотонічного розчину NaCl і або додати до 1000 мл гіподермолітичної рідини або вводити в передбачувану ділянку інфузії (див., наприклад, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15-е видання, на сторінках 1035-1038 і 1570-1580). Деякі відмінності в дозуванні обов'язково будуть виникати залежно від стану індивідуума, що піддається лікуванню. Особа, відповідальна за введення, у будь-якому випадку буде визначати відповідну дозу для окремого індивідуума. Більше того, для введення людині препарати повинні відповідати в плані стерильності, пірогенності, загальної безпеки і стандартам чистоти відповідно до вимог Служби біологічних стандартів Управління по санітарному нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів.

Стерильні ін'єкційні розчини готують шляхом включення активних сполук у необхідній кількості у відповідний розчинник з різними іншими інгредієнтами, перерахованими вище, як необхідно, з наступною стерилізацією фільтруванням. Як правило, дисперсії готують шляхом включення різних стерилізованих активних інгредієнтів у стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище й інші необхідні інгредієнти з тих, котрі перераховані вище. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних ін'єкційних розчинів переважними способами одержання є способи вакуумного висушування і ліофілізації, що дають порошок активного інгредієнта плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт із раніше стерильного-профільтрованого розчину цього.

Композиції, розкриті в даному описі, можуть бути сформульовані в нейтральній або сольовій формі. Фармацевтично прийнятні солі включають кислотно-адитивні солі (що утворюються з вільними аміногрупами білка) і солі, що утворюються з неорганічними кислотами, такими як, наприклад, соляна або фосфорна кислота, або такими органічними кислотами, як оцтова, щавлева, винна, мигдальна і т. п. Солі, утворені з вільними карбоксильними групами, також можуть бути одержані з неорганічних основ, таких як, наприклад, гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза, і таких органічних основ як ізопропіламін, триметиламін, гістидин, прокаїн і т. п. Після складання розчин буде вводиться відповідно до дозованого складу й у такій кількості, що є терапевтично ефективною. Склади легко вводити у вигляді різних лікарських форм, таких як розчини для ін'єкцій, капсули вивільнення лікарського препарату тощо.

Як використовується в даному документі, "носій" включає будь-який і всі розчинники, дисперсійні середовища, носії, покриття, розріджувачі, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні і затримуючі всмоктування засоби, буфери, розчини носіїв, суспензії, колоїди тощо. Використання таких середовищ і засобів для фармацевтичних активних речовин добре відоме в даній галузі. За винятком випадків несумісності якого-небудь звичайного носія або засобу з активним інгредієнтом, передбачається його використання в терапевтичних композиціях. Додаткові активні інгредієнти також можуть бути включені в композиції.

Вираз "фармацевтично прийнятний" або "фармакологічно прийнятний" стосується молекулярних сутностей і композицій, які не викликають алергічну або подібну небажану реакцію при введенні в організм людини. Одержання водної композиції, що містить білок як активний інгредієнт, добре відоме фахівцям у даній галузі. Як правило, такі композиції одержують як ін'єктовані або у вигляді рідких розчинів або суспензій; тверді форми, придатні для розчинення або суспендування в рідині перед ін'єкцією, також можуть бути одержані.

## 50 VI. Терапевтичні способи

### А. Ракові і гіперпластичні/диспластичні/неопластичні захворювання

Антитіла за даним винаходом можуть застосовуватися в способах лікування гіперпластичних/диспластичних/неопластичних захворювань/станів, включаючи злоякісні пухлини. Види захворювань/умов, передбачених для лікування пептидами за даним винаходом, без обмеження, включають лейкози, такі як AML, MDS і CML, а також мієлодисплазії. Інші види злоякісних пухлин можуть включати рак легень, рак голови і шиї, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак нирок, рак кістки, рак яєчка, рак шийки матки, рак дванадцятипалої кишки, лімфоми, передпухлинні ураження в легень, рак товстої кишки, меланоми, рак сечового міхура й інші пухлинні захворювання.

Щоб знищити клітини, інгібувати ріст клітин, інгібувати метастазування, зменшити розмір пухлини/тканини, тяжкість пухлинних клітин або іншим способом змінити або зменшити злоякісний фенотип пухлинних клітин за допомогою способів і композицій за даним винаходом, звичайно необхідно гіперпластичну/пухлинну/злоякісну клітину піддати приведенню в контакт із терапевтичною сполукою, такою як поліпептид, або експресійною конструкцією, що кодує антитіло за даним винаходом, як правило, диспергованими у фармацевтично прийнятному буфері або носії (див. вище в обговоренні діагностичних засобів). Способи введення будуть змінюватися, природно, залежно від розташування і характеру ураження і включають, наприклад, внутрішньошкірне, трансдермальне, парентеральне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, інтраназальне, підшкірне, черезшкірне, інтратрахеальне, внутрішньоочеревинне, внутрішньопухлинне, перфузійне, через полоскання, через безпосередню ін'єкцію і пероральне введення і склад. Будь-який зі складів і способів введення, що розглядається стосовно лікування або діагностики раку, також може використовуватися відносно неопластичних захворювань і станів. Передбачені варіанти здійснення *ex vivo*, де пухлинні клітини обробляються/трансдукуються поза організмом пацієнта (або спеціально, або як частина великої популяції клітин).

Внутрішньопухлинна ін'єкція, або ін'єкція в судинне русло пухлини, спеціально передбачена для дискретних, твердих, доступних пухлин. Місцеве, регіональне або системне введення також може бути доречним. Для пухлин > 4 см об'єм введення повинен складати приблизно 4-10 мл, тоді як для пухлини <4 см використовується об'єм приблизно 1-3 мл. Множинні ін'єкції, що постачаються у вигляді однократної дози, складають по об'єму від приблизно 0,1 до приблизно 0,5 мл. Вірусні частинки можуть ефективно контактувати шляхом введення багаторазових ін'єкцій у пухлину, на відстані приблизно 1 см одна від одної.

У випадку хірургічного втручання, даний винахід може застосовуватися під час операції і/або після неї для лікування рецидивних або метастатичних захворювань. Наприклад, у резекційну основу пухлини можна вводити або впорскувати склад, що містить антитіло. Перфузія може бути продовжена після резекції, наприклад, через залишений катетер, імплантований у ділянку хірургічного втручання. Періодичне постхірургічне лікування також передбачене.

Безперервне введення також може застосовуватися там, де це доречно, наприклад, коли пухлина вирізається і основа пухлини піддається лікуванню для ліквідації залишкового, мікроскопічного захворювання. Доставка через шприц або катетер є переважною. Така безупинна перфузія може проводитися протягом періоду часу приблизно 1-2 год., приблизно 2-6 год., приблизно 6-12 год., приблизно 12-24 год., приблизно 1-2 дні, приблизно 1-2 тижні або більше після початку лікування. Як правило, доза терапевтичної композиції за допомогою безупинної перфузії повинна бути еквівалентна дозі, одержуваній за допомогою однієї або декількох ін'єкцій, скоректованих протягом періоду часу, протягом якого перфузії відбуваються. Далі надається, що перфузія кінцівки може застосовуватися для введення терапевтичних композицій за даним винаходом, зокрема при лікуванні меланом і сарком.

Схеми лікування також можуть відрізнятися і часто залежать від типу пухлини, локалізації пухлини, прогресування захворювання і стану здоров'я і віку пацієнта. Очевидно, що деякі види пухлини вимагають більш агресивного лікування, і в той же час деякі пацієнти не можуть витримувати більш обтяжливі протоколи. Щоб приймати такі рішення на основі відомої ефективності і токсичності (якщо така наявна) терапевтичних складів, найкраще придатний лікар.

У деяких варіантах здійснення пухлина, що піддається лікуванню, щонайменше спочатку може бути неоперабельною. Лікування може збільшити резектабельність пухлини через стиснення на границях або усунення визначених, зокрема інвазивних, частин. Після процедур лікування резекція може бути можливою. Додаткові процедури лікування після резекції дозволяють усунути мікроскопічне залишкове захворювання в ділянці пухлини.

Типовий курс лікування, для первинної пухлини або після вирізання основи пухлини, включає декілька доз. Лікування типової первинної пухлини включає 6-дозовий додаток через два тижні. Двотижневий режим лікування може бути повторений один, два, три, чотири, п'ять, шість або більше разів. Під час курсу лікування необхідність завершення запланованого дозування може бути переглянута.

#### В. Комбінована терапія

Також може виявитися корисним застосування комбінованої терапії, якщо включений другий протипухлинний засіб. "Протираковий" засіб здатний впливати на злоякісну пухлину у індивідуума, наприклад, шляхом знищення злоякісних клітин, індукції апоптозу в злоякісних клітинах, зменшення швидкості росту злоякісних клітин, зниження частоти або кількості метастазів, зменшення розміру пухлини, інгібування росту пухлини, зменшення

кровопостачання пухлини або злоякісних клітин, стимулювання імунної відповіді відносно злоякісних клітин або пухлини, запобігання або інгібування прогресування злоякісної пухлини або збільшення тривалості життя індивідуума, що має злоякісну пухлину. Протиракові засоби включають біологічні засоби (біотерапія), засоби хіміотерапії і засоби променевої терапії. У

5 цілому, ці інші композиції будуть надані з терапією за даним винаходом в об'єднаній кількості, ефективній для знищення або інгібування проліферації клітини. Цей процес може включати приведення клітин у контакт з обома засобами у один і той же час. Це може бути досягнуто шляхом приведення клітини в контакт з окремою композицією або фармакологічним складом, що включає обидва засоби, або шляхом приведення клітини в контакт з двома різними

10 композиціями або складами одночасно.

Альтернативно, терапія з застосуванням антитіла може передувати або йти за лікуванням іншим засобом з інтервалами в діапазоні від хвилин до тижнів. У варіантах здійснення, де інший засіб і антитіла застосовуються окремо до клітини, можна було б, як правило, переконатися, що значний період часу не пройшов між часом кожної доставки, так, що засіб і експресійна

15 конструкція усе ще були б у стані здійснювати переважний комбінований вплив на клітину. У таких випадках передбачається, що можна привести клітину в контакт з обома засобами з інтервалом приблизно 12-24 год. один від одного і, більш переважно, приблизно 6-12 год. один від одного. У деяких ситуаціях може бути бажаним значне продовження терміну лікування, при цьому проміжок між відповідними введеннями складає від декількох днів (2, 3, 4, 5, 6 або 7) до

20 декількох тижнів (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8).

Можуть бути використані різні комбінації, наприклад, терапія з застосуванням антитіла (з або без кон'югованого терапевтичного засобу) являє собою "А", а вторинна протиракова терапія являє собою "В":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A .

Введення терапевтичних засобів за даним винаходом пацієнту повинно відповідати загальним протоколам призначення цієї конкретної вторинної терапії, з урахуванням токсичності, якщо така є, лікування антитілом. Очікується, що цикли лікування могли б повторюватися в міру необхідності. Також передбачається, що різні стандартні терапії, а також

25 хірургічне втручання можуть застосовуватися в комбінації з описаними способами лікування злоякісних пухлин.

#### 1. Хіміотерапія

Терапія злоякісних пухлин також включає різні варіанти комбінованої терапії на основі як хімічних, так і радіаційних підходів лікування. Комбінована хіміотерапія включає, наприклад,

35 цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлоретамін, циклофосфамід, камптотецин, іфосфамід, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфамід, нітрозосечовину, дактиномицин, даунорубіцин, доксорубіцин, блеомицин, плікоміцин, мітоміцин, етопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, речовини, що зв'язуються з рецептором естрогену, таксол, гемцитабін, навелбін, інгібітори фарнезилпротеїнтрансферази, трансплатинум, 5-фторурацил, вінкрестин, вінбластин, метотрексат, темозоломід (водна форма DTIC) або будь-який аналог або похідне

40 вищевказаного. Комбінування хіміотерапії з біологічною терапією називається біохіміотерапією. Даний винахід стосується будь-якого хіміотерапевтичного засобу, що може бути використаний або відомий в даній галузі, для лікування цієї профілактики злоякісних пухлин.

#### 2. Променева терапія

Інші фактори, що викликають ушкодження ДНК і широко використовуються, включають те,

45 що загальновідомо як  $\gamma$ -промені, рентгенівські промені і/або спрямована доставка радіоіотопів до пухлинних клітин. Також передбачаються інші форми ДНК-ушкоджуючих факторів, такі як хвилі НВЧ і УФ-опромінення. Найбільше імовірно, що всі ці фактори впливають на широкий спектр ушкоджень ДНК, на попередники ДНК, реплікацію і репарацію ДНК і на збирання і підтримання хромосом. Дозові діапазони для рентгенівських променів знаходяться в діапазоні

50 від добових доз 50-200 рентгенів протягом тривалого часу (3-4 тижні) до однократних доз від 2000 до 6000 рентгенів. Дозові діапазони для радіоіотопів широко змінюються і залежать від періоду напіврозпаду ізоотопу, інтенсивності і типу випромінювання і поглинання пухлинними клітинами.

Терміни "який контактував" і "підданий дії" стосовно клітини використовуються в даному

55 документі для опису процесу, за допомогою якого терапевтична конструкція і хіміотерапевтичний або радіотерапевтичний засіб доставляються в клітини-мішені або вводяться в контакт з клітиною-мішенню. Для досягнення знищення або зупинення росту

клітини, обидва засоби доставляються в клітини в комбінованій кількості, ефективний для знищення клітини або запобігання її поділу.

### 3. Імунотерапія

Імунотерапевтичні засоби, як правило, ґрунтуються на використанні імунних ефektorних клітин і молекул для виявлення і знищення злоякісних клітин. Імунний ефektor може являти собою, наприклад, антитіло, специфічне для деяких маркерів на поверхні пухлинної клітини. Антитіло саме по собі може служити як ефektor терапії або воно може залучати інші клітини, щоб фактично здійснити знищення клітини. Антитіло також можна кон'югувати з лікарським препаратом або токсином (хіміотерапевтичним засобом, радіонуклідом, ланцюгом А рицину, холерним токсином, токсином коклюшу й ін.) і служить лише як направляючий засіб. Крім того, ефektorом може бути лімфоцит, який несе молекулу поверхні, що взаємодіє безпосередньо або непрямо з пухлинною клітиною-мішенню. Різні ефektorні клітини включають цитотоксичні Т-клітини і NK-клітини. Комбінація терапевтичних засобів, тобто пряма цитотоксична дія і інгібування або зниження фортиліну, могла б забезпечувати терапевтичний ефект при лікуванні злоякісних пухлин.

Імунотерапія також може використовуватися як частина комбінованої терапії. Загальний підхід до комбінованої терапії обговорюється нижче. В одному з аспектів імунотерапії пухлинна клітина повинна нести деякий маркер, що піддається націлюванню, тобто не є присутнім на більшості інших клітин. Існує множина пухлинних маркерів і будь-який з них може бути придатним для націлювання в контексті даного винаходу. Загальноприйняті пухлинні маркери включають карциноембріональний антиген, антиген простати, антиген, пов'язаний з пухлинами сечової системи, ембріональний антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, антиген Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, рецептор естрогену, рецептор ламініну, erb B і p155. Альтернативним аспектом імунотерапії є протипухлинні ефекти з імуностимулюючим впливом. Також існують імуностимулюючі молекули, у тому числі: цитокіни, такі як IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокіни, такі як MIP-1, MCP-1, IL-8, і фактори росту, такі як ліганд FLT3. Комбінування імуностимулюючих молекул, або як білків, або за допомогою доставки генів у сполученні з пухлинним супресором, таким як mda-7, як було показано, підсилювало протипухлинні впливи (Ju et al., 2000).

Як обговорювалося раніше, приклади імунотерапії, що знаходиться на даний час у стадії дослідження або використовується, являють собою імунні ад'юванти (наприклад, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динітрохлорбензол і ароматичні сполуки) (патент США № 5801005; патент США № 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998), терапія цитокінами (наприклад, інтерферони і; IL-1, GM-CSF і TNF) (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998), генна терапія (наприклад, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патент США № 5830880 і патент США № 5846945) і моноклональні антитіла (наприклад, проти гангліозиду GM2, проти HER-2, проти p185) (Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; патент США № 5824311). Герцептин (трастузумаб) являє собою химерне (миша-людина) моноклональне антитіло, яке блокує рецептор HER2-neu. Воно має протипухлинну активність і було схвалене для застосування при лікуванні злоякісних пухлин (Dillman, 1999). Комбінована терапія злоякісних пухлин з герцептином і хіміотерапією показала, що є більш ефективною, ніж індивідуальна терапія. Таким чином, передбачається, що одна або декілька протиракових терапій може застосовуватися з терапіями пухлинозв'язаних HLA-рестриктованих пептидів, описаних у даному документі.

Адоптивна імунотерапія. В адоптивній імунотерапії, циркулюючі у крові пацієнта лімфоцити, або протипухлинні ефektorні лімфоцити, виділяють *in vitro*, активують за допомогою лімфокінів, таких як IL-2 або трансдукованих генами некрозу пухлини, і вводять назад (Rosenberg et al., 1988; 1989). Щоб досягти цього, можна було б ввести тварині або пацієнту-людині імунологічно ефективну кількість активованих лімфоцитів у сполученні з антигенною пептидною композицією, що включає ад'ювант, як описано в даному документі. Активовані лімфоцити, найбільш переважно, повинні являти собою власні клітини пацієнта, що раніше були виділені з крові або пухлини зразка й активовані (або "їх кількість збільшена") *in vitro*. Ця форма імунотерапії викликала декілька випадків регресії меланоми і раку нирки, але відсоток реагуючих був невеликим у порівнянні з тими, хто не реагував.

Пасивна імунотерапія. Існує ряд різних підходів для пасивної імунотерапії злоякісних пухлин. Вони можуть бути приблизно розділені на наступні категорії: ін'єкція антитіл самих по собі; ін'єкція антитіл, з'єднаних з токсинами або хіміотерапевтичними засобами; ін'єкція антитіл, з'єднаних з радіоактивними ізотопами; ін'єкція антиідіотипічних антитіл і, нарешті, очищення пухлинних клітин у кістковому мозку.

Переважно, людські моноклональні антитіла використовуються в пасивній імунотерапії, оскільки вони викликають мало або зовсім не викликають побічних ефектів у пацієнта. Однак їх застосування дещо обмежене високою вартістю і дотепер здійснювалося тільки внутрішньопухлинно. Людські моноклональні антитіла до антигенів гангліозидів використовувалися внутрішньопухлинно у пацієнтів, що страждають від шкірної рецидивуючої меланоми (Irie & Morton, 1986). Регресія була відзначена у шести з десяти пацієнтів, після щоденних або щотижневих внутрішньопухлинних ін'єкцій. В іншому дослідженні, помірний успіх був досягнутий від внутрішньопухлинних ін'єкцій двома людськими моноклональними антитілами (Irie et al., 1989). Можливі терапевтичні антитіла включають анти-TNF, анти-CD25, анти-CD3, анти-CD20, CTLA-4-IG і анти-CD28.

Може бути сприятливим вводити більше ніж одне моноклональне антитіло, спрямоване проти двох різних антигенів, або навіть антитіла з множинною антигенною специфічністю. Протоколи лікування також можуть включати введення лімфокінів або інших імунних енансерів, як описано Vajogin et al. (1988). Розробка людських моноклональних антитіл описується далі більш докладно в описі.

#### 4. Генна терапія

У ще одному варіанті здійснення винаходу, вторинне лікування є генною терапією, при якій терапевтичний полінуклеотид вводять до, після або одночасно з введенням пухлиноасоційованого HLA-рестрикованого пептиду. Доставка вектора, що кодує пухлиноасоційований HLA-рестрикований пептид, у сполученні з другим вектором, що кодує один з наступних генних продуктів, буде мати комбінований антигіперпроліферативний ефект на тканини-мішені. Крім того, можна використовувати єдиний вектор, що кодує обидва гени. Різноманітність білків охоплюється винаходом, деякі з яких описані нижче. Різні гени, що можуть бути мішенню для генної терапії деякого виду в сполученні з даним винаходом, повинні бути відомі фахівцям у даній галузі і можуть включати будь-який ген, що має відношення до злоякісних пухлин.

Індуктори клітинної проліферації. Білки, що індукують клітинну проліферацію, далі розділені по категоріях залежно від функції. Загальним для всіх цих білків є здатність регулювати клітинну проліферацію. Наприклад, форма PDGF, онкоген *sis* являє собою секретований фактор росту. Онкогени рідко виникають з генів, що кодують фактори росту, і на сьогодні *sis* є єдиним відомим природним онкогенним фактором росту. В одному з варіантів здійснення даного винаходу передбачається, що антисмислова мРНК, спрямована на конкретний індуктор клітинної проліферації, використовується для запобігання експресії індуктора клітинної проліферації.

Білки FMS, ErbA, ErbB і neu є рецепторами факторів росту. Мутації в цих рецепторах приводять в результаті до втрати регуляторної функції. Наприклад, точкова мутація, що впливає на трансмембранний домен рецепторного білка Neu, приводить в результаті до онкогена neu. Онкоген *erbA* є похідним внутрішньоклітинних рецепторів для гормону щитовидної залози. Модифікований онкогенний рецептор *erbA*, як вважають, може конкурувати з ендогенним рецептором гормону щитовидної залози, викликаючи неконтрольований ріст.

Найбільший клас онкогенів включає білки, що передають сигнал (наприклад, Src, Abl і Ras). Білок Src являє собою цитоплазматичну тирозинову протеїнкіназу і його перетворення з протоонкогена в онкоген у деяких випадках відбувається в результаті мутації по тирозиновому залишку 527. На відміну від цього трансформація ГТФазного білка Ras із протоонкогена в онкоген, в одному прикладі, відбувається в результаті мутантної заміни валіну на гліцин у положенні 12 амінокислотної послідовності, зменшуючи активність ГТФази Ras. Білки Jun, Fos і Мус являють собою білки, які безпосередньо здійснюють свій вплив на ядерні функції як фактори транскрипції.

Інгібітори клітинної проліферації. Пухлиносупресорні онкогени діють для пригнічення надлишкової клітинної проліферації. Інактивація цих генів порушує їх інгібуювальну активність, що приводить до неконтрольованої проліферації. Найбільш розповсюдженими пухлинними супресорами є Rb, p53, p21 і p16. Інші гени, що можуть бути використані відповідно до даного винаходу, включають APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, *zac1*, p73, VHL, C-CAM, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, *rsk-3*, p27, злиття p27/p16 і злиття p21/p27.

Регулятори програмованої клітинної загибелі. Апоптоз, або запрограмована загибель клітини, являє собою важливий процес для нормального ембріонального розвитку, підтримання гомеостазу в дорослих тканинах і пригнічення канцерогенезу (Kerr et al., 1972). Сімейство білків Bcl-2 і ICE-подібні протеази, як було підтверджено, є важливими регуляторами і ефекторами апоптозу в інших системах. Білок Bcl-2, відкритий у зв'язку з фолікулярною лімфомою, відіграє помітну роль у контролі апоптозу і підвищенні клітинної виживаності у відповідь на різноманітні апоптичні стимули (Bakhshi et al., 1985; Cleary and Sklar, 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al.,

1985; Tsujimoto and Croce, 1986). Еволюційно консервативний білок Bcl-2, як тепер визнається, є членом сімейства споріднених білків, що можуть бути класифіковані як агоністи загибелі або антагоністи загибелі.

Після відкриття Bcl-2 було показано, що його дія полягає в пригніченні клітинної загибелі, викликаній різними сигналами порушення. Крім того, також зараз є очевидним, що існує сімейство регуляторних білків клітинної загибелі Bcl-2, що розділяють загальні структурні гомології і гомології послідовностей. Ці різні члени сімейства, як було показано, або мають подібними з Bcl-2 функціями (наприклад, Bcl<sub>XL</sub>, Bcl<sub>w</sub>, Bcl<sub>s</sub>, Mcl-1, A1, Bfl-1), або перешкоджають функції Bcl-2 і сприяють клітинній загибелі (наприклад, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

#### 5. Хірургія

Приблизно 60 % людей, що мають злоякісну пухлину, піддаються якому-небудь типу хірургічного втручання, яке включає профілактичні, діагностичні або проміжні, лікувальні і паліативні операції. Лікувальна хірургія являє собою спосіб лікування злоякісних пухлин, який може бути використаний у сполученні з іншими видами терапії, наприклад при лікуванні за даним винаходом, хіміотерапії, променевій терапії, гормональній терапії, генній терапії, імунотерапії і/або альтернативних способах лікування.

Лікувальна хірургія включає резекцію, при якій усі або частину злоякісних тканин фізично видаляють, вирізають і/або знищують. Резекція пухлини означає фізичне видалення щонайменше частини пухлини. На доповнення до резекції пухлини, лікування за допомогою хірургічного втручання включає лазерну хірургію, кріохірургію, електрохірургію і мікроскопічно контрольовану хірургію (хірургія Мооса). Далі надається, що даний винахід може використовуватися в сполученні з видаленням поверхневих злоякісних пухлин, передпухлинних станів або випадкових кількостей нормальної тканини.

Після вирізання частини від усіх злоякісних клітин, тканини або пухлини в організмі може формуватися порожнина. Лікування може виконуватися шляхом перфузії, прямою ін'єкцією або локальним нанесенням на область з додатковою протираковою терапією. Таке лікування можна повторювати, наприклад, раз на 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7 днів або кожні 1, 2, 3, 4 і 5 тижнів, або кожні 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 місяців. Ці процедури також можуть бути з різними дозуваннями.

#### С. Аутоімунні захворювання

Даний винахід також стосується лікування аутоімунного захворювання за допомогою антитіл за даним винаходом. PR1 є похідним від мієлоїдних внутрішніх білків. Протеїназа 3 (Pr3), що містить PR1, є мішенню аутоімунної атаки при гранулематозе Вегенера. Мієлопероксидаза (MPO) являє собою антиген-мішень при васкуліті невеликих судин (Franssen et al., 1996; Brouwer et al., 1994; Molldrem et al., 1996), з ознаками як Т-клітинного, так і антитіло-обумовленого імунітету у пацієнтів з цими захворюваннями. Гранулематоз Вегенера пов'язаний з продукуванням антинейтрофільних цитоплазматичних антитіл (cANCA) зі специфічністю до Pr3 (Molldrem et al., 1997), у той час як мікроскопічна ангіопатія і синдром Чарга-Стросса пов'язані з перинуклеарною ANCA (pANCA) зі специфічністю до MPO (Molldrem et al., 1999; Savage et al., 1999). Як таке, інгібування розпізнавання PR1 імунними клітинами може надавати терапевтичний ефект на аутоімунне захворювання.

Таким чином, антитіла за даним винаходом вводять індивідуумам, що страждають на аутоімунне захворювання, щоб нейтралізувати дію інших аутоантитіл (наприклад, pANCA проти протеїнази 3). Альтернативно, антитіло проектується так, щоб воно було "біспецифічним", тобто мало імунологічну специфічність до двох антигенів, де один являє собою PR1/HLA-A2, а інший - поверхневі антигени дендритних клітин на зразок DEC-205, LOX-1, RAGE, тим самим блокуючи функцію дендритних клітин у представленні антигену.

#### 1. Васкуліт

Васкуліт являє собою процес, викликаний запаленням стінок кровоносних судин, і приводить до різних розладів. Прийнята система класифікації васкулітів відсутня, незважаючи на те, що вони можуть бути класифіковані за розміром або типом залучених кровоносних судин як васкуліт великих, середніх або малих кровоносних судин. Васкуліт малих кровоносних судин визначається як васкуліт, що уражує судини, менші ніж артерії (тобто артеріоли, венули і капіляри); при цьому, васкуліт малих кровоносних судин також може включати артерії середніх розмірів. Васкуліт, пов'язаний з антинейтрофільними цитоплазматичними антитілами (ANCA), є найбільш розповсюдженою причиною васкуліту малих кровоносних судин і включає мікроскопічну ангіопатію, гранулематоз Вегенера, синдром Чарга-Стросса і деякі види лікарського васкуліту.

Гранулематоз Вегенера. Гранулематоз Вегенера являє собою рідке захворювання, що викликає запалення кровоносних судин у верхніх дихальних шляхах (ніс, пазухи, вуха), легенях і



нирках. Багато інших областей організму також можуть бути зачеплені, з артритом (запалення суглобів), що має місце майже в половині усіх випадків. Очі і шкіра також можуть бути зачеплені. Причина невідома, але гранулематоз Вегенера вважається аутоімунним захворюванням і часто класифікується як одне з ревматичних захворювань. Деструктивні ураження розвиваються у верхніх і нижніх дихальних шляхах і нирках. У нирках, ці ураження викликають гломерулонефрит, який може привести до гематурії (кров у сечі) і ниркової недостатності. Це відбувається найчастіше у віці від 30 до 50, і чоловіки уражуються в два рази частіше, ніж жінки. Він рідко зустрічається у дітей, але спостерігається у немовлят у віці 3 місяців. Захворювання нирок може швидко прогресувати, з нирковою недостатністю, що має місце протягом декількох місяців після первісного діагнозу. За відсутності лікування ниркова недостатність і смерть відбуваються в більше ніж 90 % усіх пацієнтів із гранулематозом Вегенера.

Ранні симптоми можуть включати утому, нездужання, озноб, відчуття дискомфорту в області навколо носа і пазух. Інфекції верхніх дихальних шляхів, такі як синусит або вушні інфекції часто передують діагнозу гранулематоз Вегенера. Інші симптоми верхніх дихальних шляхів включають кровотечі з носа, болі і виразки навколо отвору носа. Затяжна пропасниця без очевидної причини (пропасниця невідомого походження - FUO) може бути початковим симптомом. Нічна пітливість може супроводжувати пропасницю. Втрата апетиту і втрата ваги є загальними. Ураження шкіри зустрічаються часто, однак немає жодного ознаки ураження, пов'язаного з хворобою. Захворювання нирок є необхідним, щоб поставити остаточний діагноз - гранулематоз Вегенера. Сеча може бути з кров'ю, що найчастіше спочатку з'являється як червона або димчаста сеча. Може не бути ніяких симптомів, але це легко діагностується за допомогою лабораторних досліджень. Проблеми з очима розвиваються у значного числа пацієнтів і можуть варіювати від легкого кон'юнктивіту до серйозного запалення очного яблука і тканин навколо очного яблука. Додаткові симптоми включають слабкість, втрату апетиту, втрату ваги, кров'янисті виділення з носа, біль за пазухою, синусит, ураження усередині і навколо отвору носа, кашель, кровохаркання, криваве мокротиння, задишку, свистяче дихання, біль у грудях, кров у сечі, висипка і болі в суглобах.

Діагноз, поставлений по відібраній біопсії патологічних тканин, що може включати біопсію відкритих легень, біопсію верхніх дихальних шляхів, біопсію слизової оболонки носа, бронхоскопію з транстрахеальною біопсією, біопсію нирки, аналіз сечі, рентген грудної клітки, аспірація кісткового мозку, аналіз крові (на аутоантитіла). Лікування включає кортикостероїди, циклофосфамід, метотрексат або азатиоприн, що може привести до тривалої ремісії більше ніж у 90 % потерпілих.

Синдром Чарга-Стросса. Синдром Чарга-Стросса (CSS), також відомий як алергічний гранулематоз, являє собою форму системного васкуліту. CSS подібний до вузликового поліартеріїту, однак велика кількість еозинофілів відрізняє це захворювання. Більшість CSS-пацієнтів являє собою пацієнтів середнього віку на фоні виниклої астми або астми зі збільшуваною тяжкістю - астми, що є однією з кардинальних особливостей CSS. Симптоми астми можуть почати виявлятися задовго до настання васкуліту. Інші ранні симптоми включають поліпи носа й алергічний риніт. Захворювання часто переходить у еозинофілію, з числом, що досягає 60 %. Наступна стадія захворювання являє собою виражений васкуліт, що може включати шкіру, легені, нерви, нирки й інші органи. Залучення периферичних нервів може бути особливо виснажливим і включає біль, оніміння або поколювання в кінцівках (нейропатичний/мононевритний мультиплекс). До появи терапії CSS часто являло собою смертельне захворювання. Більшість пацієнтів умирали від надзвичайно сильного, неконтрольованого захворювання.

Причина CSS невідома, але воно нагадує багатофакторне. Незважаючи на те, що генетичний фактор може бути присутнім, тільки в дуже рідких випадках можна спостерігати CSS у двох членів однієї родини. Таким чином, фактори навколишнього середовища й інфекції мають більше шансів бути причиною, однак остаточні докази цього відсутні. Діагноз ставиться по визначеному сполученню симптомів і ознак, структурі залучення органів і по присутності деяких патологічних аналізів крові (еозинофілія, зокрема). Крім докладного анамнезу і фізичного обстеження, аналізи крові, рентген грудної клітки й інші типи відображуючих досліджень, тести нервової провідності і біопсія тканин (легень, шкіри або нервових) можуть бути виконані для допомоги в діагностиці. Для того, щоб бути класифікованим як CSS-пацієнт, пацієнт повинен відповідати щонайменше 4 з 6 наступних критеріїв: 1) астма; 2) еозинофілія [ $>10$  % по диференціальному підрахунку лейкоцитів]; 3) мононейропатія; 4) минулі легеневі інфільтрати на рентгенограмі грудної клітки; 5) аномалії додаткових пазух носа; 6) біопсія, що містить кровоносні судини з екстравазальними еозинофілами.

CSS звичайно реагує на преднізон. Початково, застосовують високі дози перорального преднізону, однак після першого місяця або близько до того, висока доза преднізону поступово зменшується протягом наступних місяців. Інші імуносупресивні препарати, такі як азатіоприн, селсепт, метотрексат або циклофосфамід, можна застосовувати на доповнення до преднізону.

## 2. Хвороба Крона

Симптоми хвороби Крона включають запалення кишечника і розвиток кишкових стенозів і свищів; невропатія нерідко супроводжує ці симптоми. Звичайно призначають протизапальні препарати, такі як 5-аміносаліцилати (наприклад, месаламін) або кортикостероїди, але вони не завжди бувають ефективні (огляд у Botoman B. A. et al., 1998). Імуносупресія циклоспорином іноді є корисною для пацієнтів, резистентних до або з непереносимістю кортикостероїдів (Brynskov et al., 1989).

Проте, хірургічна корекція в остаточному підсумку потрібна у 90 % пацієнтів; 50 % піддаються резекції товстої кишки (Leiper et al., 1998; Makowiec et al., 1998). Частота рецидивів після операції висока, складаючи 50 %, що вимагає хірургічного втручання протягом 5 років (Leiper et al., 1998; Besnard et al., 1998).

Одна з гіпотез етіології хвороби Крона полягає в тому, що неспроможність кишкового бар'єра слизової оболонки, можливо, у результаті генетичної чутливості й екологічних факторів (наприклад, паління), піддає імунну систему дії антигенів із просвіту кишечника, у тому числі бактеріальних і харчових антигенів (наприклад, Soderholm et al., 1999; Hollander et al., 1986; Hollander, 1992). Інша гіпотеза полягає в тому, що постійні кишкові інфекції патогенними мікроорганізмами, такими як *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, патологічна *Escherichia coli* або параміксовірус, стимулюють імунну відповідь; або, альтернативно, симптоми є результатом порушення регуляції імунної відповіді на всюдисущі антигени, такі як нормальна кишкова мікрофлора і метаболіти і токсини, які вона виробляє (Sartor, 1997). Була встановлена наявність антитіл IgA і IgG (ASCA) проти *Saccharomyces cerevisiae* у сироватці крові, що є у високому ступені діагностичною ознакою хвороби Крона у дітей (Ruemmele et al., 1998; Hoffenberg et al., 1999).

При хворобі Крона порушення регуляції імунної відповіді свідчить про клітинно-обумовлену імунопатологію (Murch, 1998). Однак імуносупресивні препарати, такі як циклоспорин, такролімус і месаламін, були використані для лікування кортикостероїд-резистентних випадків хвороби Крона зі змінним успіхом (Brynskov et al., 1989; Fellerman et al., 1998).

В останніх зусиллях для розробки діагностичних і лікувальних засобів проти хвороби Крона був зроблений акцент на центральну роль цитокінів (Schreiber, 1998; van Hogeand & Verspaget, 1998). Цитокіни являють собою невеликі, секретовані білки або фактори (від 5 до 20 кДа), які впливають на міжклітинні взаємодії, міжклітинні зв'язки або поведінку інших клітин. Цитокіни виробляються лімфоцитами, особливо лімфоцитами  $T_H1$  і  $T_H2$ , моноцитами, макрофагами кишечника, гранулоцитами, епітеліальними клітинами і фібробластами (огляд у Rogler & Andus, 1998; Galley & Webster, 1996). Деякі цитокіни є прозапальними (наприклад, TNF- $\alpha$ , IL-1( $\alpha$  і  $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-12 або інгібувальний фактор лейкозу (LIF)); інші є протизапальними (наприклад, антагоніст рецептора IL-1, IL-4, IL-10, IL-11 і TGF- $\beta$ ). Проте, можуть відбуватися перекриття і функціональна надмірність їх ефектів при деяких запальних захворюваннях.

В активних випадках хвороби Крона підвищені концентрації TNF- $\alpha$  і IL-6 секретуються в кровотік, і TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 і IL-8 виробляються в надлишку місцево клітинами слизової (Funakoshi et al., 1998). Ці цитокіни можуть надавати широкі впливи на фізіологічні системи, включаючи розвиток кісток, кровотворення і печінку, щитовидну залозу і нервово-психічну функцію. Крім того, у пацієнтів з хворобою Крона спостерігається дисбаланс співвідношення IL-1 $\beta$ /IL-1ra на користь прозапального IL-1 $\beta$  (Rogler & Andus, 1998; Saiki et al., 1998; Dionne et al., 1998; однак див. Kuboyama S., 1998). Одне з досліджень показало, що цитокінові профілі в зразках випорожнення можуть бути ефективним діагностичним інструментом для лікування хвороби Крона (Saiki et al., 1998).

Способи лікування, які були запропоновані для хвороби Крона, включають використання різних антагоністів цитокінів (наприклад, IL-1ra), інгібіторів (наприклад, IL-1 $\beta$ -перетворювальний фермент і антиоксиданти) і антитіл проти цитокінів (Rogler & Andus, 1998; van Hogeand & Verspaget, 1998; Reimund et al., 1998; Lugerling H. et al., 1998; McAlindon et al., 1998). Зокрема,

була спроба використання моноклональних антитіл проти TNF- $\alpha$  з деяким успіхом при лікуванні хвороби Крона (Tagan et al., 1997; Stack et al., 1997; van Dullemen et al., 1995). Ці сполуки можуть бути використані в комбінованій терапії зі сполуками за даним винаходом.

Інший підхід до лікування хвороби Крона був сфокусований на щонайменше частковій ліквідації бактеріального угруповання, що може являти собою запуск запальної реакції, і заміні його непатогенним угрупованням. Наприклад, у патенті США № 5599795 описаний спосіб профілактики і лікування хвороби Крона у пацієнтів-людей. Цей спосіб був спрямований на стерилізацію кишечника щонайменше одним антибіотиком і щонайменше одним протигрибковим засобом, щоб знищити існуючу флору і замінити її іншими, відібраними, добре охарактеризованими бактеріями, взятими від нормальних людей. Borody повідомив спосіб лікування хвороби Крона шляхом щонайменше часткового видалення існуючої мікрофлори кишечника промиванням і заміною новим бактеріальним угрупованням, введеним за допомогою фекального інокуляту від скриньованого на захворювання донора або за допомогою композиції, що містить види *Bacteroides* і *Escherichia coli* (патент США № 5443826). Однак, не відома як-небудь причина хвороби Крона, на яку могли б бути спрямовані діагностика і/або лікування.

### 3. Ревматоїдний артрит

Точна етіологія РА залишається невідомою, однак зрозуміло, що він має аутоімунні аспекти. Перші ознаки захворювання суглобів з'являються в синовіальному покривному шарі, з проліферацією синовіальних фібробластів і їх прикріпленням до суглобової поверхні на границі суглоба (Lipsky, 1998). Надалі макрофаги, Т-клітини й інші запальні клітини рекрутуються в суглоб, де вони виробляють ряд медіаторів, включаючи цитокіни інтерлейкін-1 (IL-1), який сприяє хронічним ускладненням, що ведуть до кісткової і хрящової деструкції, і фактор некрозу пухлини (TNF- $\alpha$ ), який відіграє роль у запаленні (Dinarello, 1998; Burger & Dayer, 1995; van den Berg, 2001). Концентрація IL-1 у плазмі крові значно вище у пацієнтів з РА, ніж у здорових осіб і, зокрема, у плазмі рівні IL-1 корелюють з інтенсивністю захворювання РА (Eastgate et al., 1988). Крім того, у синовіальній рідині рівні IL-1 корелювали з різними рентгенологічними і гістологічними характеристиками РА (Kahle et al., 1992; Rooney et al., 1990).

У нормальних суглобах, дія цих і інших прозапальних цитокінів врівноважуються різними протизапальними цитокінами і регуляторними факторами (Burger & Dayer, 1995). Значимість цього цитокінового балансу показана для неповнолітніх РА-пацієнтів, що мають циклічні посилення пропасниці протягом дня (Prieur et al., 1987). Після кожного піка пропасниці, фактор, що блокує дію IL-1, виявляється в сироватці крові і сечі. Цей фактор був виділений, клонований і визначений як антагоніст рецептора IL-1 (IL-1ra), член генного сімейства IL-1 (Hannum et al., 1990). IL-1ra, як випливає з назви, є природним рецепторним антагоністом, що конкурує з IL-1 за зв'язування з рецепторами IL-1 I типу і, як наслідок, блокує дію IL-1 (Arend et al., 1998). 10-100-кратний надлишок IL-1ra може бути необхідним для ефективного блокування IL-1; однак синовіальні клітини, виділені з пацієнтів з РА, очевидно, не виробляють достатньо IL-1ra, щоб протидіяти ефектам IL-1 (Firestein et al., 1994; Fujikawa et al., 1995).

### 4. Системний червоний вовчак

Системний червоний вовчак (СЧВ) являє собою аутоімунне ревматичне захворювання, яке характеризується відкладенням у тканинах аутоантитіл і імунних комплексів, що ведуть до тканинної травми (Kotzin, 1996). На відміну від аутоімунних захворювань, таких як розсіяний склероз і цукровий діабет 1 типу, СЧВ потенційно охоплює декілька систем органів, безпосередньо, і його клінічні прояви різноманітні і непостійні (огляд Kotzin & O'Dell, 1995). Наприклад, деякі пацієнти можуть продемонструвати, насамперед, шкірну висипку і болі в суглобах, показати спонтанні ремісії і практично не вимагають ліків. На іншому кінці спектра знаходяться пацієнти, які демонструють важке і прогресуюче ураження нирок, що вимагає терапії високими дозами стероїдів і цитотоксичними препаратами, такими як циклофосфамід (Kotzin, 1996).

Серологічна ознака ВКВ і доступний первинний діагностичний тест - це підвищені сироваткові рівні IgG-антитіл до складових клітинного ядра, таких як дволанцюжкова ДНК (dsDNA), одноланцюжкова ДНК (ssDNA) і хроматин. Серед цих аутоантитіл, IgG-антитіла проти dsDNA відіграють важливу роль у розвитку вовчакового гломерулонефриту (GN) (Hahn & Tsao, 1993; Ohnishi et al., 1994). Гломерулонефрит являє собою важкий стан, при якому стінки капілярів ниркових клубочків, що очищають кров, стають товще через нашарування на епітеліальній стороні клубочкових базальних мембран. Хвороба часто є хронічною і прогресуючою і може привести в результаті до ниркової недостатності.

Механізми, за допомогою яких аутоантитіла індукуються при цих аутоімунних захворюваннях, залишаються неясними. Оскільки причини ВКВ, на які могли б бути спрямовані діагностика і/або лікування, невідомі, лікування спрямоване на пригнічення імунних реакцій,

наприклад, за допомогою макролідних антибіотиків, а не на основну причину (наприклад, патент США № 4843092).

#### 5. Ювенільний ревматоїдний артрит

Ювенільний ревматоїдний артрит (ЮРА), термін для найбільш розповсюдженої форми артриту у дітей, застосовується для сімейних хвороб, які характеризуються хронічним запаленням і гіпертрофією синовіальної оболонки. Термін перекривається, але не повністю синонімічний, з сімейством хвороб, названих ювенільним хронічним артритом і/або ювенільним ідіопатичним артритом у Європі.

Sarvis (1998) і інші (Arend, 2001) припустили, що патогенез ревматичних захворювань у дорослих і дітей включає складні взаємодії між вродженим і адаптивним імунітетом. Ця складність лежить в основі труднощів пояснення патогенезу захворювання.

Системи як вродженого, так і адаптивного імунітету використовують декілька типів клітин, широкий спектр білків клітинної поверхні і секретованих білків і взаємопов'язані системи позитивного і негативного зворотного зв'язку (Lo et al., 1999). Крім того, хоча і уявно розділювані, "вроджена" і "адаптивна" гілки імунної системи функціонально перетинаються (Fearon & Locksley, 1996), і патологічні події, що відбуваються в цих точках перетину, імовірно, є дуже актуальними для розуміння авторами винаходу патогенезу дорослих і дитячих форм хронічного артриту (Warrington et al., 2001).

Поліартикулярний ЮРА являє собою окремий клінічний підтип, який характеризується запаленням і синовіальною проліферацією в декількох суглобах (чотири або більше), у тому числі в дрібних суглобах кистей (Jarvis, 2002). Цей підтип ЮРА може бути важким, як через залучення декількох суглобів, так і через здатність швидко прогресувати з часом. Незважаючи на клінічну виразність поліартикулярний ЮРА не є однорідним, і пацієнти розрізняються проявами захворювання, віком початку хвороби, прогнозом і терапевтичною відповіддю. Ці відмінності, дуже імовірно, відображують спектр мінливості в природі імунної і запальної атак, що можуть виникати при даному захворюванні (Jarvis, 1998).

#### 6. Синдром Шегрена

Первинний синдром Шегрена (SS) являє собою хронічне, повільно прогресуюче, системне аутоімунне захворювання, яке уражує переважно жінок середнього віку (співвідношення жінок і чоловіків складає 9:1), хоча його можна побачити у всіх вікових групах, у тому числі у дітей (Jonsson et al., 2002). Він характеризується лімфоцитарною інфільтрацією і деструкцією екзокринних залоз, які інфільтруються моноклеарними клітинами, включаючи CD4+, CD8+ лімфоцити і В-клітини (Jonsson et al., 2002). Крім того, екстрагландулярні (системні) прояви спостерігаються у однієї третини пацієнтів (Jonsson et al., 2001).

Гландулярна лімфоцитарна інфільтрація є прогресивною особливістю (Jonsson et al., 1993), яка при поширенні може відновити велику частину органів. Цікаво, що гландулярні інфільтрати у деяких пацієнтів нагадують ектопічні лімфоїдні мікроструктури в слинних залозах (позначені як ектопічні зародкові центри (GC)) (Salomonsson et al., 2002; Xanthou & Polihronis, 2001). При SS ектопічні GC визначаються як Т- і В-клітинні агрегати проліферуючих клітин з мережею фолікулярних дендритних клітин і активованих ендотеліальних клітин. Ці GC-подібні структури, утворені в тканині-мішені, також зображують функціональні властивості з продукуванням аутоантитіл (анти-Ro/SSA і анти-La/SSB) (Salomonsson & Jonsson, 2003).

В інших системних аутоімунних захворюваннях, таких як РА, факторів, критичних для ектопічних GC, виявлено не було. Ревматоїдні синовіальні тканини з GC, як було показано, продукують хемокіни CXCL13, CCL21 і лімфотоксин (LT)- $\beta$  (детектується на фолікулярному центрі і В-клітинах зони мантиї). Багатофакторний регресійний аналіз цих аналітів виявив CXCL13 і LT- $\beta$  як солітарні цитокіни, що прогнозують GC при ревматоїдному синовіті (Weyand & Goronzy, 2003). Нещодавно було показано, що CXCL13 і CXCR5 у слинних залозах відіграють важливу роль у запальному процесі шляхом залучення В- і Т-клітин, тим самим сприяючи лімфоїдному неогенезу і формуванню ектопічних GC при SS (Salomonsson & Larsson, 2002).

#### 7. Псоріаз

Псоріаз являє собою хронічне шкірне захворювання з масштабуванням і запаленням, що охоплює від 2 до 2,6 відсотка населення Сполучених Штатів Америки, або від 5,8 до 7,5 мільйона чоловік. Хоча захворювання зустрічається у всіх вікових групах, воно в першу чергу впливає на дорослих. Воно з'являється приблизно порівну у чоловіків і жінок. Псоріаз виникає, коли клітини шкіри швидко піднімаються від їх джерела нижче поверхні шкіри і накопичуються на поверхні, перш ніж вони мають шанс дозріти. Звичайно такий рух (також називаний оборот) займає близько місяця, але при псоріазі це може відбутися протягом всього декількох днів. У своїй типовій формі псоріаз приводить в результаті до плям товстої, червоної (збудженої) шкіри, покритої сріблястими лусочками. Ці плями, що іноді називають бляшки, як правило, сверблять

або чутливі до болю. Вони найчастіше з'являються на ліктях, колінах, на інших частинах ніг, волосистій частині голови, нижній частині спини, обличчя, долонь і підошов ніг, але вони можуть виникати на шкірі на будь-якій ділянці тіла. Ця хвороба може уражати нігті на руках, нігті на ногах і м'які тканини статевих органів і порожнини рота. Незважаючи на те, що для шкіри навколо уражених суглобів не є незвичайним розтріскування, приблизно 1 мільйон чоловік з псоріазом страждають на запалення суглобів, яке викликає симптоми артриту. Цей стан називається псоріатичний артрит.

Псоріаз представляє захворювання шкіри, кероване імунною системою, особливо за участі Т-клітин. При псоріазі Т-клітини вводяться в дію помилково і стають настільки активними, що вони викликають інші імунні реакції, які приводять до запалення і швидкого обороту клітин шкіри. Приблизно в одній третині випадків існує сімейний анамнез псоріазу. Дослідники вивчили велику кількість родин, що постраждали від псоріазу, і виявили гени, пов'язані з хворобою. Люди з псоріазом можуть помічати, що часом стан їх шкіри то погіршується, то поліпшується. Умови, що можуть викликати запалення, включають інфекції, стреси, зміни клімату, що сушать шкіру. Крім того, деякі лікарські засоби, у тому числі літій і бета-блокатори, які запропоновані при високому кров'яному тиску, можуть спровокувати спалах або посилити хворобу.

#### 8. Розсіяний склероз

Розсіяний (множинний) склероз (РС) продовжує залишатися серйозною проблемою охорони здоров'я, що уражає сотні тисяч людей щороку тільки в США, і мільйони по усьому світі. Це одне з найбільш розповсюджених захворювань центральної нервової системи (головного і спинного мозку). РС являє собою запальне захворювання, пов'язане з демієлінізацією, або втратою мієліну. Мієлін, жирна речовина, що ізолює нерви, діє як ізолятор, даючи можливість нервам передавати імпульси від однієї точки до іншої. При РС, втрата мієліну супроводжується порушенням здатності нервів проводити електричні імпульси від головного мозку і це породжує різні симптоми РС, такі як порушення зору, втрата координації, сили, чутливості, мови і ковтання, сечовипускання, статевого життя і когнітивної функції. Бляшки або ураження, де мієлін втрачений, з'являються як закруглені, рубцеподібні області. Ці рубці з'являються в різний час і в різних ділянках головного і спинного мозку, звідси і термін "множинний" склероз, що буквально означає множину шрамів.

На даний час немає жодного лабораторного тесту, симптому або фізичного виявлення, що надають остаточний діагноз РС. Ситуація ускладнюється тим, що симптоми РС можна легко переплутати з множиною інших захворювань, таких як гострий розсіяний енцефаломієліт, хвороба Лайма, ВІЛ-пов'язана мієлопатія, HTLV-I-пов'язана мієлопатія, нейросифіліс, прогресуюча мультифокальна лейкоенцефалопатія, системний червоний вовчак, вузликовий поліартеріїт, синдром Шегрена, хвороба Бехчета, саркоїдоз, паранеопластичні синдроми, підгостра комбінована дегенерація мозку, підгостра мієлооптична нейропатія, аденомієлонеуропатія, спіноцеребелярні синдроми, спадковий спастичний паразетез/первинний бічний склероз, інсульт, пухлини, артеріовенозні мальформації, арахноїдальні кісти, мальформації Арнольда-Кіарі і шийний спондильоз. Отже, діагноз РС повинен бути поставлений за допомогою процесу, який демонструє результати відповідно до РС, а також виключає інші причини.

Як правило, діагноз РС спирається на два критерії. По-перше, при цьому повинно бути два напади, щонайменше з перервою в один місяць. Напад, також відомий як загострення, спалах або рецидив, являє собою раптову появу або погіршення симптому або симптомів РС, що триває не менше 24 годин. По-друге, повинна існувати більше ніж одна область ушкодження мієлінової оболонки центральної нервової системи. Ушкодження оболонки повинно мати місце більше ніж в один момент часу, а не бути викликане якою-небудь іншою хворобою, яка може приводити до демієлінізації або аналогічних неврологічних симптомів. МРТ (магнітно-резонансна томографія) на даний час є переважним способом візуалізації мозку, щоб проводити детекцію наявності бляшок або рубцювання, викликаного РС.

При цьому діагноз РС не може бути поставлений тільки на підставі даних МРТ. Інші захворювання можуть привести до порівнянних уражень у мозку, що нагадують ті, котрі викликані РС. Крім того, ураження головного мозку, виявлені за допомогою МРТ, можуть бути досить різнорідними у різних пацієнтів, що навіть нагадують у деяких пухлини мозку або спинного мозку. Крім того, нормальний МРТ-скан не виключає діагнозу РС, оскільки невелике число пацієнтів з підтвердженням РС при МРТ не показують яких-небудь ушкоджень у тканині мозку. Ці індивідууми часто мають ураження або ушкодження спинного мозку, які не можуть бути детектовані за допомогою МРТ. Як результат, важливо, щоб ретельне клінічне обстеження також включало історію хвороби пацієнта і функціональне тестування. Воно повинно охоплювати розумові, емоційні і мовні функції, рух і координацію, зір, рівновагу і функції п'яти

органів почуттів. Стать, місце народження, сімейна історія і вік людини, коли вперше з'явилися симптоми, також є важливими факторами. Інші тести, у тому числі викликані потенціали (електричні діагностичні дослідження, що можуть виявити затримки в часах передачі нервового імпульсу центральній нервовій системі), спинномозкова рідина (при пошуку присутності клонально розповсюджених імуноглобулінових генів, названих олігоклональними смугами) і кров (щоб виключити інші причини) можуть вимагатися у певних випадках.

#### D. Комбінована терапія

Комбіновані терапії для імунних порушень, перерахованих вище, також надаються. Такі терапії будуть включати стандартні терапії, такі як протизапальні засоби і імуносупресивні препарати, використовувані в комбінації з терапевтичними способами за даним винаходом. Такі стандартні способи терапії могли б негативно впливати на імунні клітини, що викликають захворювання у індивідуума, або сприяти полегшенню таких захворювань. Цей процес може включати приведення клітин або індивідуумів у контакт з обома засобами в один і той же час. Цього можна досягти за допомогою єдиної композиції або фармакологічного складу, що включає обидва засоби, або за допомогою двох різних композицій або складів одночасно. Альтернативно, терапія з використанням антитіл може передувати або йти за іншим засобом лікування з інтервалами в діапазоні від хвилин до тижнів.

Можуть бути використані різні комбінації, наприклад терапія з використанням антитіл (з або без кон'югованого терапевтичного засобу) являє собою "А" і вторинна терапія імунного захворювання являє собою "В":

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A		
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A		

Введення терапевтичних засобів за даним винаходом пацієнту повинно відповідати загальним протоколам по призначенню цієї конкретної вторинної терапії, враховуючи токсичність, якщо така є, терапії з використанням антитіл. Очікується, що цикли лікування будуть повторюватися в міру необхідності. Також передбачається, що різні стандартні терапії, а також хірургічне втручання можуть застосовуватися в сполученні з описаною терапією.

#### VII. Приклади

Наступні приклади включені для демонстрації переважних варіантів здійснення винаходу. Фахівці в даній галузі можуть оцінити, що методики, розкриті в прикладах, що додержуються представлених методик, розкриті винахідниками, щоб добре функціонувати в практиці винаходу, і, таким чином, можуть розглядатися як такі, що представляють переважні режими для його практики. При цьому фахівці в даній галузі повинні оцінити, у світлі даного розкриття, що багато змін можуть бути зроблені в конкретних варіантах здійснення, що розкриті і як і раніше досягають подібного або аналогічного результату без відхилення від суті й обсягу винаходу.

##### Приклад 1. Способи

Продуктування антитіл. Для одержання антитіла проти об'єднаного епітопа PR1/HLA-A\*0201, автори винаходу імунізували мишей BALB/c мономерами рекомбінантного PR1/HLA-A\*0201 за допомогою підшкірного (SQ) і внутрішньоочеревинного (IP) способів, три рази з інтервалом два тижні. Спленоцити були ізольовані від імунізованих тварин, і В-клітини були злиті з HGPRT-негативними, безсмертними мієломними клітинами з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ). Гібридомні клітини потім відбирали за допомогою мономерів pp65/HLA-A\*0201 і PR1/HLA-A\*0201 і поміщали в 96-ямкові планшети для клонування до окремих клітин.

Скринінг антитіл і визначення характеристик. Моноклональні клітинні лінії (~20000) скринували за допомогою мономерів PR1/HLA-A\*0201 способом ELISA для виявлення позитивної антитіло-секретуючої гібридомі. Гібридома 8F4 була виявлена способом ELISA по специфічності до PR1/HLA-A\*0201 і охарактеризована з використанням ізотипспецифічних антитіл і антитіл легких ланцюгів імуноглобулінів.

Клонування антитіла, аналіз послідовності і дослідження зв'язування. Важкий ланцюг 8F4 був клонований з кДНК гібридомі, і була одержана первинна послідовність. Картування епітопів проводили шляхом фолдингу змінених PR1-пептидів, що містять заміни Ala у кожній з позицій P1-P9, з важким ланцюгом HLA-A\*0201 плюс мікроглобулін  $\beta$ -2. Афінність зв'язування 8F4 з PR1/HLA-A\*0201 визначали способом поверхневого плазмонного резонансу на приладі Biacore з іммобілізованим 8F4 і збільшеними концентраціями розчинного PR1/HLA-A\*0201. FACS-аналіз і конфокальне відображення були використані для вивчення зв'язування 8F4 з нормальними і патологічними клітинами.

Активність антитіла. Щоб визначити, чи запускає зв'язування 8F4 з AML лізис клітин, були виконані аналізи антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) і комплементзалежної цитотоксичності (CDC). AML-клітини з матеріалу пацієнта, для якого було показано, що він є чутливим до 8F4 CDC-опосередкованого лізису, інкубували в присутності або за відсутності 8F4 або ізотипічного контролю, а потім переносили в опромінених (200 сГр) імунodefіцітних HLA-A2 трансгенних мишей NOD/SCID. Через два тижні тварин забивали, і спленоцити і кістковий мозок аналізували за допомогою FACS.

Виділення загальної РНК. Використовували Qiagen RNA easy kit з MinElute-колонками. РНК-завантажувальний буфер готували наступним чином: додати 1 мкл броміду етидію (EtBr) (10 мг/мл) до 100 мкл, 10× барвник для нанесення ДНК, 1 % агарози в 1× ТАЕ, Н<sub>2</sub>О, що не містить РНКаз (у комплекті). Інструкції являють собою "Заморожений флакон гібридомних клітин або 1-5×10<sup>6</sup> живих клітин. Якщо активні культури доступні, осадити 1-5×10<sup>6</sup> живих клітин у 15 мл конічний пробірці, як у стадії 4, і перейти до стадії 5. Якщо доступні тільки заморожені клітини, розморозити 1 флакон з гібридомними клітинами при 37 °С, зняти з водяної бані відразу після розморозження й акуратно перемішати. Протерти флакон 70 % етанолом і відкрити ковпачок обережно, щоб уникнути контакту з нарізкою. Перенести вміст флакона в 15 мл конічну пробірку, що містить 15 мл повного середовища. Центрифугувати 100×g (-1000 об./хв. на низькошвидкісній центрифугі Sorvall) протягом 5 хв. Під час обертання додати β-меркаптоетанол до малого аліквоти буфера RLT. Обережно відібрати все середовище з клітин за допомогою 10-мл піпетки. Лізувати клітинний осад у буфер RLT за допомогою Qias shredder і додержуватися протоколу Qiagen для виділення РНК. Елюювати РНК із MinElute-колонки 2×15 мкл dH<sub>2</sub>O, що не містить РНКаз, на початкову кількість клітин (якщо з 6-ямок, елюювати 1×13 мкл). РНК повинні залишатися на льоду протягом наступних процедур. Залити 1 % агарозний міні-гель, що містить 1 мкг/мл EtBr, і протягом 15 хвилинного часу затвердіння зробити кількісний аналіз РНК. Зробити кількісний аналіз 2 мкл РНК за допомогою спектрофотометра, використовуючи той же вільний від РНКаз Н<sub>2</sub>О, описаний вище, як порожній. Розрахувати концентрацію РНК: (A<sub>260</sub>)(40) - мкг/мл, відношення A260/280 повинно бути >1,6. Перевірити якість РНК шляхом розгону 1 мкг на 1 % агарозному міні-гелі в 1× РНК-завантажувальному буфері загальним об'ємом 10 мкл. Прогнати в гелі ~1 дюйм. Аналізувати гель у фотодокументуючій системі. Нанесений зразок РНК високої якості характеризується чітко вираженими смугами 28s і 18s рибосомальних РНК в ідеальному співвідношенні 2:1 по інтенсивності. Співвідношення 1:1 може бути прийнятним, однак відсутність смуг або розмитість у нижній частині гелю свідчить про деградацію РНК і вказує на те, що ця РНК не повинна використовуватися."

Виділення й аналіз послідовності перегрупованих генів варіабельної області (V) Ig гібридами. Для одержання послідовностей ДНК із генів V важкого ланцюга (VH) і V легкого ланцюга (VL), використовували швидку ампліфікацію кДНК-кінцевої (RACE) ПЛР у сполученні з праймерами константної області важкого ланцюга людини або з праймерами константної області легкого ланцюга людини. 5'RACE кДНК-ампліфікацію виконували з використанням з BD Smart TM RACE cDNA amplification kit (BD Bioscience), додержуючись інструкцій, що до нього додаються. Були використані PFU ultra ("Stratagene"), Universla primer A mix (UPM) і генспецифічні праймери (GSP) до константної області IgG H&L людини.

Для клонування і ДНК-секвенування 5'RACE ПЛР-продуктів були використані набір для клонування TOPO (Invitrogen) і набір для екстрагування з гелю (Qiagen). Для IgG L було відібрано 8 колоній для мікрovidілення і скриновано розщепленням EcoRI. Шість позитивних клонів секвенували з праймерів M13 rev і T7. Для IgG було відібрано 8 колоній для мікрovidілення і скриновано розщепленням EcoRI. Шість позитивних клонів секвенували з праймерів M13 rev і T7.

#### Приклад 2. Результати

Продуктування антитіл. Для одержання антитіл проти об'єданого епітопа PR1/HLA-A\*0201, автори винаходу імунізували мишей BALB/c мономерами рекомбінантного PR1/HLA-A\*0201 за допомогою підшкірного (SQ) і внутрішньоочеревинного (IP) способів, три рази з інтервалом у два тижні. У імунізованих тварин відбирали спленоцити, і В-клітини зливали з негативними безсмертними мієломними клітинами HGPRT з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ). Гібридомні клітини потім відбирали з використанням мономерів pp65/HLA-A\*0201 і PR1/HLA-A\*0201 і поміщали в 96-ямкові планшети для клонування до окремих клітин.

Скринінг антитіл і визначення характеристик. Моноклональні клітинні лінії були скриновані за допомогою мономерів PR1/HLA-A\*0201 способом ELISA для виявлення позитивної антитіло-секретуючої гібридами. Майже 2000 гібридом були перевірені, і одна, названа 8F4, була виявлена способом ELISA зі специфічністю до PR1/HLA-A\*0201. Гібридому 8F4

характеризували використанням ізотипспецифічних антитіл і антитіл легкого ланцюга імуноглобуліну, і було показано, що вона секритує єдине IgG2a-к PR1/HLA-A\*0201-специфічне антитіло.

Оцінка зв'язування антитіла. Картування епітопів проводили шляхом фолдингу змінених PR1-пептидів, що містять заміни Ala у кожному з положень P1-P9, з використанням важкого ланцюга HLA-A\*0201 плюс  $\beta$ -2 мікроглобуліну. P1 виявився найбільш важливим для зв'язування 8F4, хоча зміна всіх амінокислотних положень порушувала зв'язування (Фіг. 1). Афінність зв'язування 8F4 з PR1/HLA-A\*0201 визначали способом поверхневого плазмонного резонансу на приладі Biacore з іммобілізованим 8F4 і наростаючою концентрацією розчинного PR1/HLA-A\*0201, як показано на фіг. 2.  $K_D$  для 8F4 складає 9,9 нМ, у порівнянні з  $K_D=162$  нМ для комерційно доступного мишачого моноклонального антитіла BB7.2, що розпізнає окремий алелеспецифічний сайт на HLA-A\*0201. За допомогою конфокальної мікроскопії, прямі флуоресцентні кон'югати 8F4 зв'язувалися тільки з PR1-пептид-імпульсними T2-клітинами (які експресують HLA-A\*0201), але не зі сторонніми рр65-імпульсними або не підданими імпульсам T2-клітинами. Узяті разом, були підтверджені 8F4-специфічність до і висока афінність зв'язування 8F4 з об'єднаним PR1/HLA-A\*0201. Використовуючи як FACS-аналіз, так і конфокальне відображення (знову з 8F4, FITC-кон'юговане анти-HLA-A\*0201 антитіло BB7.2 і DAPI), 8F4, як було показано, зв'язується з циркулюючими бластами від HLA-A2+-пацієнтів з AML, але не зв'язується ні з PBMC від HLA-A2+ здорових донорів, ні з HLA-A2-негативними AML-бластами (Фіг. 3 і 5).

Клонування і секвенування генів варіабельної області 8F4 миші. Гібридомні клітини 8F4 миші вирощували в середовищі RPMI-1640 (HyClone, Logan, UT), що містить 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS; HyClone) і 1 мМ пірувату натрію при 37 °C у 7,5 % CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Загальну РНК екстрагували з приблизно 10<sup>7</sup> клітин гібридами з використанням реагенту TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, відповідно до протоколу постачальника. Оліго dT-затравлену кДНК синтезували з використанням набору для ампліфікації кДНК SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA) відповідно до протоколу постачальника. Варіабельні області кДНК для важких і легких ланцюгів 8F4 були ампліфіковані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням ДНК-полімерази Phusion (New England Biolabs, Beverly, MA), використовуючи 3'-праймери, які відпалювали, відповідно, з константними областями  $\gamma$ -2a і  $\kappa$ -ланцюгів миші і Universal Primer A Mix або Nested Universal Primer A, представленого в SMARTer RACE cDNA Amplification Kit як 5'-праймера. Для ПЛР-ампліфікації варіабельної області важкого ланцюга (VH), 3'-праймер має послідовність 5'-GCCAGTGGATAGACCGATGG-3' (SEQ ID NO:46). Для ПЛР-ампліфікації варіабельної області легкого ланцюга (VL), 3'-праймер має послідовність 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO:47). Ампліфіковані VH і VL кДНК були клоновані у вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) для визначення послідовності. ДНК-секвенування варіабельних областей проводили в Tosco (Menlo Park, CA). Декілька клонів важкого і легкого ланцюгів були секвеновані, і були визначені унікальні послідовності, гомологічні типовим варіабельним областям важкого і легкого ланцюгів миші. Консенсусні послідовності кДНК разом із встановленими амінокислотними послідовностями VH і VL 8F4 показані на Фіг. 1 і 2, відповідно. Ніяких незвичайних особливостей не було помічено в послідовностях амінокислот VH і VL зрілого 8F4.

Конструювання химерного антитіла 8F4 IgG1/к. Ген, що кодує VH 8F4, був створений як екзон, що включає донорський сигнал сплайсингу і відповідні флангові сайти ферментів рестрикції, за допомогою ПЛР з використанням 8F4 VH кДНК як матриці, 5'-GCAAGTAGTACCACCATGAATTCGGGCTCAGC-3' (SEQ ID NO:48; сайт SpeI підкреслений) як 5'-праймера і 5'-CGAAAGCTTGAAGTTAGGACTCACCTGCAGAGAGAGTGACCAGAG-3' (SEQ ID NO:49; сайт HindIII підкреслений) як 3'-праймера. Крім того, ген, що кодує VL 8F4, був створений як екзон, що включає донорський сигнал сплайсингу і відповідні флангові сайти ферментів рестрикції, за допомогою ПЛР із використанням кДНК VL 8F4 як матриці, 5'-GCAGCTAGCACCATGGAGTTCACAGATTCAG-3' (SEQ ID NO:50; сайт NheI підкреслений) як 5'-праймера і 5'-CGAGAATTCTTTGGATTCTACTTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTG-3' (SEQ ID NO:51; сайт EcoRI підкреслений) як 3'-праймера. Донорські сигнали сплайсингу екзонів VH і VL 8F4 були одержані від послідовностей JH3 і J $\kappa$  зародкової лінії миші, відповідно. ПЛР-ампліфіковані фрагменти виділяли з гелю за допомогою NucleoSpin extraction II Kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) і клонували у вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) для підтвердження послідовності. Правильні V-фрагменти були розщеплені SpeI і HindIII (для VH) або NheI і EcoRI (для VL), виділені з гелю й очищені і клоновані у вектор експресії ссавців, що несе константні області  $\gamma$ -1 і  $\kappa$  людини, для продукування химерного антитіла 8F4 IgG1/к. Схематична структура результуючого вектора експресії, pCh8F4, показана на Фіг. 11.



Створення гуманізованих генів VH і VL 8F4. Проектування амінокислотних послідовностей гуманізованих VH і VL 8F4 проводили наступним чином. По-перше, була побудована тривимірна молекулярна модель варіабельних областей 8F4 з використанням запатентованого Biosciences алгоритму JN. Далі, каркасні амінокислотні залишки, важливі для формування структури CDR, були визначені з використанням молекулярної моделі. Паралельно, були відібрані кДНК-похідні VH- і VL-послідовностей амінокислот людини з високою гомологією до VH і VL 8F4, відповідно. Нарешті, послідовності CDR разом з каркасними амінокислотними залишками, важливими для підтримання структури CDR, були перенесені від VH і VL 8F4 у відповідні відібрані людські каркасні послідовності.

Для VH-послідовностей людини, гомологічних каркасним VH 8F4, був проведений пошук у базі даних GenBank, і VH-послідовність, кодована кДНК U96282 людини (U96282 VH) (номер доступу GenBank; Rassenti and Kipps, J. Exp. Med. 185:1435, 1997), була вибрана як акцептор для гуманізації. Послідовності CDR VH 8F4 були вперше переміщені у відповідні положення VH U96282. Ніякі заміни людських каркасних амінокислот, як було прогнозовано, не були необхідними для підтримання структури CDR. Послідовність амінокислот одержаних у результаті гуманізованих VH, Hu8F4 VH, показана, поряд з послідовностями 8F4 і VH U96282, на Фіг. 12.

На основі пошуку гомологій з послідовностями каркасної області VL 8F4, область Vk людини, кодована кДНК AY043146 (AY043146 VL) (вхідний номер GenBank; Ghiotto et al., поміщена в базу даних GenBank 29 червня 2001 року), була вибрана як акцептор для гуманізації. Послідовності CDR VL 8F4 уперше були переміщені у відповідні положення VL AY043146. Далі, у каркасному положенні 70, яке, як показує аналіз тривимірної моделі варіабельної області 8F4, контактує з CDR, амінокислотний залишок VL 8F4 миші був замінений на відповідний залишок людини. Послідовність амінокислот одержаних у результаті гуманізованих VL, Hu8F4 VL1, показана, поряд з послідовностями 8F4 і VL AY043146, на Фіг. 13.

Незважаючи на те, що Val у положенні 70 у VL 8F4 миші знаходиться в каркасному положенні, важливому для формування структури CDR, докладний аналіз молекулярної моделі варіабельних областей 8F4 указує на можливість того, що амінокислотний залишок у положенні 70 у VL1 Hu8F4 може бути замінений на відповідний залишок людини Asp у VL AY043146 без втрати антигензв'язувальної здатності. З метою подальшого зниження потенційної імуногенності гуманізованого антитіла 8F4, був розроблений другий гуманізований VL (Hu8F4 VL2), у якому Val у позиції 70 у VL1 Hu8F4 був замінений на Asp. Послідовність амінокислот Hu8F4 VL2 показана на Фіг. 13.

Ген, що кодує VH Hu8F4, був розроблений як екзон, включаючи сигнальний пептид, донорський сигнал сплайсингу і відповідні сайти рестрикції для наступного клонування у вектор експресії ссавців. Донорський сигнал сплайсингу екзона VH Hu8F4 був похідним від послідовності зародкової лінії JH3 людини. Сигнальна пептидна послідовність у гуманізованому екзоні VH Hu8F4 була одержана з відповідної послідовності VH 8F4 миші.

Кожний з генів, що кодують VL1 і VL2 Hu8F4, був спроектований як екзон, включаючи сигнальний пептид, донорський сигнал сплайсингу і відповідні сайти рестрикції для наступного клонування у вектор експресії ссавців. Донорський сигнал сплайсингу екзонів VL1 і VL2 Hu8F4 був похідним від послідовності зародкової лінії JK4 людини. Сигнальна пептидна послідовність у гуманізованих екзонах VL1 і VL2 Hu8F4 була одержана з відповідної послідовності VL 8F4 миші.

Гени Hu8F4, VH, VL1 і VL2 були сконструйовані GenScript USA (Piscataway, NJ) по конфіденційній нерозголошуваній угоді. Після розщеплення SpeI і HindIII (VH) або NheI і EcoRI (для VL), гени Hu8F4 VH, VL1 і VL2 були субклоновані у відповідні сайти у векторі експресії ссавців для продукування у вигляді IgG1/к людини. Результуючий вектор експресії, rHu8F4-1, експресує гуманізоване антитіло 8F4 IgG1/к, що містить VH Hu8F4 і VL1 (Hu8F4-1). Аналогічно, rHu8F4-2 експресує гуманізоване антитіло 8F4 IgG1/к, що містить VH Hu8F4 і VL2 (Hu8F4-2). Схематична структура rHu8F4-1 і rHu8F4-2 показана на Фіг. 11. Нуклеотидні послідовності генів VH Hu8F4, VL1 і VL2, поряд з виведеними амінокислотними послідовностями, показані як SEQ ID NO:22/23, 24/25 і 26/27, відповідно.

Гени VH Hu8F4 і VL2 були клоновані в інший вектор експресії ссавців для продукування варіантної форми IgG1/к людини, називаний IgG1-AA. Форма IgG1-AA несе в собі дві амінокислотні заміни в області  $\gamma$ -1 важкого ланцюга: з Leu на Ala у положенні 234 і з Leu на Ala у положенні 235 (нумерації Eu; Kabat et al., 1991), у результаті чого сильно знижується зв'язування з рецепторами Fc $\gamma$  (патент США № 6491916). Схематична структура результуючої плазмиди rHu8F4-2-AA показана на Фіг. 11.

Створення стабільних трансфектантів NS0, продукуючих химерні і гуманізовані антитіла 8F4 IgG1/к. Для одержання клітинних ліній, стабільно продукуючих IgG1/к антитіла Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA, вектори експресії pCh8F4, pHu8F4-1, pHu8F4-2 і pHu8F4-2-AA, відповідно, були введені в хромосому мієломної клітинної лінії NS0 миші (Європейська колекція культур клітин тварин, Солсбері, Уїлтшир, Великобританія). Клітини NS0 вирощували в середовищі DME, що містить 10 % FBS, при 37 °C у 7,5 % CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Стабільну трансфекцію в NS0 проводили шляхом електропорації, як описано в Bebbington et al. (Bio/Technology 10:169-175, 1992). Перед трансфекцією, кожен вектор експресії лінеаризували за допомогою FspI. Приблизно 10<sup>7</sup> клітини трансфікували 20 мкг лінеаризованої плазмиди, суспендованої у середовищі DME, що містить 10 % FBS, і засівали в декілька 96-ямкових планшетів. Через 48 годин використовували селективне середовище (середовище DME, що містить 10 % FBS, добавка до середовища HT (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 мг/мл ксантину і 1 мкг/мл мікофенолової кислоти). Приблизно через 10 днів після початку селекції супернатанти культур аналізували на продукування антитіл.

Експресію химерних і гуманізованих антитіл 8F4 IgG1/к визначали за допомогою сендвіч-аналізу ELISA. У типових експериментах, ELISA-планшети покривали протягом ночі при 4 °C 100 мкл/ямку розведеними 1/2000 козячими поліклональними специфічними антитілами проти Fcy-ланцюга IgG людини (Sigma) у PBS, промивали промивальним буфером (PBS, що містить 0,05 % Tween-20) і блокували протягом 0,5 год. при кімнатній температурі 300 мкл/ямку блокувальним буфером (PBS, що містить 2 % знежиреного молока і 0,05 % Tween-20). Після промивання промивальним буфером, 100 мкл/ямку зразків, відповідним чином розведених у ELISA-буфері (PBS, що містить 1 % знежиреного молока і 0,025 % Tween-20) були використані для ELISA-планшетів. Відповідне гуманізоване антитіло IgG1/к було використане як стандартне. Після інкубації ELISA-планшета протягом 1 год. при кімнатній температурі і промивання промивальним буфером, зв'язані антитіла детектували за допомогою 100 мкл/ямку розведених 1/2000 HRP-кон'югованих козячих поліклональних антитіл проти каппа-ланцюга людини (SouthernBiotech). Після інкубації протягом 0,5 год. при кімнатній температурі і промивання промивальним буфером, розвиток кольору здійснювали шляхом додавання 100 мкл/ямку субстрату ABTS (bioWORLD, Dublin, OH). Розвиток кольору зупиняли шляхом додавання 100 мкл/ямку 2 % щавлевої кислоти. Абсорбцію зчитували при 405 нм. Стабільні NS0 трансфектанти, продукуючі високий рівень антитіл Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA (NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 і NS0-Hu8F4-2-AA 1D3, відповідно), були адаптовані для росту в безсироваткових середовищах з використанням Hybridoma-SFM (Invitrogen). Тестування з використанням PCR Mycoplasma Detection Set (Takara Bio USA, Madison, WI) показало, що NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 і NS0-Hu8F4-2-AA 1D3 були негативними на наявність мікоплазми.

Автентичність важких і легких ланцюгів, продукованих у NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 і NS0-Hu8F4-2-AA 1D3, була підтверджена шляхом кДНК-секвенування. Тотальну РНК виділяли з клітин з використанням реагенту TRIzol (Invitrogen) і оліго dT-затравлену кДНК синтезували за допомогою Superscript III First-Strand Synthesis System для 3Т-ПЛР (Invitrogen), відповідно до протоколу постачальника. Кодуючу область важкого ланцюга  $\gamma$ -1 ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням CMV2 і JNT098 як праймерів (Фіг. 11) і ДНК-полімерази Phusion. ПЛР-фрагменти були виділені з гелю і піддані секвенуванню з використанням CMV2, JNT082, JNT097 і JNT098 як праймерів, показаних як SEQ ID NO:28 і 30-32. Аналогічним чином, кодуючу область легкого ланцюга ампліфікували за допомогою CMV2 і JNT026 (SEQ ID NO:28 і 29). Виділені з гелю й очищені фрагменти ДНК піддавали секвенуванню з використанням CMV2 і JNT026 як праймерів. Одержана нуклеотидна послідовність кодуючої області для кожного з важкого ланцюга Ch8F4, легкого ланцюга Ch8F4, важкого ланцюга Hu8F4-1, легкого ланцюга Hu8F4-1, важкого ланцюга Hu8F4-2, легкого ланцюга Hu8F4-2, важкого ланцюга Hu8F4-2-AA і легкого ланцюга Hu8F4-2-AA повністю відповідає відповідній послідовності в рCh8F4, pHu8F4-1, pHu8F4-2 або pHu8F4-2-AA векторі (SEQ ID NO:33/34, 35/36, 37/38, 39/40, 41/42 і 43/44).

Очищення антитіл 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA. Гібридому 8F4-4 (надану Dr. Molldrem) культивували в середовищі RPMI (Hyclone), що містить 10 % FBS, і адаптували для росту в Hybridoma-SFM. Клітини 8F4-4, NS0-Ch8F4 1-G8, NS0-Hu8F4-1 1-D2, NS0-Hu8F4-2 1-F5 і NS0-Hu8F4-2-AA 1D3 вирощували в Hybridoma-SFM у ролерних флаконах з густиною близько 10<sup>6</sup>/мл, підживлювали 1/10 об'єму 60 мг/мл ультрафільтрованого соєвого гідролізату (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), розчиненого в середовищі SFM4MAb (HyClone), і далі вирощували доти, поки життєздатність клітин не ставала менше, ніж 50 %. Після центрифугування і фільтрації супернатант культури навантажували на колонку з протеїн-А-

сефарозою (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Колонку промивали PBS перед елюванням антитіла 0,1М гліцин-HCl (pH 3,0). Після нейтралізації 1М Tris-HCl (pH 8), буфер для елювання антитіла був замінений на PBS за допомогою діалізу. Концентрацію антитіла визначали шляхом вимірювання оптичної густини при 280 нм (1 мг/мл=1,4 OD).

5 Очищення і вихід кожної з партій 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA узагальнені в таблиці 5.

Таблиця 5

Антитіло	Партія	Вихід
8F4-4	1/27/11	30 мг із 1 л культури
Ch8F4	8/10/10	7 мг із 500 мл культури
Hu8F4-1	9/8/10	6,5 мг із 1 л культури
Hu8F4-2	9/9/10	11 мг із 1 л культури
Hu8F4-2	1/23/11	21 мг із 1 л культури
Hu8F4-2-AA	3/15/11	10 мг із 500 мл культури

Різні очищені партії і виходи 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA.

10 Очищені 8F4-4, Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA характеризували за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію згідно зі стандартними процедурами. Аналіз в редуруючих умовах показав, що кожне з антитіл складається з важкого ланцюга з молекулярною масою близько 50 кДа і легкого ланцюга з молекулярною масою близько 25 кДа (Фіг. 14). Чистота кожного з антитіл виявилася більше ніж

15 95 %.

Характеристика антитіл Ch8F4 і Hu8F4. Зв'язування з антигеном для Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA досліджували способом ELISA з використанням комплексу PR1-пептиду (VLQELNVT (SEQ ID NO:45)) з HLA-A2 (PR1/HLA-A2). ELISA-планшет спочатку покривали 100 мкл/ямку 5 мкг/мл стрептавідину (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) у PBS. Після промивання ямок промивальним буфером (PBS, що містить 0,05 % Tween-20) і блокування з використанням блокувального буфера, додавали 50 мкл/ямку 2 мкг/мл біотинільованого PR1/HLA-A2, що був наданий Molldrem. Після 30 хв. інкубації при кімнатній температурі, ELISA-планшет промивали промивальним буфером. Антитіла Ch8F4, Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA додавали, починаючи з 1 мкг/мл і з серійними 3-кратними розведеннями в ELISA-буфері для зв'язування з PR1/HLA-A2. Після інкубації ELISA-планшета протягом 1 год. при кімнатній температурі і промивання промивальним буфером, зв'язані антитіла детектували за допомогою 100 мкл/ямку розведених 1/2000 HRP-кон'югованих козячих поліклональних антитіл проти каппа-ланцюга людини. Після інкубації протягом 30 хв. при кімнатній температурі і промивання промивальним буфером, розвиток кольору здійснювали шляхом додавання 100 мкл/ямку субстрату ABTS. Розвиток кольору зупиняли шляхом додавання 100 мкл/ямку 2 % щавлевої кислоти. Абсорбцію зчитували при 405 нм. Дані показані на Фіг. 15. Значення EC<sub>50</sub>, розраховані з використанням GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), складали 0,054 мкг/мл для Ch8F4, 0,050 мкг/мл для Hu8F4-1, 0,07 мкг/мл для Hu8F4-2 і 0,07 мкг/мл для Hu8F4-2-AA. Цей результат вказує на те, що кожне з Hu8F4-1, Hu8F4-2 і Hu8F4-2-AA зберігає афінність

20

25

30

35 зв'язування антигену антитіла 8F4 миші.

Дія антитіла відносно клітин-мішеней. Щоб визначити, чи запускає зв'язування 8F4 клітинний лізис, були виконані аналізи антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) і комплементзалежної цитотоксичності (CDC). CDC-опосередкований лізис HLA-A2+AML за допомогою 8F4, але не HLA-A2 негативних AML або HLA-A2+PBMC від здорового контрольного донора, показав залежність від дози антитіла (Фіг. 4). Клітини AML від матеріалу пацієнтів, що, як було показано, є чутливими до 8F4 CDC-опосередкованого лізису, інкубували в присутності або за відсутності 8F4 або ізотипічного контролю, а потім передавали опроміненим (200 сГр) імунodefіцитним HLA-A2 трансгенним NOD/SCID мишам. Через два тижні тварин забивали і спленоцити і кістковий мозок аналізували за допомогою FACS. При некропсії AML були виявлені тільки у тварин, підданих обробці ізотипічним контрольним IgG2a, але не у тварин, підданих обробці 8F4 (Фіг. 6). Не було ніякої очевидної токсичності у мишей, що одержували 8F4 саме по собі, у порівнянні мишами, підданими обробці ізотипічним антитілом. У цілому, ці дані підтверджують висновок про те, що моноклональне антитіло 8F4: (1) специфічно зв'язується з високою афінністю з комбінованим епітопом PR1/HLA-A\*0201; (2) специфічно зв'язується з і може бути використане для ідентифікації молекул зайнятого PR1-пептидом HLA-A\*0201 на поверхні клітин людини, у тому числі мієлоїдного лейкозу; (3) викликає специфічний лізис HLA-

40

45

50

A2+AML у присутності комплементу; (4) може перешкоджати приживленню AML у моделі імунodefіцитної миші.

Попередження приживлення пухлини. AML-інфільтрація в тканинах експериментальних мишей після ін'єкції клітин AML плюс 8F4 була визначена і показана на Фіг. 8А-В. Клітини AML не детектувалися у кістковому мозку і периферичній крові неконтрольних мишей без передачі й експериментальних мишей, оброблених 8F4. Миші, що одержували клітини AML, змішані з ізотипічним відповідним контрольним антитілом (iso), показали приживлення AML1 і AML5 через два або чотири тижні після передачі AML. Розширену панель, що включає специфічний маркер клітини миші (mCD45), 3-6 маркерів людини (CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, HLA-DR), Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen), використовували для проточного цитометричного аналізу приживлення AML. Усі панелі показують життєздатність клітин mCD45.

8F4 індукує транзйєнтну нейтропенію у HLA-A2 трансгенних NOD/SCID мишей. Мишам HLA-A2 Tg NOD/SCID, для яких показана наявність ендogenous PR1, ін'єктували 8F4 або контрольне Ab. Клітини кісткового мозку збирали й забарвлювали mAb проти антигенів миші. Зниження гранулоцитів були очевидне в розсіяних профілях кісткового мозку (Фіг. 9А; ліва панель). Незрілі нейтрофіли Gr-1<sup>lo</sup> були присутні, але зрілі нейтрофіли Gr-1<sup>hi</sup> були менш численними в кістковому мозку 8F4-оброблених мишей (Фіг. 9А; центральна панель). Крім того, моноцити (SSC<sup>lo</sup> CD11b<sup>+</sup>; Фіг. 9А; нижнє праве вікно правої панелі) були знижені у 8F4-оброблених тварин. Внутрішньовенна ін'єкція 8F4 індукувала тимчасове зниження абсолютного числа циркулюючих зрілих гранулоцитів, макрофагів і моноцитів у мишей HLA-A2 Tg NOD/SCID (Фіг. 9В). Через три тижні після лікування всі популяції зберігаються. Незначні патологічні зміни спостерігалися в печінці, легенях, селезінці, нирках, серці або мозку мишей HLA-A2 Tg NOD/SCID через 7 днів після ін'єкцій 200 мкг (10 мг/кг) 8F4 (Фіг. 9С).

8F4 індукує транзйєнтну лейкопенію в сталих людських гемопоетичних клітинах. Периферичну кров мишей відбирали для відстеження приживлення пуповинної крові, і через 9-12 тижні після перенесення мишам вводили 8F4. Мишей надалі забивали і кров, селезінку і кістковий мозок аналізували на приживлення клітин людини (Фіг. 10В). Як видно, введення антитіла тимчасово знижує % приживлення переданих клітин (Фіг. 10А).

Специфічність зв'язування, афінність і активність гуманізованого антитіла 8F4 відносно AML людини. Для характеристики специфічності зв'язування Hu8F4 автори винаходу провели FACS-аналізу, щоб показати, що Hu8F4 зв'язується тільки з PR1-імпульсними T2-клітинами (Фіг. 16А), але не з pp65-імпульсними T2-клітинами. Щоб охарактеризувати афінність зв'язування Hu8F4, автори винаходу використовували ELISA-порівняння зв'язування двох форм гуманізованих антитіл, Hu8F4-1 (Hu1) і Hu8F4-2 (Hu2) за допомогою 8F4 миші і контрольного ізотипічного антитіла (rhIgG1). Автори винаходу використовували планшети, покриті мономерним рекомбінантним PR1/HLA-A2, для захоплення антитіла, і антилюдські антитіла були використані в колориметричному аналізі, щоб визначити зв'язану фракцію по оптичній густині (OD). Як показано на Фіг. 16В, Hu1 і Hu2 показали  $K_D=7,7$  і  $7,8$  nM, відповідно, що було подібно з таким для 8F4 миші ( $K_D=9,9$  nM). Тому два гуманізованих антитіла ідентичні по специфічності ліганду й афінності порівняння з батьківським антитілом миші. Ці дані встановлюють біохімічне обґрунтування використання антитіла Hu8F4 у подальших експериментах для визначення спектра активності в доклінічних моделях на тваринах.

Для усунення можливого механізму дії Hu8F4, автори винаходу обробляли PR1-імпульсні T2-клітини-мішені Hu8F4 або контрольним ізотипічним антитілом (IgG1) у присутності комплементу кролика і визначали комплемент-опосередкований лізис за допомогою стандартного аналізу. Як показано на Фіг. 16С, ні Hu8F4, ні химерне Ch8F4 (Fc людини від IgG1 і F(ab)<sub>2</sub> миші від 8F4) не опосередковувало комплементзалежну цитотоксичність (CDC). Тому, на відміну від 8F4 (IgG2) миші, Hu8F4 не лізувало клітини-мішені за допомогою комплементу. Автори винаходу проводять подальші дослідження, щоб визначити, чи опосередковує Hu8F4 АЗКЦ, прямий апоптоз або пригнічення мітозу і проліферації в експериментах, що проводяться.

Далі, автори винаходу використовували Hu8F4 для лікування ксенотрансплантата, що прижився, первинних AML людини у NSG-мишей. Мишам спочатку приживляли AML протягом двох тижнів і потім обробляли Hu8F4, Ch8F4 або ізотипічним IgG1 3 рази на тиждень протягом 2 тижнів з 10 мг/кг антитіла. ВМ і химеризм периферичної крові аналізували після лікування. Як показано на Фіг. 17, в трьох окремих експериментах 3 різні зразки AML були або знищені, або їх ріст був значно інгібований за допомогою Hu8F4 і Ch8F4 у порівнянні ізотипічним контролем. Таким чином, ці дані встановлюють, що Hu8F4 у високому ступені біологічно активне відносно первинної AML людини від пацієнтів з резистентним до лікування рецидивуючим захворюванням і що механізм дії Hu8F4 є комплемент-незалежним, оскільки у NSG-мишей відсутня експресія ключових білків комплементу.

Біологічна безпека 8F4 в HLA-A2 трансгенних імункомпетентних (B6) і імунodefіцитних (NOD/SCID) мишах. Автори винаходу створили три мишачі моделі для доклінічного дослідження Hu8F4: HLA-A2 трансгенні B6 імункомпетентні миші, HLA-A2 трансгенні NOD/SCID миші і NSG- (з відсутністю загального γ-ланцюга IL-2) миші. Для визначення потенційної токсичності автори винаходу вперше показали, що PR1 експресується на HLA-A2 на 5 і 6 % гемопоетичних стовбурних клітин і гранулоцитів, відповідно, HLA-A2-трансгенних тварин. Далі, автори винаходу показали, що однократне внутрішньовенне введення високої дози 8F4 (10 мг/кг) індукує тимчасову і повністю оборотну цитопенію у обох HLA-A2 трансгенних мишей (Фіг. 18-19). NSG-мишам приживляли CD34-селектовану пуповинну кров людини, щоб установити довгостроковий стабільний людський химеризм, що буде лікуватися однією і декількома дозами Hu8F4, щоб визначити ефекти mAb відносно PR1/HLA-A2+ гемопоетичних стовбурних клітин людини.

H8F4, анти-PR1/HLA-A2 mAb, затримує пухлинний ріст ксенотрансплантатів з потрійного негативного раку молочної залози і продовжує життя. На доповнення до вищеописаної роботи на лейкозах автори винаходу показали, що PR1 9-мерний пептид, одержаний з гемопоетичних-рестриктивних серинових протеїназ нейтрофілів еластази (NE) і протеїнази 3 (P3), також може бути крос-представлений на HLA-A2 на багатьох негематопоетичних пухлинах, що не експресують ендогенні P3 або NE, у тому числі меланома, недрібноклітинний рак легень і рак молочної залози (Alatrash et al., 2012). Клітинна лінія потрійного негативного раку молочної залози MB-MDA-231 (іменовані як 231 клітина) не експресує P3 і NE, однак експресує HLA-A2. При цьому ці клітини поглинають розчинні P3 і NE і крос-представляють PR1, що надалі робить 231 клітини сприйнятливими до 8F4-опосередкованого лізису. Важливо, що PR1/HLA-A2 експресується на клітинах раку молочної залози біопсій пацієнтів (Alatrash et al., 2012), включаючи пацієнтів з потрійним негативним раком молочної залози (TNBC). Тому, PR1/HLA-A2 може являти собою антиген-мішень раку молочної залози, і автори винаходу зробили висновок, що 8F4 може мати біологічну активність відносно HLA-A2+ раку молочної залози.

Щоб перевірити цю гіпотезу, автори винаходу досліджували вплив h8F4 на (a) первинну пухлину і (b) ксенотрансплантатну модель метастатичної пухлини на NSG-мишах. У моделі первинної пухлини, 231 TNBC-клітини ін'єктували в молочний жировий прошарок NSG-мишей, після чого ін'єктували разову дозу h8F4, контрольного ізотипічного антитіла або PBS. 231 клітини були трансфіковані геном ffluc, так що ріст пухлини можна контролювати за часом за допомогою біолюмінесцентного відображення (BLI). H&E плями біопсій пухлинного вузла через 1-2 дні після імплантації показали пухлинну інфільтрацію нейтрофілів і макрофагів, що являють собою клітини, природно експресуючі P3 і NE (Фіг. 20A). Як показано на Фіг. 20B, ріст пухлини був затриманий у мишей, що одержували h8F4, у порівнянні з мишами, що одержували або ізотипічний контроль, або PBS. Крім того, h8F4 пролонгувало виживаність у порівнянні з контрольними мишами ( $p < 0,01$ ).

В другій моделі, модифіковану геном ffluc 231 клітину ( $2 \times 10^5$ ) вводили в хвостову вену NSG-мишей і на 7-й день мишей, що одержували 10 мг/кг h8F4 або контрольне ізотипічне антитіло 3 рази на тиждень. У необроблених NSG-мишей, ін'єктованих IV 231 клітини швидко метастазували в легенях (підтверджено BLI), а потім в інших тканинах, включаючи селезінку, шлунково-кишковий тракт і печінку. Як показано на Фіг. 20C, h8F4 значно затримувало метастатичний пухлинний ріст 231 клітин і значно збільшувало виживаність у порівнянні з мишами, обробленими ізотипічним контролем ( $p = 0,0006$ ). Ці результати дозволяють передбачити, що P3 і NE від пухлинозв'язаних нейтрофілів і макрофагів поглинаються 231 клітинами *in vivo* і PR1 крос-представляється на HLA-A2, що викликає ріст TNBC-клітин, інгібований лікуванням h8F4. Тому, h8F4 біологічно активне відносно TNBC, і результати заявників переконливо показують, що mAb h8F4 має потенціал як терапевтичний mAb для лікування негематопоетичних HLA-A2+ пухлин, включаючи рак молочної залози.

#### Приклад 3. Способи

Тканини пацієнта, клітини і клітинна культура. Блоки замороженої тканини пацієнта з раком молочної залози були закуплені в Origene. Зразки хворого і здорового донора були зібрані після того, як була одержана інформована згода на участь у дослідженні, схвалених Експертною радою при MDAnderson Cancer Center (Houston, TX). Клітинні лінії раку молочної залози MDA-MB-231, MCF-7, MDAMB-453 і T47D, і клітинні лінії SW-620 (колоректальна аденокарцинома), OVCAR-3 (аденокарцинома яєчника), MIA PaCa-2 (карцинома підшлункової залози), Jurkat (гострий Т-клітинний лейкоз), T2 (В-клітинна/Т-клітинна гібридома), HL-60 (гострий промієлоцитарний лейкоз) і U-937 (гістіоцитарний лейкоз) були одержані з американської колекції типових культур. Клітинна лінія MCF-HER-18 була надана М.-С. Hung (MD Anderson Cancer Center). Клітинні лінії меланоми Mel 526, Mel 624, MT 2019 і MT 2333 були надані L.

Radvanyi (MD Anderson Cancer Center). Справжність клітинних ліній була підтверджена ДНК-дактилоскопією в MD Anderson Cancer Center протягом 6 то використання в експериментах.

Клітини раку молочної залози вирощували в середовищі DMEM з 2,5 mM l-глутаміну (HyClone) з додаванням 10 % FBS (Gemini Bio-Products) і 100 U/мл пеніциліну і 100 мг/мл стрептоміцину (Cellgro). G418 (Lonza) (0,5 мг/мл) додавали до клітинних культур MCF-7-HER18 як селективну речовину. RPMI 1640 з 25 mM HEPES плюс l-глутамін (HyClone) була використана замість DMEM для лінійних культур клітин лейкемії. Усі клітинні лінії культивували в 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C. PBMC від здорового донора і хворого і поліморфноядерні нейтрофіли (PMN) були збагачені за допомогою стандартного Histopaque 1077 і 1119 (Sigma-Aldrich) градієнтного центрифугування, відповідно.

ЗТ-ПЛР. мРНК виділяли з клітинних ліній і зразків, одержаних за допомогою лазерної захоплювальної мікродисекції (LCM) з використанням RNA Stat 60 kit (TelTest). Синтез кднк проводили з використанням Gene Amp RNA kit (PerkinElmer). Наступні праймери були використані: P3, прямий праймер, 59-GACCCACCATGGCTCAC-39 [SEQ ID NO:52], і зворотний праймер, 59-ATGGGAAGGACAGACAGGAG-39 [SEQ ID NO:53]; Мамаглобін-1, прямий праймер, 59-AGCACTGCTACGCAGGCTCT-39 [SEQ ID NO:54], і зворотний праймер, 59-ATAAGAAAGAGAAGGTGTGG-39 [SEQ ID NO:55]; актин, прямий праймер, 59-CCAGAGCAAGAGAGCTATCC-39 [SEQ ID NO:56], і зворотний праймер, 59-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-39 [SEQ ID NO:57]; і GAPDH, прямий праймер, 59-TAGACGGGAAGCTCACTGGC-39 [SEQ ID NO:58], і зворотний праймер, 59-AGGTCCACCACCCTGTTGCT-39 [SEQ ID NO:59]. Після денатурації протягом 5 хв. при 95 °C, зразки ампліфікували протягом 35 циклів за допомогою iCycler (Bio-Rad). Зразки розганяли в 1,5 % агарозному гелі. Смуги відображали за допомогою GelDoc2000 (Bio-Rad) і аналізували за допомогою програмного забезпечення QuantityOne (Bio-Rad).

Вестерн-блотинг. Лізати цільних клітин (WCL) одержували шляхом суспендування осадів клітин у лізис-буфері (10 mM/л HEPES [pH 7,91], 10 mM/л KCl, 0,1 mM/л EGTA, 0,1 mM/л EDTO, 1 mM/л DTT), що містить інгібітори протеаз, і наступних циклів заморожування-розморожування протягом 15 хв. WCL розділяли електрофорезом у гелях з 10 % SDS у відновних умовах, переносили на полівінілідендифторидну мембрану, блокували 5 % молоком і забарвлювали антитілами проти NE (Santa Cruz Biotechnology), проти P3 (NeoMarkers), проти тубуліну (Sigma-Aldrich) або проти GAPDH (Sigma-Aldrich). Хемілюмінесценція фіксувалася плівкою Kodak.

Аг крос-представлення. Щоб визначити поглинання білка, клітини піддавали імпульсу в редукованому сироватковому середовищі (0,5 % FBS), що містить 10 мг/мл P3, NE (обидва від Athen Research & Technology), EndoGrade OVA (Hyglos), або опроміненням (7500 сГр) PMN або PBMC у співвідношенні 1:1 (рак молочної залози:опромінені клітини). Клітини потім пермеабілізували (BD Biosciences) і забарвлювали Alexa-488 або 647, безпосередньо кон'югованими анти-P3 (клон MCP3-2; Thermo Scientific) або анти-NE (Santa Cruz Biotechnology), і аналізували способом проточної цитометрії. Для визначення крос-представлення клітини поверхнево забарвлювали флуоресцентно кон'югованим 8F4, як описано раніше (Sergeeva et al., 2011). Набори Alexa-488 або 647 (Invitrogen) використовували для безпосереднього кон'югування антитілами анти-P3, анти-NE, анти-PR1/HLA-A2 (8F4). Забарвлення aqua live/dead (Invitrogen) використовували для оцінки життєздатності. Для всіх експериментів по проточній цитометрії, розсіювання світла використовували для встановлення початкового стробування, з наступним забарвленням aqua live/dead. Для пригнічення крос-представлення клітини спільно інкубували з антеградним інгібітором ендоплазматичний ретикулум (ER) - Гольджі брєфельдином А (Sigma-Aldrich) або інгібітором протеасом лактацистином (Sigma-Aldrich) (Francois et al., 2009, Kovacsics-Bankowski and Rock, 1995, i Mukai et al., 2009).

Конфокальне відображення для демонстрації внутрішньоклітинної локалізації P3 виконували з використанням конфокального мікроскопа Leica Microsystems SP2 SE (Leica) з об'єктивами 310/25 повітря, 363/1.4 масло і проаналізували за допомогою програмного забезпечення Leica LCS (версія 2.61). FITC-кон'югований лізосом-асоційований мембранний білок-2 (LAMP-2; eBioscience) використовували для забарвлення лізосом і пізніх ендосом (Kuronita et al., 2002). Проточну цитометрію проводили за допомогою проточного цитометра Cytomation CyAn (Dako). Дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення FlowJo (Tree Star).

Імуногістохімія. Кріоконсервовані пухлинні тканини молочної залози і меланоми (Origene) фіксували формаліном і потім заливали парафіном для імуногістохімії. Перед забарвленням, зрізи тканин депарафінізували в ксилолі, дегідратували і гасили для ендогенної пероксидазної активності. Зрізи блокували 10 % нормальною сироваткою коня і потім інкубували з первинними

клоном mab анти-P3 WGM2 (1:10) (Abcam) або анти-NE (Santa Cruz Biotechnology) протягом 30 хв. при кімнатній температурі. Слайди меланоми спільно забарвлювали антитілом проти мікрофталмія-асоційованого транскрипційного фактора (MITF) (Thermo Scientific). Слайди потім промивали і інкубували з вторинними антимішачими IgG-біотин Ab (1:200) (Vector Laboratories),

5 потім за допомогою авідин-біотин-пероксидази (1:100) (Vector Laboratories). Хромоген 3,3'-діамінобензидин (Dako) використовували для візуалізації забарвлення. Усі слайди піддавали контрастуючому забарвленню гематоксиліном. PMN-забарвлення нормальної тканини мигдалини використовували як позитивний контроль. Негативні контролю забарвлювали, як описано вище, після видалення первинних антитіл.

10 Пептидспецифічні CTL-лінії. PR1-специфічні CTL були експандовані шляхом стимулювання PBMC від здорових HLA-A2-донорів з PR1-пептидом *in vitro*, як описано раніше (Molldrem et al., 2000 і Molldrem et al., 1999). Коротко, T2-клітини промивали безсироватковим середовищем RPMI 1640 і інкубували з PR1-пептидом у дозі 20 мг/мл протягом 90 хв. при 37 °C. Пептид-навантажені T2-клітини опромінювали 7500 сГр, відмивали і культивували зі свіжовиділеними

15 PBMC у пропорції 1:1 у середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % сироватки АВ людини. Культури повторно стимулювали пептид-імпульсними T2-клітинами в дні 7, 14 і 21 і, наступного дня, додавали 20 IU/мл rIL-2 людини (BioSource International).

Аналіз клітинно-опосередкованої цитотоксичності. Стандартний аналіз цитотоксичності використовували для визначення специфічного лізису, як описано раніше (Molldrem et al., 1996 і

20 Molldrem et al., 1997). Коротко, 1000 клітин-мішеней у 10 мл ( $1,03 \cdot 10^5$  клітин/мл) забарвлювали кальцеїном-AM (Invitrogen) протягом 90 хв. при 37 °C, промивали три рази середовищем RPMI 1640, а потім спільно інкубували з 10 мл пептидспецифічних CTL при різних співвідношеннях Е:Т. Після 4 год. інкубації при 37 °C у 5 % CO<sub>2</sub>, у кожен ямку додавали 5 мл трипанового синього і вимірювали флуоресценцію за допомогою автоматизованого рідера CytoFluor II (PerSeptive Biosystems). Відсоток специфічної цитотоксичності був розрахований наступним чином:

25 
$$\left( \frac{[\text{флуоресценція}_{\text{мішень+ефектор}} - \text{флуоресценція}_{\text{середовище}}]}{[\text{флуоресценція}_{\text{мішень}} - \text{флуоресценція}_{\text{середовище}}]} \right) \times 100.$$

Аналіз комплемент-опосередкованої цитотоксичності. Щоб визначити, чи збільшує крос-представлення сприйнятливість раку молочної залози до 8F4, заявники провели аналіз

30 комплемент-опосередкованої цитотоксичності, як описано раніше (Sergeeva et al., 2011, і Prang et al., 2005). Клітини MDA-MB-231 культивували в середовищі, що містить NE (10 мг/мл) або P3 (10 мг/мл), протягом 24 год. Клітини інкубували з кальцеїном-AM (Invitrogen), промивали три рази і ресуспендували в безсироватковому середовищі RPMI 1640. Один мільйон клітин змішували зі збільшуваними дозами Ab 8F4 (0,624, 1,25, 2,5, 5 і 10 мг/мл) або ізотипічним Ab

35 (негативний контроль) у кінцевій концентрації 10 мг/мл і інкубували 10 хв. при 37 °C. Потім додавали стандартний кролячий комплемент (5 мл; Cedarlane Laboratories), і клітини інкубували протягом 60 хв. при 37 °C. Супернатант від гібридоми BB7.2 (джерело анти-HLA-A2) і дигітонін (Promega) використовували як позитивний контроль. Флуоресценцію вимірювали, і специфічну загибель розраховували, як описано вище.

40 Виділення LCM і РНК з пухлинної тканини молочної залози. LCM проводили з метою виділення клітин раку молочної залози з біопсії тканини пухлини грудей з використанням лазерного захоплювального мікроскопа Arktutis PixCell з IR-діодним лазером (Life Technologies, Applied Biosystems). Тканини розсікали (товщина 5 мм), поміщали на незаряджені скляні слайди і фіксували в 75 % етанолі і діетилпірокарбонатній воді. Гематоксилін використовували для

45 забарвлення ядер після гідратації тканин. Зразки зберігали в ксилолі після поетапної гідратації спиртом до готовності до LCM. Області, використовувані для мікродисекції, були визначені з використанням H&E-забарвлення. Тканину піддавали імпульсам лазерного променя з потужністю в діапазоні від 30 до 70 МВт для підтримання діаметра 10 мм. Приблизно 5000 клітин раку молочної залози були захоплені в ковпачки Arktutis Capsure HS LCM (Life

50 Technologies, Applied Biosystems). Тотальну РНК виділяли й очищали за допомогою Arktutis PicoPure RNA Isolation Kit (Life Technologies, Applied Biosystems). Цілісність і кількість РНК визначали за допомогою спектрофотометра Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific). Набір для ампліфікації РНК Arktutis RiboAmp був використаний для ампліфікації РНК за допомогою двох раундів ампліфікації на основі T7. Вихід склав 2,5 мг ампліфікованої РНК. кДНК синтезували з 1

55 мг ампліфікованої РНК за допомогою Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science), відповідно до інструкції виробника.

Забарвлення PR1-CTL у пацієнтів з раком молочної залози. PBMC-пацієнтів забарвлювали наступними люмінесцентними Ab: CD8 алофікоціанін-H7 (BD Biosciences), CD3 PE-Cy7 (BD Biosciences), CD4 спокійний оранжевий (Invitrogen), PE-кон'югований PR1/HLA-A2-декстрамер

60 (Immudex), і наступними спокійний блакитний-кон'югованими лінійними антитілами: CD14 (BD

Biosciences), CD16 (BD Biosciences) і CD19 (BioLegend). Забарвлення Aqua live/dead (Invitrogen) використовували для виключення мертвих клітин. Зразки фіксували 4 % параформальдегідом. Дані одержували на проточному цитометрі Canto (BD Biosciences) і аналізували за допомогою програмного забезпечення FlowJo (Tree Star). Частоту PR1-CTL визначали як відсоток живих клітин, що були lineage<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> і PR1-декстрамер<sup>+</sup>.

Конфокальне зображення тканин пацієнта. Зрізи кріоконсервованих тканин фіксували холодним ацетоном. Тканини раку молочної залози забарвлювали маркером раку молочної залози Alexa-488, кон'югованим з мишачим анти-цитокератин-7 (CK7) Ab (Abcam) і Alexa-647-кон'югованим 8F4 Ab (Sergeeva et al., 2011). Щоб підтвердити, що PR1/HLA-A2 експресується клітинами раку молочної залози, а не інфільтруючими лейкоцитами, послідовні зрізи тканини раку молочної залози також забарвлювали Alexa-647-кон'югованим мишачим анти-CD45 Ab (Invitrogen) як маркером лейкоцитів. Зрізи тканини мигдалини людини (Origene) були використані як контроль позитивного забарвлення для CD45. Для меланоми, зрізи тканини фіксували холодним ацетоном, пермеабілізували 0,5 % тритоном X-100 (Sigma-Aldrich) протягом 15 хв. і блокували 5 % нормальною козячою сироваткою (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Слайди потім інкубували з маркером меланоми мишачим анти-MITF (Thermo Scientific) протягом 1 год., промивали PBS і потім інкубували з Alexa-488-кон'югованим козячим анти-IgG миші (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Слайди потім промивали, блокували 5 % нормальною сироваткою миші (Jackson ImmunoResearch Laboratories) і інкубували з Alexa-647-кон'югованим 8F4 Ab. Додавали реагент проти знебарвлення ProLong Gold з DAPI (Invitrogen). Конфокальне відображення виконували з використанням конфокального мікроскопа Leica Microsystems SP2 SE з об'єктивами 310/25 повітря, 363/1.4 масло. Програмне забезпечення Leica LCS (версія 2.61) використовували для аналізу зображень.

#### Приклад 4. Результати

Поглинання NE і P3 солідними пухлинами. Щоб визначити, чи є поглинання NE і P3 повсюдним явищем, винахідники спільно культивували декілька клітинних ліній твердих пухлин з 10 мг/мл NE або P3 і потім використовували проточну цитометрію для оцінки внутрішньоклітинного поглинання. Автори винаходу показали, що не всі типи пухлин поглинають NE і P3 і, крім того, ступінь поглинання змінюється серед різних типів пухлин (Фіг. 21). Крім того, поглинання NE виходить на плато з перебігом часу і значно нижче, ніж поглинання P3, що вказує на різні механізми поглинання і передбачає рецептор-опосередкований процес, що може бути залучений у поглинання NE.

P3 відсутній у раку молочної залози. Оскільки автори винаходу раніше показали, що NE відсутній у раку молочної залози і поглинається клітинами раку молочної залози (Mittendorf et al., 2012), і щоб диференціювати поглинання P3 від ендогенної експресії, заявники проаналізували клітинні лінії раку молочної залози і первинні пухлинні тканини на експресію P3 по рівнях мРНК і білка. ПЛР показує, що кожна з ліній клітин раку молочної залози MDA-MB-231, MCF-7, MCF-7-HER18 (HER18) і MDAMB-453 не містила мРНК P3 (Фіг. 22A). Аналогічно, у клітинах раку молочної залози, витягнутих із трьох різних пухлин молочної залози (Фіг. 22B, таблиця 6), також відсутня мРНК P3. Імуноблотинг WCL клітинних ліній підтвердив відсутність білка P3 у клітинах раку молочної залози (Фіг. 22C). Імуногістохімічне забарвлення первинного раку молочної залози детектувало білок P3 у тканині молочної залози, але P3 був обмежений запальним компонентом у пухлині молочної залози, але не в пухлинних клітинах молочної залози (Фіг. 22D). Ці дані узгоджуються з попередніми повідомленнями, що демонстрували P3 у раку молочної залози (Desmedt et al., 2006), хоча дані заявників дозволяють припустити, що джерелом P3 є запальні клітини в пухлині, а не клітини раку молочної залози.



Таблиця 6

Патологічні особливості пухлинних тканин  
раку молочної залози і меланоми, використовуваних для LCM і конфокальної мікроскопії

Пацієнт	Гістологія	ER/PR/HER2-статус	TNM-стадіювання	HLA-A2-статус
Молочна залоза 1	IDC	ER2-/PR2-/HER22-	T1cNXMX	позитивний
Молочна залоза 2	IDC	ER2-/PR2-/HER2+	T2N1bMX	N/D
Молочна залоза 3	IDC/ILC	ER+/HER2+	T2N1aMX	негативний
Молочна залоза 4	IDC	ER2-/HER22-	T3N0MX	позитивний
Меланома 1	Вузлувата	N/A	T3N2M1c	позитивний
Меланома 2	N/D	N/A	T3N2M1b	негативний

ER, рецептор естрогену; HER2, HER2/neu; IDC, інвазивна протокова карцинома;  
ILC, інвазивна часткова карцинома; N/D, не визначено; PR, рецептор прогестерону;  
TNM, класифікація злоякісних пухлин пухлина/вузол/метастази.

P3 поглинається клітинами раку молочної залози. Оскільки заявники показали, що P3 не експресується ендегенно на клітинах раку молочної залози, вони припустили, що P3 може поглинатися клітинами раку молочної залози, оскільки раніше вони вже показали це для NE (Mittendorf et al., 2012). HLA-A2-позитивні клітинні лінії MDA-MB-231, MCF-7 і HER18 спільно культивували з 10 мг P3 1, 4 і 24 год. і потім аналізували за допомогою проточної цитометрії на внутрішньоклітинне поглинання P3 (Фіг. 23A). Винахідники знайшли залежні від часу збільшення поглинання P3 у всіх трьох клітинних лініях. Вони також продемонстрували дозозалежне поглинання P3, яке не виходить на плато, що свідчить про неректор-опосередкований процес поглинання P3 (Фіг. 23B). Для подальшого опису поглинання P3, оскільки воно належить до Ag крос-представлення, що виникає в різних клітинних компартментах (Cresswell et al., 2005), винахідники провели лазерну конфокальну мікроскопію і показали, що після поглинання P3 локалізується в лізосомах, що показано за допомогою спільного забарвлення P3 з LAMP-2 (Фіг. 23C). Поглинання в лізосомальні компартменти відбувалося на ранніх часових точках (1-4 год.) і може бути початковою стадією Ag-деградації, оскільки він обробляється для крос-представлення на молекулах HLA класу I (Basha et al., 2008).

Оскільки різні клітинні шляхи беруть участь у поглинанні і переробці розчинних і клітинно-асоційованих білків, для яких можна визначити, чи є вони крос-представленими (Burgdorf et al., 2006), і оскільки нейтрофіли були зареєстровані в тканинах пухлин, включаючи рак молочної залози (Queen et al., 2005, і Jensen et al., 2009), винахідники оцінили, чи існує різниця в поглинанні розчинного і клітинно-зв'язаного P3 клітинами раку молочної залози. Щоб перевірити це, клітини MDA-MB-231 спільно культивували протягом 4 год. з розчинним P3 (10 мг/мл) або з опроміненими PMN або PBMC у пропорції 1:1 (Фіг. 24A; дані не наведені). Дані показали, що клітини раку молочної залози можуть поглинати як розчинний P3, так і зв'язаний із клітинами P3. Насправді, поглинання зв'язаного з клітинами P3 виявляється більш ефективним у порівнянні з поглинанням розчинного білка (середня інтенсивність флуоресценції [MFI]=12,292 проти 1,356;  $p=0,05$ ), що може бути через асоціацію P3 з іншими білками, що могли б сприяти поглинанню.

P3 і NE є крос-представленими клітинами раку молочної залози. Оскільки винахідники показали, що NE також поглинається раком молочної залози (Mittendorf et al., 2012), і оскільки PR1 є похідним обох протеаз NE і P3 нейтрофільних азурофільних гранул, заявники досліджували, чи є NE і P3 крос-представленими клітинами раку молочної залози після поглинання. Клітини HLA-A2+MDA-MB-231 спільно культивували з розчинним P3 або NE при збільшенні часових точок, а потім аналізували на експресію PR1/HLA-A2, використовуючи мишаче анти-PR1/HLA-A2 Ab 8F4 (Sergeeva et al., 2011). Ці дані показують, що клітини раку молочної залози можуть крос-представляти PR1 як від NE, так і від P3. Значне крос-представлення PR1 спочатку спостерігали при 24 год. (Фіг. 24B) з 2,5- і 3,0-кратним збільшенням PR1/HLA-A2 на поверхні клітин раку молочної залози після культивування з NE і

P3, відповідно, у порівнянні з не підданими імпульсу клітинами. На поверхні клітин не було значного збільшення експресії HLA-A2 (дані не представлені).

Крім того, для дослідження внутрішньоклітинних механізмів, залучених у крос-представлення NE і P3, винахідники дослідили, чи беруть участь протеасоми і ER/Гольджі в крос-представленні NE і P3, як було раніше показане для інших Ag (Francois et al., 2009, Kovacsovics-Bankowski et al., 1995, і Mukai et al., 2009). Дані, одержані заявниками, показують, що ER/Гольджі і протеасоми беруть участь у крос-представленні NE і P3, оскільки інкубація клітин із брэфелдином, що інгібує антеградний транспорт з ER у Гольджі, і з лактацистином, інгібітором протеасом, в обох випадках зменшувала експресію PR1/HLA-A2 клітинами раку молочної залози MDA-MB-231 після спільного культивування з NE або P3 (Фіг. 24C, 24D). Це подібно до попередніх результатів винахідників, що демонструють участь протеасом і ER/Гольджі в крос-представленні NE і P3 APC (Alatrash et al., 2012).

Крос-представлення PR1 робить рак молочної залози сприйнятливим до PR1-спрямованої терапії. Оскільки PR1 ефективно виявляв лейкемію за допомогою PR1 пептидної вакцини (Rezvani et al., 2008), PR1-CTL (Rezvani et al., 2007 і et al., 2010) і анти-PR1/HLA-A2 Ab (8F4) (Sergeeva et al., 2011), винахідники досліджували, чи може експресія PR1/HLA-A2 на клітинах раку молочної залози після крос-представлення зробити ці клітини сприйнятливими до знищення за допомогою PR1-CTL і Ab 8F4. HLA-A2+ клітини MDA-MB-231 культивували в середовищі, що містить 10 мг/мл NE або P3, протягом 24 год. і потім інкубували з розповсюдженими від здорового донора PR1-CTL протягом 4 год. у стандартному кальцеїн-AM-аналізі цитотоксичності (Molldrem et al., 1996; Jiang et al., 1996) (Фіг. 24E). Наведені дані показують, що крос-представлення NE і P3 підвищувало сприйнятливості клітин MDA-MB-231 до знищення шляхом PR1-CTL після імпульсів NE або P3, у порівнянні з клітинами MDA-MB-231, що не піддавалися імпульсу. Аналогічним чином, використовуючи Ab 8F4 в аналізі комплементзалежної цитотоксичності (Фіг. 24F) (Sergeeva et al., 2011), винахідники спостерігали дозозалежне знищення клітин MDA-MB-231 після крос-представлення NE або P3, у порівнянні з клітинами, що не піддавалися імпульсу. Найбільший рівень знищення було відзначено для найвищої дози Ab 8F4 (10 мг/мл).

PR1/HLA-A2 і PR1-CTL виявляються у пацієнтів з раком молочної залози. Оскільки винахідники показали, що в культивованих клітинних лініях раку молочної залози і пухлинних тканинах відсутні ендогенні NE і P3, і оскільки заявники спостерігали *in vitro* докази крос-представлення NE і P3 клітинами раку молочної залози і наступну сприйнятливості до PR1-спрямованої терапії, винахідники досліджували, чи можна детектувати PR1-CTL у початкових тканинах пацієнтів з раком молочної залози і чи можна проводити детекцію PR1-CTL у периферичній крові пацієнтів з раком молочної залози. Лазерна конфокальна мікроскопія двох HLA-A2-позитивних тканин раку молочної залози показала 8F4 в обох пухлинних тканинах (Фіг. 25A). 8F4-забарвлення було відсутнє в HLA-A2-негативній тканині (дані не наведені). Крім того, щоб переконатися, що експресія PR1/HLA-A2 здійснюється клітинами раку молочної залози, а не інфільтруючими лейкоцитами, винахідники забарвлювали послідовні зрізи тканини раку молочної залози лейкоцитарним маркером CD45. Винахідники показали відсутність CD45-забарвлення в областях тканини молочної залози, що спільно забарвлювалися 8F4 і CK7, підтверджуючи тим самим, що експресія PR1/HLA-A2 здійснювалася клітинами раку молочної залози, не прилеглими запальними клітинами (Фіг. 25B).

Щоб визначити, чи можна проводити детекцію PR1-CTL у пацієнтів з раком молочної залози, заявники використовували PR1/HLA-A2 декстрамер-забарвлення 11 зразків периферичної крові пацієнтів з ранньою стадією раку молочної залози (Фіг. 25C). Середня частота PR1-CTL у цих HLA-A2+ пацієнтів склала 0,05 % CD8+ Т-клітин (у діапазоні 0,02-0,2 %), що трохи вище, ніж частота PR1-CTL у здорових донорів (від 1/15000 до 1/350000 CD8+ клітин) (Molldrem et al., 1997). Узяті разом, ці *in vivo* дані дозволяють передбачити, що серинові протеїнази NE і P3, присутні у мікрооточенні пухлини, можуть поглинатися і крос-представлятися клітинами раку молочної залози, що може сприяти адаптивній імунній відповіді відносно NE- і P3-похідного епітопа PR1.

PR1/HLA-A2 і PR1-CTL у пацієнтів з меланомою. Оскільки тканини з меланомою, як було також показано, містять запальні клітини, що можуть бути джерелом NE і P3 (Jensen et al., 2012), і оскільки меланома, як відомо, піддана імунотерапії (Dudley et al., 2002, і Schwartzentruer et al., 2011), винахідники далі досліджували, чи може крос-представлення NE і P3 також детектуватися в меланомі. Щоб визначити, чи детектується PR1-CTL також у меланомі, винахідники забарвлювали PBMC від пацієнтів з меланомою за допомогою PR1/HLA-A2 декстрамеру і детектували PR1-CTL у всіх семи пацієнтів із середньою частотою 0,014 % CD8+ Т-клітин (діапазон, 0,0053-0,019 %) (Фіг. 25C), подібний тому, що був помічений у крові від

здорових донорів. Винахідники також знайшли експресію PR1/HLA-A2 в одній HLA-A2+ (меланома 1), але не в HLA-A2<sub>2</sub> (меланома 2) тканини меланоми (Фіг. 25D).

Крос-представлення NE і P3 меланою збільшує сприйнятливість до PR1-CTL. Щоб визначити, чи може меланома експресувати NE і P3, винахідники забарвлювали тканини меланоми, одержані від пацієнтів, на NE і P3 і показали відсутність NE і P3 (Фіг. 26A, 26B). Винахідники також проаналізували експресію NE і P3 у чотирьох клітинних лініях меланоми MEL526, MEL624, MT2019 і MT2333. Вестерн-блот-аналіз показує відсутність NE і P3 у клітинних лініях меланоми (Фіг. 26C). Подібно до раку молочної залози, винахідники демонструють поглинання і крос-представлення NE і P3 клітинною лінією HLA-A2+Mel 526 (Фіг. 26D, 26E). Оскільки Ab 8F4 зв'язується з молекулою HLA-A2 (Sergeeva et al., 2011 і Porgador et al., 1997), що складає значну частину конформаційного епітопа PR1/HLA-A2, клітини Mel 526 демонструють забарвлення 8F4 перед спільним культивуванням з NE або P3 (дані не показані). Однак забарвлення 8F4 збільшується після спільного культивування з NE або P3, без збільшення HLA-A2 поверхневого забарвлення (дані не наведені), що вказує на збільшення експресії PR1/HLA-A2 на клітинній поверхні. Крім того, крос-представлення NE і P3 підвищувало сприйнятливості клітинної лінії HLA-A2+Mel 526 до знищення PR1-CTL, з найбільшим знищенням, відзначеним для найбільшого співвідношення Е:Т (Фіг. 26F).

Усі композиції і/або способи, розкриті і заявлені в даному документі, можуть бути одержані і виконані без надмірного експериментування у світлі даного опису. Незважаючи на те, що композиції і способи за даним винаходом були описані в термінах переважних варіантів здійснення, для фахівців у даній галузі повинно бути очевидно, що варіації можна застосовувати до композицій і/або способів або на стадіях або на послідовності стадій способу, описаного в даному документі, не відходячи від концепції, суті й обсягу винаходу. Більш конкретно, повинно бути очевидним, що визначені засоби, що є як хімічно, так і фізіологічно спорідненими, можуть бути замінені засобами, описаними в даному документі, незважаючи на те, що ті ж або аналогічні результати будуть досягнуті. Усі такі схожі заміники і модифікації, очевидні для фахівців у даній галузі, вважаються такими що знаходяться у межах обсягу і суті винаходу, як визначено прикладеними пунктами формули винаходу.

#### VIII. Посилання

Наступні посилання, у тій мірі, у якій вони забезпечують типові процедурні або інші деталі, що доповнюють ті, котрі викладені в даному документі, включені в даний опис як посилання.

Патент США № 4196265.

Патент США № 4472509.

Патент США № 4554101.

Патент США № 4680338.

Патент США № 4684611.

Патент США № 4797368.

Патент США № 4843092.

Патент США № 4879236.

Патент США № 4938948.

Патент США № 4952500.

Патент США № 5021236.

Патент США № 5302523.

Патент США № 5322783.

Патент США № 5384253.

Патент США № 5399363.

Патент США № 5443826.

Патент США № 5464765.

Патент США № 5466468.

Патент США № 5538877.

Патент США № 5538880.

Патент США № 5543158.

Патент США № 5550318.

Патент США № 5563055.

Патент США № 5563250.

Патент США № 5580859.

Патент США № 5589466.

Патент США № 5599795.

Патент США № 5610042.

Патент США № 5641515.

- Патент США № 5656610.  
 Патент США № 5702932.  
 Патент США № 5736524.  
 Патент США № 5739169.  
 5 Патент США № 5780448.  
 Патент США № 5789215.  
 Патент США № 5801005.  
 Патент США № 5824311.  
 Патент США № 5830880.  
 10 Патент США № 5846233.  
 Патент США № 5846945.  
 Патент США № 5856456.  
 Патент США № 5871986.  
 Патент США № 5880270.  
 15 Патент США № 5945100.  
 Патент США № 5981274.  
 Патент США № 5994136.  
 Патент США № 5994624.  
 Патент США № 6013516.  
 20 Alatrash et al., J. Immunol., 35: 309-320, 2012.  
 Antin, Blood, 82:2273-2277, 1993.  
 Arend et al., Annu. Rev. Immunol., 16:27-55, 1998.  
 Arend, Semin. Arthritis Rheum., 30(5):1-6, 2001.  
 Austin-Ward and Villaseca, Rev. Med. Chil., 126(7):838-45, 1998.  
 25 Baichwal and Sugden, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986.  
 Bajorin et al., J. Clin. Oncol., 6(5):786-92, 1988.  
 Bakhshi et al., Cell, 41(3):899-906, 1985.  
 Basha et al., Plos One, 3:e3247, 2008.  
 Beidler et al., J. Immunol., 141(11):4053-4060, 1988.  
 30 Besnard et al., Gut., 43(5):634-638, 1998.  
 Blomer et al., J. Virol., 71(9):6641-6649, 1997.  
 Brouwer et al., Clin. Exp. Immunol., 98:448-453, 1994.  
 Brynskov et al., N. Engl. J. Med., 321(13):845-850, 1989.  
 Bukowski et al., Clin. Cancer Res., 4(10):2337-47, 1998.  
 35 Burchert et al., Blood, 02:659, 2002.  
 Burgdorf et al., J. Immunol., 176:6770-6776, 2006.  
 Burger and Dayer, Neurology, 45(6S-6):S39-43, 1995.  
 Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 74(2):425-433, 1977.  
 Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.  
 40 Christodoulides et al., Microbiology, 144(Pt 11):3027-37, 1998.  
 Cleary and Sklar, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (21):7439-7443, 1985.  
 Cleary et al., J. Exp. Med., 164(1):315-320, 1986.  
 Cotten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(13):6094-6098, 1992.  
 Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988.  
 45 Cresswell et al., Immunol. Rev., 207:145-157, 2005.  
 Curiel, Nat. Immun., 13(2-3):141-164, 1994.  
 Davidson et al., J. Immunother., 21(5):389-98, 1998.  
 Desmedt et al., Int. J. Cancer, 119: 2539-2545, 2006.  
 Dillman, Cancer Biother. Radiopharm., 14(1):5-10, 1999.  
 50 Dinarello, Int. Rev. Immunol., 16:457-499, 1998.  
 Dionne et al., Clin. Exp. Immunol., 112(3):435-442, 1998.  
 Dudley et al., Science, 298: 850-854, 2002.  
 Eastgate et al., Lancet, 2:706-709, 1988.  
 Заявка EP 125023.  
 55 Заявка EP 171496.  
 Заявка EP 173494.  
 Заявка EP 184187.  
 Fechheimer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.  
 Fellerman et al., Am. J. Gastroenterol., 93(10):1860-1866, 1998.  
 60 Firestein et al., Arthritis Rheum., 37:644-652, 1994.

- Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
- Francois et al., Blood, 114: 2632-2638, 2009.
- Franssen et al., Lancet., 347:116, 1996.
- Friedmann, Science, 244:1275-1281, 1989.
- 5 Fujikawa et al., Ann. Rheum. Dis., 54:318-320, 1995.
- Funakoshi et al., Digestion, 59(1):73-78, 1998.
- Giralt and Kolb, Curr. Opin. Oncol., 8:96-102, 1996.
- Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
- 10 Grunhaus and Horwitz, Seminar in Virology, 3:237-252, 1992.
- Hanibuchi et al., Int. J. Cancer, 78(4):480-485, 1998.
- Hannum et al., Nature, 343:336-340, 1990.
- Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099, 1985.
- Hellstrand et al., Acta Oncol., 37(4):347-353, 1998.
- 15 Hoffenberg et al., J. Pediatr., 134(4):447-452, 1999.
- Hollander et al., Ann. Intern. Med., 105:883-885, 1986.
- Hollander, Scand. J. Gastroenterol., 27:721-726, 1992.
- Horwich et al. J. Virol., 64:642-650, 1990.
- Hui and Hashimoto, Infect. Immun., 66(11):5329-36, 1998.
- 20 Irie et al., Lancet., 1(8641):786-787, 1989.
- Jarvis, Curr. Opin. Rheumatol., 10(5):459-467, 1998.
- Jarvis, Pediatr. Ann., 31(7):437-446, 2002.
- Jensen et al., J. Clin. Oncol., 27:4709-4717, 2009.
- Jensen et al., Cancer, 118: 2476-2485, 2012.
- 25 Jiang et al., Br. J. Haematol., 93:606-612, 1996.
- Johnson et al., In: Biotechnology And Pharmacy, Pezzuto et al. (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
- Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986.
- Jonsson et al., Br. J. Rheumatol., 32(7):578-581 1993.
- 30 Jonsson et al., Oral Dis., 8(3):130-140, 2002.
- Jonsson et al., Trends Immunol., 22(12):653-654, 2001.
- Kaeppler et al., PlanT-cell Reports, 9:415-418, 1990.
- Kahle et al., Ann. Rheum. Dis., 51:731-734, 1992.
- Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.
- 35 Kato et al, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- Kelleher and Vos, Biotechniques, 17(6):1110-7, 1994.
- Kerr et al., Br. J. Cancer, 26(4):239-257, 1972.
- Kolb and Holler, Curr. Opin. Oncol., 9:139-145, 1997.
- Kolb et al., Blood, 86:2041-2050, 1995.
- 40 Kolb et al., Bone Marrow Transplant, 17:449-452, 1996.
- Kotzin, Cell, 85:303-306, 1996.
- Kovacsovics-Bankowski and Rock, Science, 267: 243-246, 1995.
- Kuboyama, Kurume Med. J., 45(1):33-37, 1998.
- Kuronita, J. Cell Sci., 115:4117-4131, 2002.
- 45 Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 57(1):105-32, 1982.
- Laughlin et al., J. Virol., 60(2):515-524, 1986.
- Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 8(10):3988-3996, 1988.
- Leiper et al., Baillieres Clin. Gastroenterol., 12(1):179-199, 1998.
- Lipsky, In: Harrison's principles of internal medicine, Fauci et al.(Eds.), 14<sup>th</sup> Ed., NY, McGraw-Hill, 50 1880-1888, 1998.
- Lugering et al., Ital. J. Gastroenterol. Hepatol., 30(3):338-344, 1998.
- Makowiec et al., Z. Gastroenterol., 36(8):619-624, 1998.
- Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983.
- McAlindon et al., Gut, 42(2):214-219, 1998.
- 55 McLaughlin et al., J. Virol., 62(6):1963-1973, 1988.
- Miller et al., Am. J. Clin. Oncol., 15(3):216-221, 1992.
- Mittendorf et al., Cancer Res., 72:3153-3162, 2012.
- Molldrem et al., Blood, 88:2450-2457, 1996.
- Molldrem et al., Blood, 90:2529-2534, 1997.
- 60 Molldrem et al., Cancer Res., 59:2675-2681, 1999.

- Molldrem et al., Nat. Med., 6:1018-1023, 2000.
- Molldrem et al., J. Clin. Invest., 111:639-647, 2003.
- Morrison, Science, 229(4719):1202-1207, 1985.
- Mukai, et al., J. Immunol., 183:6561-6568, 2009.
- 5 Murch, Nutrition, 14:780-783, 1998.
- Muzyczka, Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158:97-129, 1992.
- Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996.
- Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- 10 Ohnishi et al., Int. Immunol., 6:817-830, 1994.
- Omirlullah et al., Plant Mol. Biol., 21(3):415-28, 1993.
- Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975.
- Paul, Immunogenetics, 37(6):442-448, 1993.
- Pietras et al., Oncogene, 17(17):2235-49, 1998.
- 15 Porgador et al., Immunity 6: 715-726, 1997.
- Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199:183-188, 1985.
- Prang et al., Br. J. Cancer, 92:342-349, 2005.
- Prieur et al., Lancet., 2:1240-1242, 1987.
- Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.
- 20 Queen et al., Cancer Res., 65:8896-8904, 2005.
- Reimund et al., Eur. J. Clin. Invest., 28(2):145-150, 1998.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>th</sup> ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Rezvani et al., Cytotherapy 9: 245-251, 2007.
- 25 Rezvani et al., Blood, 111:236-242, 2008.
- Ridgeway, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham:Butterworth, 467-492, 1988.
- Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
- Rogler and Andus, World J. Surg., 22(4):382-389, 1998.
- 30 Rooney et al., Rheumatol. Int., 10:217-219, 1990.
- Rosenberg et al., Ann. Surg. 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg et al., N. Engl. J. Med., 319:1676, 1988.
- Roux et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9079-9083, 1989.
- Ruemmele et al., Gastroenterol., 115(4):822-829, 1998.
- 35 Saiki et al., Scand. J. Gastroenterol., 33(6):616-622, 1998.
- Salomonsson et al., Scand. J. Immunol., 55(4):336-342, 2002.
- Sartor, Am. J. Gastroenterol., 92(12):5S-11S, 1997.
- Savage et al., Immunity, 10:485-492, 1999.
- Scheibenbogen et al., Blood, 100:2132-2137, 2002.
- 40 Schreiber, Neth. J. Med., 53(6):S24-31, 1998.
- Schwartzentruber, et al., N. Engl. J. Med., 364: 2119-2127, 2011.
- Sergeeva, et al., Blood, 117: 4262-4272, 2011.
- Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst., 80(19):1553-1559, 1988.
- Soderholm et al., Gastroenterol., 117:65-72, 1999.
- 45 Stack et al., Lancet, 349(9051):521-524, 1997.
- Stites, J. Mol. Biol., 235(1):27-32, 1994.
- Sun et al., J. Steroid Biochem., 26(1):83-92, 1987.
- Targan et al., N. Engl. J. Med., 337(15):1029-1035, 1997.
- Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- 50 Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081, 1984.
- Tsujimoto and Croce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(14):5214-5218, 1986.
- Tsujimoto et al., Science, 228(4706):1440-1443, 1985.
- van den Berg, Semin. Arthritis Rheum., 30(5S-2):7-16, 2001.
- van Dullemen et al., Gastroenterol., 109(1):129-135, 1995.
- 55 VandenDriessche et al., Blood, 100(3) 813-822, 2002.
- Wada et al., Nucleic Acids Res. 18:2367-2411, 1990.
- Warrington et al., Arthritis and Rheumatism, 44:13-20, 2001.
- Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980.
- Wood et al., J. Clin. Lab. Immunol., 17(4):167-171, 1985.
- 60 Xanthou et al., Arthritis Rheum., 44(2):408-418, 2001.

Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875, 1997.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> MOLLDREM, JEFFREY  
SERGEEVA, ANNA

<120> МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В ДІАГНОСТИЦІ І  
ТЕРАПІЇ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН І АУТОІМУННОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

<130> UTFC.P1136WO

<140> Unknown

<141> 2013-07-03

<150> 61/669,967

<151> 2012-07-10

<150> 61/702,916

<151> 2012-09-19

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 429

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 1

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctg gccctcattt taaaagggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtggg tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca	180
gacaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca	240
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
caaatgagca gtctgaagtc tgaagacaca gccatgtatt actgtgcaag acatgagggg	360
ggttactacg gtagtagccc tgcttggttt gtttactggg gccaaaggac tctgggtcact	420
ctctctgca	429

<210> 2

<211> 143

<212> БІЛОК

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45



Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala  
115 120 125

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala  
130 135 140

<210> 3  
<211> 5  
<212> БИЛОК  
<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Tyr Gly Met Ser  
1 5

<210> 4  
<211> 5  
<212> БИЛОК  
<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Gly Met Ser  
1 5

<210> 5  
<211> 15  
<212> БИЛОК  
<213> Mus musculus

<400> 5

His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala Trp Phe Val Tyr  
1 5 10 15

<210> 6  
<211> 381  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<400> 6

atggagtcac agattcaggt cttgtatctc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60  
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120  
atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180  
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg acatcctacc ggtacactgg agtccctgat 240  
cgcttcactg gcagtggatc tgggacgggt ttcactttca ccatcaacag tgtccaggct 300  
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattttatta ctctccgac gttcgggtgga 360  
ggcaccaagc tggaatcaa a 381

<210> 7  
<211> 127  
<212> EIJOK  
<213> Mus musculus

<400> 7

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn  
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe  
100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 8  
<211> 11  
<212> EIJOK  
<213> Mus musculus

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 9  
 <211> 7  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 9

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 11  
 <211> 463  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 11  
 actagtacca ccatgaactt cgggctcagc ttgattttcc tggccctcat tttaaaaggt 60  
 gtccagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggagact tagtgaagcc tggaggggtcc 120  
 ctgaaactct cctgtgcagc ctctggattc actttcagtg gatatggcat gtcttggggtt 180  
 cgccagactc cagacaagag gctggagtgg gtcgcaacca ttagtagtgg tggtagttac 240  
 acctactatc cagacagtgt gaaggggcca ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300  
 acctgtacc tgcaaatgag cagtctgaag tctgaagaca cagccatgta ttactgtgca 360  
 agacatgagg ggggttacta cggtagtagc cctgcctggg ttgtttactg gggccaaggg 420  
 actctggtca ctctctctgc aggtgagtcc taacttcaag ctt 463

<210> 12  
 <211> 143  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 12

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys

20	25	30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro		
65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn		
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala		
115	120	125
Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala		
130	135	140

<210> 13  
 <211> 416  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 13	
gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct	60
ggtgttgacg gagacattgt gatgaccag tctcacaat tcatgtccac atcagtagga	120
gacaggggtca gcacacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctggat	180
caacagaaac caggacaatc tcctaaactg ctgatttact cgacatccta ccggtacact	240
ggagtccctg atcgcttcac tggcagtggg tctgggacgg ttttcacttt caccatcaac	300
agtgtccagg ctgaagacct ggcagtttat tactgtcagc aacattttat tactcctccg	360
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc	416

<210> 14  
 <211> 127  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 14

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn  
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe  
100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 15  
<211> 124  
<212> BIJOK  
<213> Mus musculus

<400> 15

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala Trp Phe Val  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala  
115 120

<210> 16  
<211> 124  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний пептид

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala Trp Phe Val  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 17  
<211> 86  
<212> БІЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Val  
20 25 30

Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Phe Thr Ile Ser  
35 40 45

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
50 55 60

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr  
65 70 75 80

Met Val Thr Val Ser Ser  
85

<210> 18  
<211> 107  
<212> BIJOK  
<213> Mus musculus

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 19  
<211> 107  
<212> BIJOK  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний пептид

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 20  
<211> 107  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний пептид

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105



<210> 21  
 <211> 80  
 <212> БІЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
 50 55 60

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 65 70 75 80

<210> 22  
 <211> 463  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 22

actagtacca ccatgaactt cgggctcagc ttgattttcc tggccctcat tttaaaagga 60  
 gtccagtgtg aagtgcagct ggtggagtct ggcggaggcc tcgtgcagcc tggaggatcc 120  
 ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc actttcagcg gatatggcat gtcttggggtt 180  
 cgccaggctc caggcaaggg gctcgaatgg gtcgcaacca ttagtagtgg tggtagttac 240  
 acctactatc cagacagtgt gaaggggcca ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300  
 tcaactgtacc tgcaaatgaa cagtctgaga gccgaagaca cagccgtgta ttactgtgca 360  
 agacatgagg gaggtacta cggtagtagc cctgcctggg ttgtttactg gggccaaggg 420  
 actatgggtca ctgtctcttc aggtaagatg ggcttccaag ctt 463

<210> 23  
 <211> 143  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 23

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1	5	10	15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	20	25	30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	35	40	45
Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	50	55	60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro	65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn	85	90	95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala	115	120	125
Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	130	135	140

<210> 24  
 <211> 416  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 24	
gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct	60
ggtgttgacg gagacattca gatgaccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtagga	120
gacaggggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt ggctggtac	180
caacagaaac caggaaaagc ccctaaactg ctgatttact ccacatccta ccggtacact	240
ggagtcacctt cacgttcag tggcagtgga tctgggaccg ttttacttt caccatcagc	300
agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattttat tactcctccc	360
acattcggtg gaggcaccaa agtggaatc aaacgtaagt gcactttcct gaattc	416

<210> 25  
 <211> 127  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 25

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe  
100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 26

<211> 416

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний праймер

<400> 26

gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct	60
ggtgttgacg gagacattca gatgaccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtagga	120
gacaggggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt ggccctgtac	180
caacagaaaac caggaaaagc ccctaaactg ctgatttact ccacatccta ccggtacact	240
ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggaccg atttcacttt caccatcagc	300
agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattttat tactcctccc	360
acattcggtg gaggcaccaa agtggaaatc aaacgtaagt gcactttcct gaattc	416

<210> 27

<211> 127

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 27

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe  
100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 28

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний праймер

<400> 28

gaaccgtcag atcgctgga gacg

24

<210> 29

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний праймер

<400> 29

tgaaagatga gctggaggac

20

<210> 30

<211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 30  
 ctttcttgtc caccttggtg 20

<210> 31  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 31  
 gctgtcctac agtcctcag 19

<210> 32  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 32  
 acgtgccaaag catcctcg 18

<210> 33  
 <211> 1422  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 33  
 atgaacttcg ggctcagctt gattttcctg gccctcattt taaaagggtg ccagtgtgag 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggccct gaaactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtggg tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180  
 gacaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca 240  
 gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300  
 caaatgagca gtctgaagtc tgaagacaca gccatgtatt actgtgcaag acatgagggg 360  
 ggttactacg gtagtagccc tgcctgggtt gtttactggg gccaaaggac tctggtcact 420  
 ctctctgcag cctccacca gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 480  
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 540  
 acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600

```

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      660
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa      720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgccccagc acctgaactc      780
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      840
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag      900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag      960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg     1020
aatggcaagg agtacaagtg caagggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc     1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc     1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1260
cctcccgctg tggactccga cggtccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag     1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac     1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga                        1422

```

<210> 34  
 <211> 473  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 34

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1           5           10          15

```

```

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
          20          25          30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45

```

```

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
          50          55          60

```

```

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65          70          75          80

```

```

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85          90          95

```

```

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met

```

100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Glu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala
		115					120					125			
Trp	Phe	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Leu	Ser	Ala	Ala
	130					135					140				
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
145					150					155					160
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
				165					170					175	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
			180					185					190		
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
		195					200					205			
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
	210					215					220				
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
225					230					235					240
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
				245					250					255	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
			260					265					270		
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
		275					280					285			
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
	290					295					300				
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
305					310					315					320
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				325					330					335	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
			340					345					350		
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln

355	360	365
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu		
370	375	380
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
385	390	395 400
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
405	410	415
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
420	425	430
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
435	440	445
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
450	455	460
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
465	470	

<210> 35  
 <211> 705  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 35	
atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga	60
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	120
atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggatatca acagaaacca	180
ggacaatctc cttaaactgct gatttactcg acatcctacc ggtacactgg agtcctgat	240
cgcttcactg gcagtggatc tgggacggtt ttcactttca ccatcaacag tgtccaggct	300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattttatta ctctccgac gttcgggtgga	360
ggcaccaagc tggaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca	420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	705



<210> 36  
 <211> 234  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 36

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn  
 85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe  
 100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210	215	220	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230		
<p>&lt;210&gt; 37</p> <p>&lt;211&gt; 1422</p> <p>&lt;212&gt; ДНК</p> <p>&lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; Синтетичний праймер</p> <p>&lt;400&gt; 37</p>			
atgaacttcg	ggctcagctt	gattttcctg	gccctcattt taaaaggagt ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg	tggagtctgg	cggaggcctc	gtgcagcctg gaggatccct gagactctcc 120
tgtgcagcct	ctggattcac	tttcagcggg	tatggcatgt cttgggttcg ccagggtcca 180
ggcaaggggc	tcgaatgggt	cgcaaccatt	agtagtgggt gtagttacac ctactatcca 240
gacagtgtga	aggggcgatt	caccatctcc	agagacaatg ccaagaactc actgtacctg 300
caaatgaaca	gtctgagagc	cgaagacaca	gccgtgtatt actgtgcaag acatgagggg 360
ggctactacg	gtagtagccc	tgcctgggtt	gtttactggg gccaagggac tatgggtcact 420
gtctcttcag	cctccacca	gggcccatcg	gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 480
acctctgggg	gcacagcggc	cctgggctgc	ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acgggtgtcgt	ggaactcagg	cgcctgacc	agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600
cagtcctcag	gactctactc	cctcagcagc	gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 660
accagacct	acatctgcaa	cgtgaatcac	aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720
gttgagccca	aatcttgtga	caaaactcac	acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 780
ctggggggac	cgtcagtctt	cctcttcccc	ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 840
cggaccctg	aggtcacatg	cgtgggtgtg	gacgtgagcc acgaagacc tgagggtcaag 900
ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggagggt	cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1020
aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1200
agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260
cctcccgctg	tggactccga	cggctccttc	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320
agcagggtgg	agcaggggaa	cgtcttctca	tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1380
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	ccgggtaaat ga 1422

<210> 38  
 <211> 473  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 38

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala  
 115 120 125

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala  
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

210	215	220
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 225 230 235 240		
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 245 250 255		
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 260 265 270		
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 275 280 285		
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 290 295 300		
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 305 310 315 320		
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 325 330 335		
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 340 345 350		
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 355 360 365		
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 370 375 380		
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 385 390 395 400		
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 405 410 415		
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 420 425 430		
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 435 440 445		
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 450 455 460		
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		

465

470

<210> 39  
<211> 705  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний праймер

<400> 39  
atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgctctgg tgttgacgga 60  
gacattcaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 120  
atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtgg cctggtagca acagaaacca 180  
ggaaaagccc ctaaactgct gatttactcc acatcctacc ggtacactgg agtcccttca 240  
cgcttcagtg gcagtggatc tgggaccgtt ttcactttca ccatcagcag tctgcagcct 300  
gaagacattg caacatatta ctgtcagcaa cattttatta ctctccacac attcgggtgga 360  
ggcaccaaag tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcca 420  
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480  
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660  
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 40  
<211> 234  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний пептид

<400> 40

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser

65		70		75		80
Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr	Val Phe Thr Phe Thr	Ile Ser			
	85	90	95			
Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Ile Ala Thr	Tyr Tyr Cys Gln Gln	His Phe			
	100	105	110			
Ile Thr Pro Pro	Thr Phe Gly Gly Gly	Thr Lys Val Glu	Ile Lys Arg			
	115	120	125			
Thr Val Ala Ala	Pro Ser Val Phe	Ile Phe Pro Pro	Ser Asp Glu Gln			
	130	135	140			
Leu Lys Ser Gly	Thr Ala Ser Val	Val Cys Leu Leu	Asn Asn Phe Tyr			
145	150	155	160			
Pro Arg Glu Ala	Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn	Ala Leu Gln Ser			
	165	170	175			
Gly Asn Ser Gln	Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser	Lys Asp Ser Thr			
	180	185	190			
Tyr Ser Leu Ser	Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys			
	195	200	205			
His Lys Val Tyr	Ala Cys Glu Val	Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro			
	210	215	220			
Val Thr Lys Ser	Phe Asn Arg Gly	Glu Cys				
225	230					

<210> 41  
 <211> 705  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 41	
atggagtcac agattcaggt ctttgatttc gtgtttctct ggttgctctgg tgttgacgga	60
gacattcaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtccgcac cagtaggaga cagggtcacc	120
atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtgg cctggtacca acagaaacca	180
ggaaaagccc ctaaactgct gatttactcc acatcctacc ggtacactgg agtcccttca	240
cgcttcagtg gcagtggtac tgggaccgat ttcactttca ccatcagcag tctgcagcct	300
gaagacattg caacatatta ctgtcagcaa cattttatta ctctccac attcggtgga	360

```

ggcaccaaag tggaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca      420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                          705

```

<210> 42  
 <211> 234  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 42

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser  
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe  
 100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

	165		170		175	
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr						
	180		185		190	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys						
	195		200		205	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro						
	210		215		220	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
	225		230			

<210> 43  
 <211> 1422  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 43

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctg gccctcattt taaaaggagt ccagtgtgaa	60
gtgcagctgg tggagtctgg cggaggcctc gtgcagcctg gaggatccct gagactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac ttccagcggg tatggcatgt cttgggttcg ccaggctcca	180
ggcaaggggc tcgaatgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca	240
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actgtacctg	300
caaatgaaca gtctgagagc cgaagacaca gccgtgtatt actgtgcaag acatgagggg	360
ggctactacg gtagtagccc tgccctgggtt gtttactggg gccaaaggac tatggtcact	420
gtctcttcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc	480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg	540
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	660
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaaa	720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccacg acctgaagct	780
gctggaggac cgtcagctct cctcttcccc caaaaacca aggacaccct catgatctcc	840
cggaccctcg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgagggtcaag	900
ttcaactgg acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctaccg tctgcacca ggactggctg	1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1080



accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc 1140  
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1200  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260  
 cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1380  
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaatt ga 1422

<210> 44  
 <211> 473  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 44

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala  
 115 120 125

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala  
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

165										170					175				
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly				
			180					185					190						
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu				
		195					200					205							
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr				
	210					215					220								
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys				
225					230					235					240				
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro				
				245					250					255					
Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys				
			260					265					270						
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val				
		275					280					285							
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr				
	290					295					300								
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu				
305					310					315					320				
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His				
				325					330					335					
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys				
			340				345						350						
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln				
		355					360					365							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu				
	370					375					380								
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro				
385					390					395					400				
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn				
				405					410					415					
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu				

420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 45  
 <211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний пептид

<400> 45

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val  
 1 5

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 46

gccagtggat agaccgatgg

20

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 47

gatggataca gttggtgcag c

21

<210> 48  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 48

gcaactagta ccaccatgaa cttcgggctc agc

33

<210> 49  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетичний праймер  
  
 <400> 49  
 cgaaagcttg aagttaggac tcacctgcag agagagtgcag cagag 45  
  
 <210> 50  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетичний праймер  
  
 <400> 50  
 gcagctagca ccaccatgga gtcacagatt cag 33  
  
 <210> 51  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетичний праймер  
  
 <400> 51  
 cgagaattct ttggattcta cttacgtttg atttccagct tgggtg 45  
  
 <210> 52  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетичний праймер  
  
 <400> 52  
 gacccaccac tggtcac 18  
  
 <210> 53  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетичний праймер  
  
 <400> 53  
 atgggaagga cagacaggag 20  
  
 <210> 54  
 <211> 20  
 <212> ДНК

<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетичний праймер	
<400>	54	
	agcactgcta cgcaggctct	20
<210>	55	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетичний праймер	
<400>	55	
	ataagaaaga gaaggtgtgg	20
<210>	56	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетичний праймер	
<400>	56	
	ccagagcaag agagctatcc	20
<210>	57	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетичний праймер	
<400>	57	
	ctgtggtggt gaagctgtag	20
<210>	58	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетичний праймер	
<400>	58	
	tagacgggaa gctcactggc	20
<210>	59	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетичний праймер	

<400> 59  
aggtccacca ccctgttgct

20

29

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

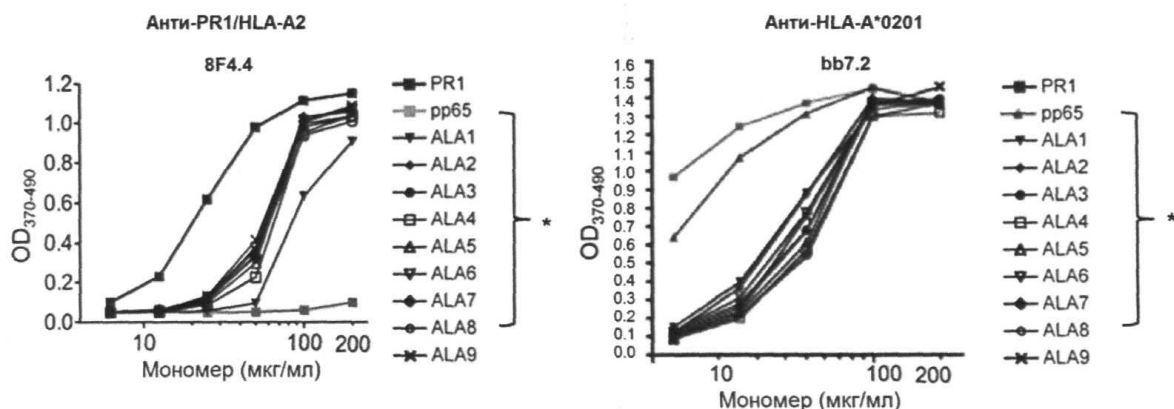
- 5 1. Гуманізоване антитіло, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при зв'язуванні з рецептором HLA-A2, вказане антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR, що складаються з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 3, 60 і 5, відповідно, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR, що складаються з амінокислотних послідовностей
- 10 SEQ ID NO: 8, 9 і 10, відповідно.
2. Антитіло за п. 1, в якому вказане антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 16, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 19 або 20.
3. Антитіло за п. 2, в якому вказане антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що
- 15 складається з послідовності SEQ ID NO: 16, і константну ділянку важкого ланцюга, яка являє собою константну ділянку важкого ланцюга гамма-1 людини, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з послідовності SEQ ID NO: 19, і константну ділянку легкого ланцюга, яка являє собою константну ділянку легкого ланцюга каппа людини.
4. Антитіло за п. 2, в якому вказане антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що
- 20 складається з послідовності SEQ ID NO: 16, і константну ділянку важкого ланцюга, яка являє собою константну ділянку важкого ланцюга гамма-1 людини, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з послідовності SEQ ID NO: 20, і константну ділянку легкого ланцюга, яка являє собою константну ділянку легкого ланцюга каппа людини.
5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4, в якому антитіло є виділеним або очищеним.
- 25 6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, в якому зазначене антитіло злите з пептидом, що не є пептидом антитіла, або поліпептидним сегментом.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, яке приєднане до діагностичного реагенту, вибраного з групи, яка складається з флуорофору, хромофору, барвника, радіоактивного ізотопу, хемілюмінесцентної молекули, парамагнітного іона або реагенту спінової пастки, або яке
- 30 приєднане до терапевтичного засобу, вибраного з групи, яка складається з цитокіну, хіміотерапевтичного засобу, радіотерапевтичного засобу, гормону, фрагмента Fc антитіла, агоніста TLR, CpG-вмісної молекули або імунної ко-стимуляторної молекули.
8. Нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла за п. 1 або 2.
9. Нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла за п. 1 або 2.
- 35 10. Вектор експресії, що містить нуклеїнову кислоту за п. 8 і/або 9.
11. Клітина-хазяїн, де нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла за п. 2, і нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла за п. 2, введені в клітину-хазяїна.
12. Клітина-хазяїн, де нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга
- 40 антитіла за п. 3, і нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла за п. 3, введені в клітину-хазяїна.
13. Спосіб одержання гуманізованого антитіла, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 11 в умовах, що підтримують експресію гуманізованого антитіла, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при зв'язуванні з рецептором HLA-A2.
- 45 14. Спосіб отримання гуманізованого антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 12 в умовах, що підтримують експресію гуманізованого антитіла, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при зв'язуванні з рецептором HLA-A2.
15. Гуманізоване антитіло, отримане способом за п. 13, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при зв'язуванні з рецептором HLA-A2.
- 50 16. Гуманізоване антитіло, отримане способом за п. 14, яке зв'язується з VLQELNVTV (SEQ ID NO: 45) при зв'язуванні з рецептором HLA-A2.
17. Антитіло за п. 15 або 16, яке приєднане до діагностичного реагенту, вибраного з групи, що складається з флуорофору, хромофору, барвника, радіоактивного ізотопу, хемілюмінесцентний молекули, парамагнітного іона або реагенту спінової пастки, або яке приєднано до
- 55 терапевтичного засобу, вибраного з групи, що складається з цитокіну, хіміотерапевтичного

засобу, радіотерапевтичного засобу, гормону, фрагмента Fc антитіла, агоніста TLR, CpG-вмісної молекули або імунної ко-стимуляторної молекули.

18. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7 або 15-17 для застосування в способі лікування індивіда зі злоякісним новоутворенням, що включає введення антитіла вказаному індивіду.

5 19. Антитіло за п. 18, де вказане злоякісне новоутворення вибране з групи, яка складається з пухлини голови і шиї, мозку, стравоходу, молочної залози, легенів, печінки, селезінки, шлунка, тонкої кишки, товстої кишки, прямої кишки, яєчників, матки, шийки матки, простати, яєчок, шкіри, або де злоякісне новоутворення являє собою злоякісне захворювання крові, вибране з групи, яка складається з лейкозу або лімфоми.

10 20. Антитіло за п. 18 або 19, де вказане злоякісне новоутворення є рецидивним або метастатичним.

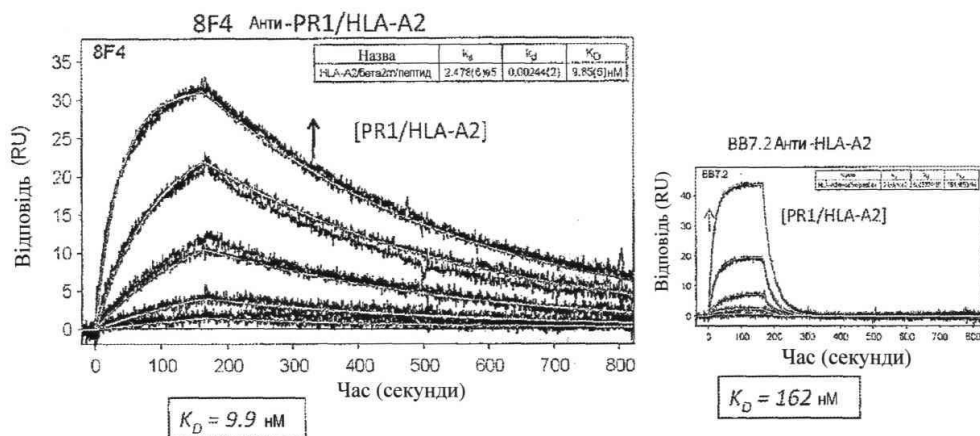


\*Нонамерні пептиди з єдиною амінокислотою заміною в лінійній послідовності PR1

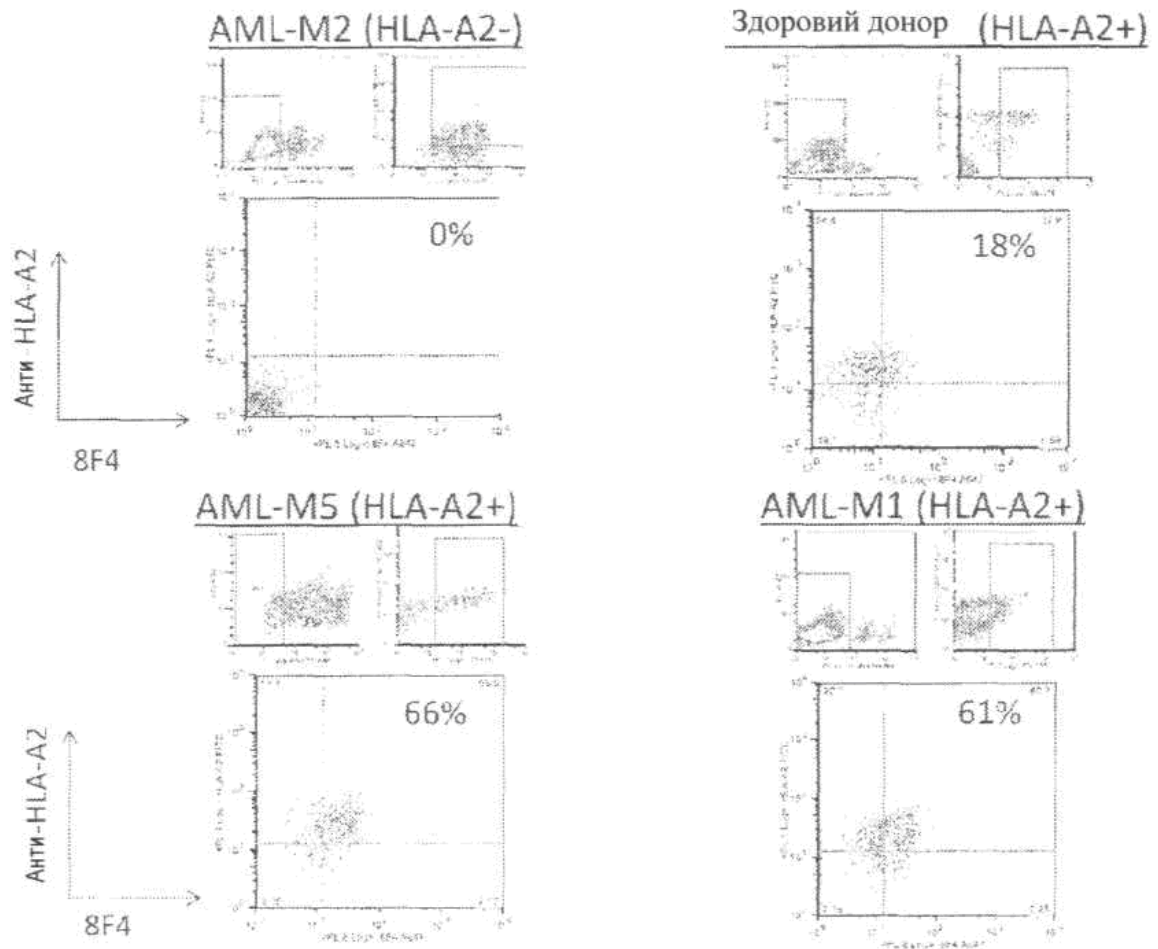
Послідовність PR1:

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

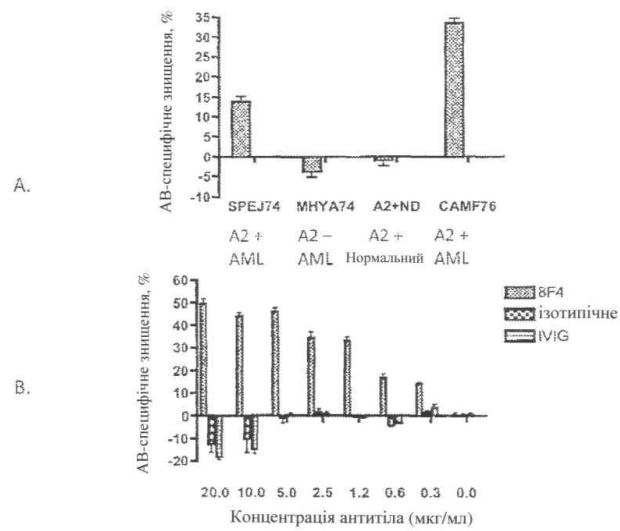
Фіг. 1



Фіг. 2

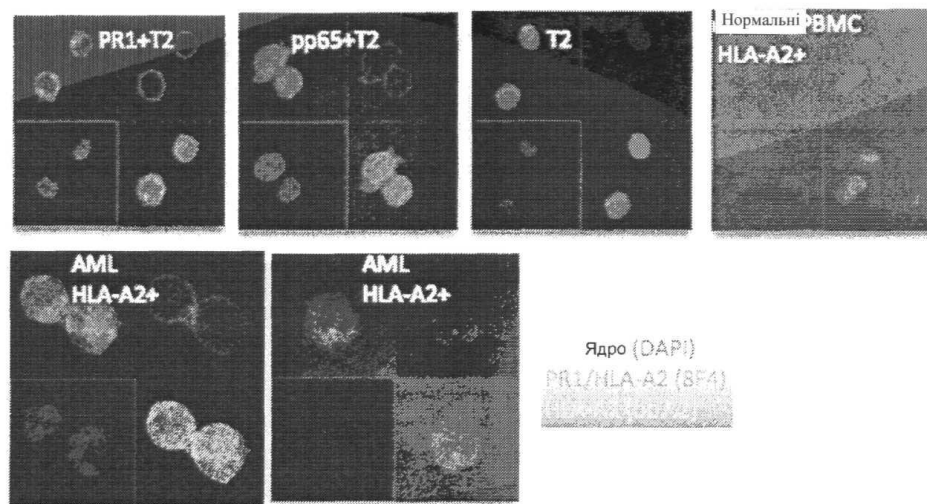


Фіг. 3

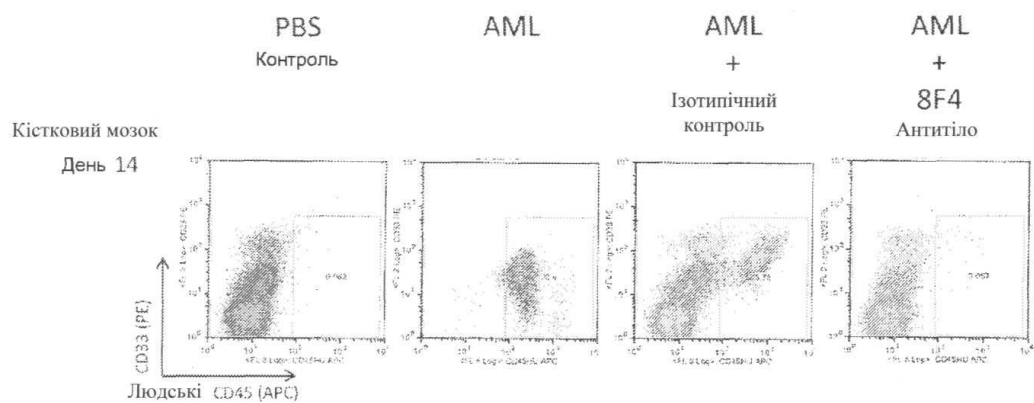


Фіг. 4A-B



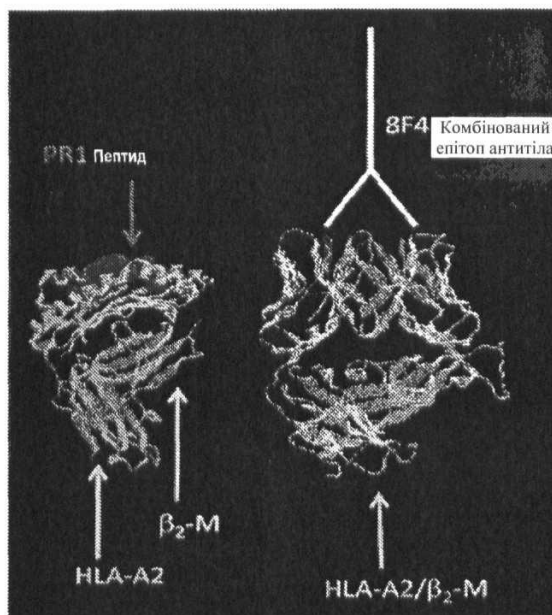


Фіг. 5

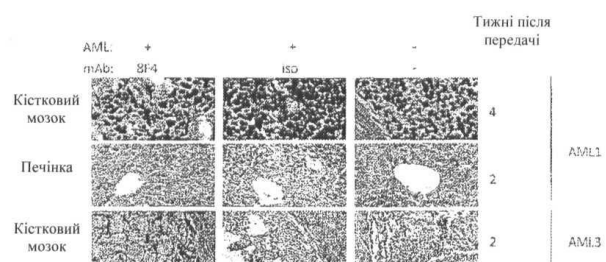


Одержані від AML-пацієнта бласти в опромінених A2-трансгенних NOD/SCID мишах

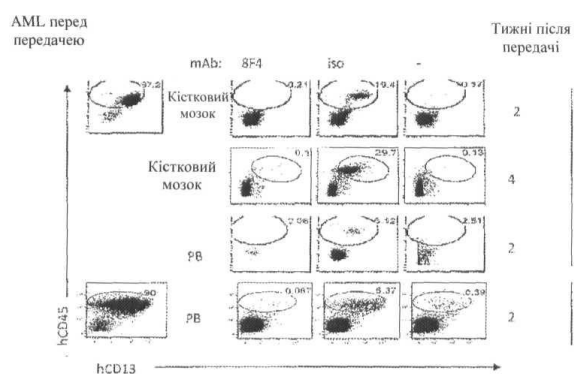
Фіг. 6



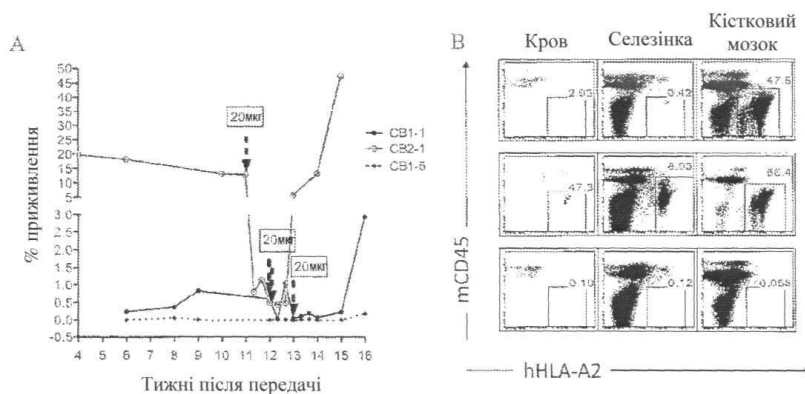
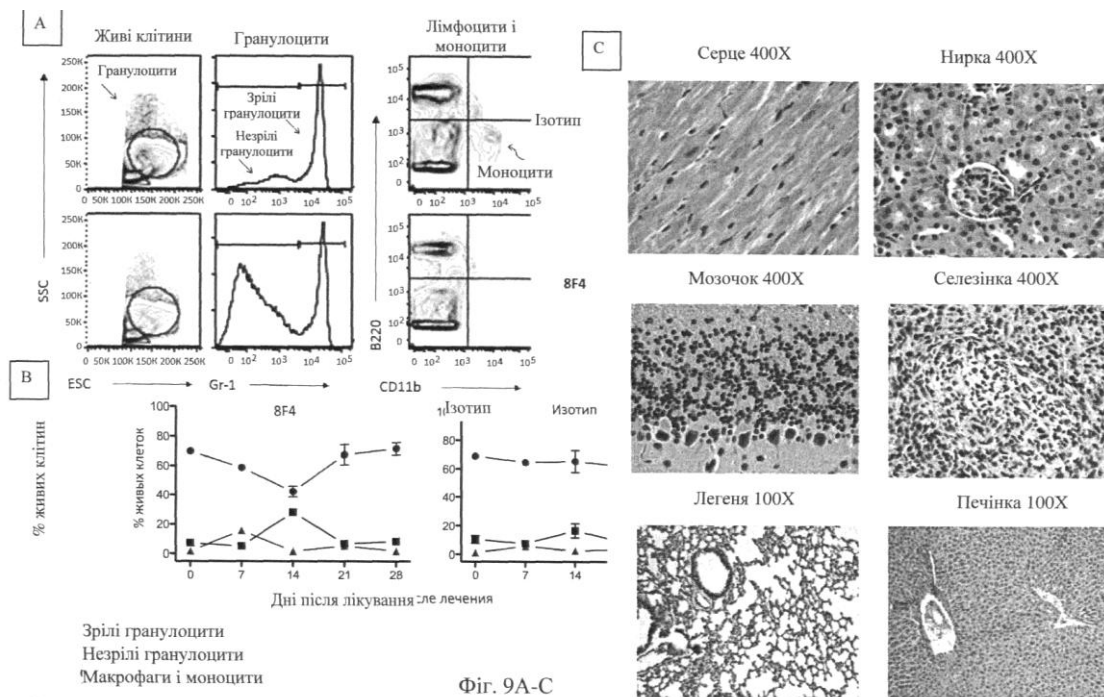
Фіг. 7



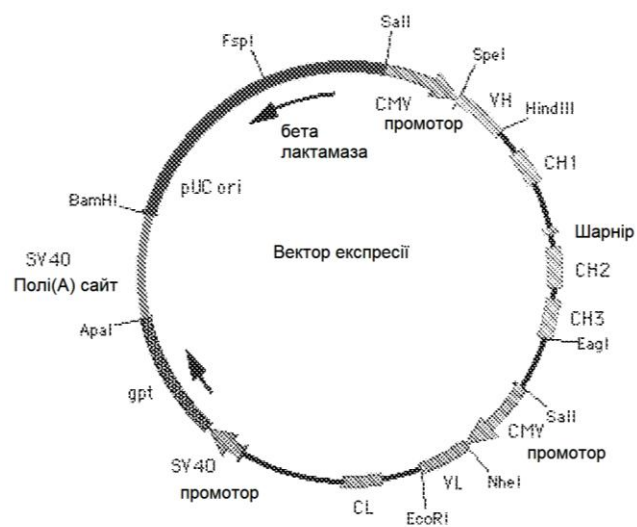
Фіг. 8A



Фіг. 8B



Фіг. 10A-B



Фіг. 11

	1	2	3
8F4 VH	123456789 0123456789 0123456789 0123456789		
Hu8F4 VH	EVQLVESGG DLVKPGGSLK LSCAASGFTF SGYGMSWVRQ		
U96282 VH	EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S-----WVRQ		

	4	5	6	7
	0123456789 01223456789 0123456789 0123456789			
		a		
8F4 VH	TPDKRLEWVA TISSGGSYTTY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY			
Hu8F4 VH	APGKGLEWVA TISSGGSYTTY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY			
U96282 VH	APGKGLEWVA ----- RFTI SRDNAKNSLY			

	8	9	1	1
	0122223456789 0123456789 00000000123456789 0123			
	abc		abcdefg	
8F4 VH	LQMSSLKSEDTAM YYCARHEGGY YGSSPAWFVYWGQGTILV TLSA			
Hu8F4 VH	LQMNSLRAEDTAV YYCARHEGGY YGSSPAWFVYWGQGTIMV TVSS			
U96282 VH	LQMNSLRAEDTAV YYCAR----- WGQGTIMV TVSS			

Fig. 12

	1	2	3
8F4 VL	123456789 0123456789 0123456789 0123456789		
Hu8F4 VL1	DIVMTQSHK FMSTSVGDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK		
Hu8F4 VL2	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQDV STAVAWYQQK		
AY043146 VL	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITC----- WYQQK		

	4	5	6	7
8F4 VL	0123456789 0123456789 0123456789 0123456789			
Hu8F4 VL1	PGQSPKLLIY STSYRYTGVP DRFTGSGSGT VFTFTINSVQ			
Hu8F4 VL2	PGKAPKLLIY STSYRYTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ			
AY043146 VL	PGKAPKLLIY -----GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ			

	8	9	1
8F4 VL	0123456789 0123456789 01234567		
Hu8F4 VL1	AEDLAVYYCQ QHFITPPTFG GGTKLEIK		
Hu8F4 VL2	PEDIATYYCQ QHFITPPTFG GGTKVEIK		
AY043146 VL	PEDIATYYC- -----FG GGTKVEIK		

Fig. 13

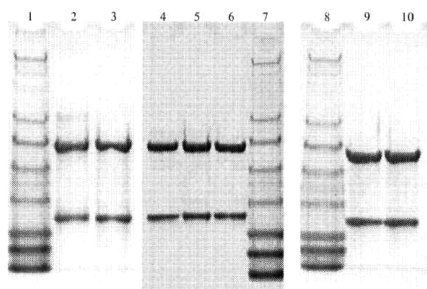
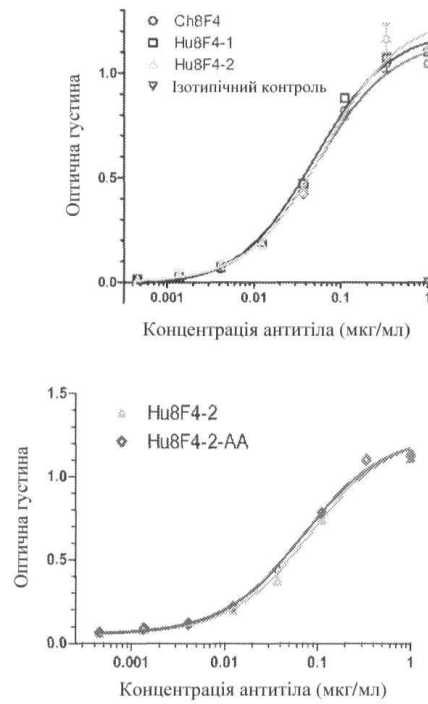
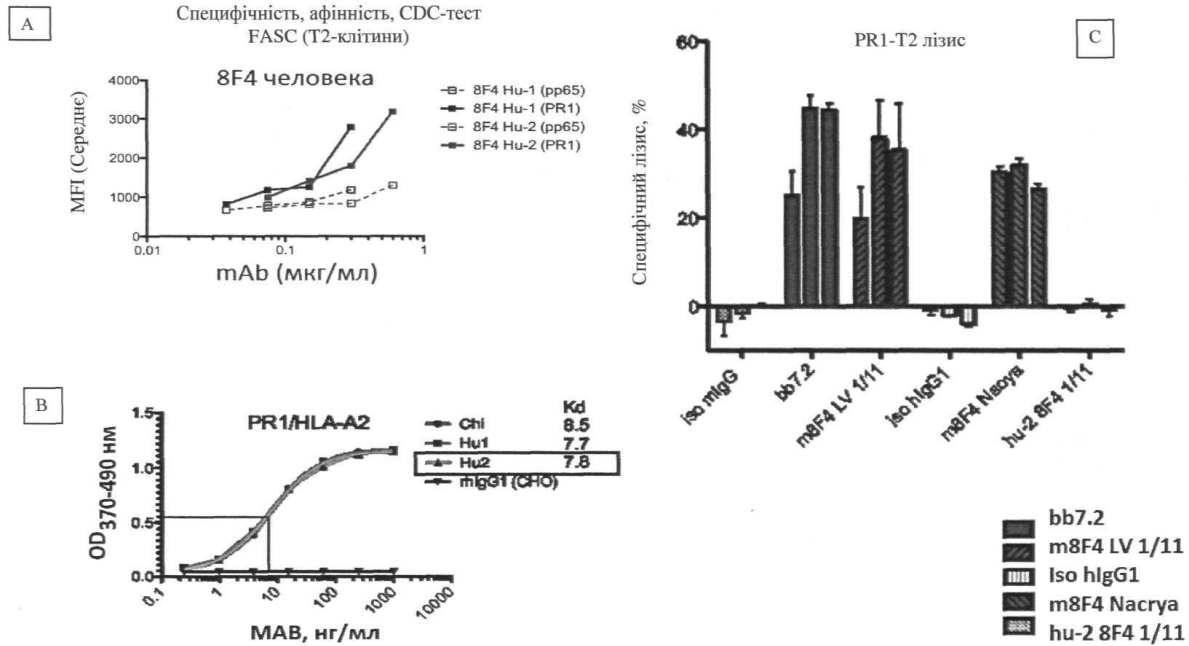


Fig. 14

Зв'язування з PR1/HLA-A2



Фіг. 15



Фіг. 16A-C

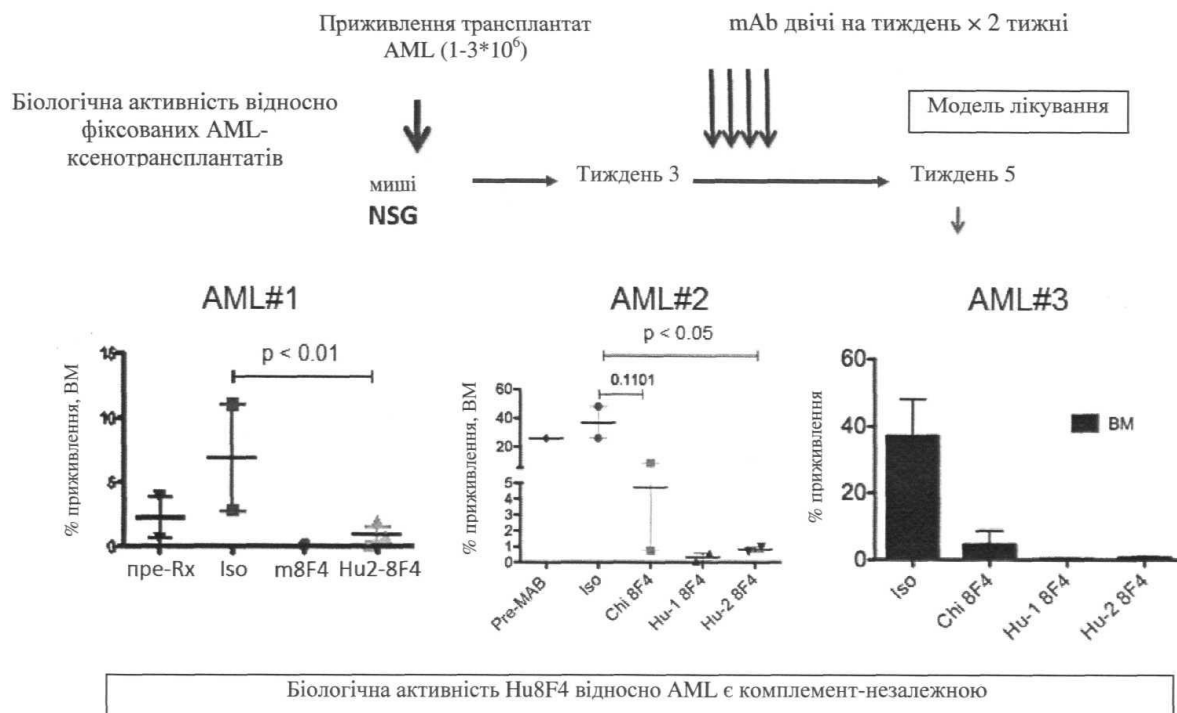
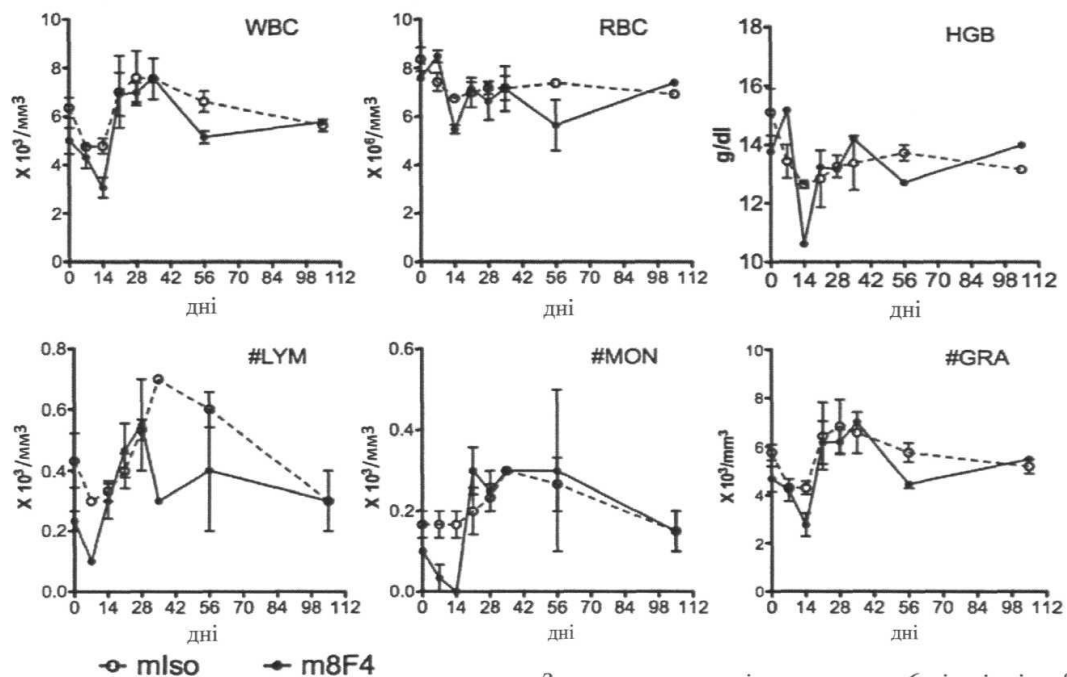


Fig. 17



Мишача модель: PR1/HLA-A2 + миші NOD/SCID *scid*

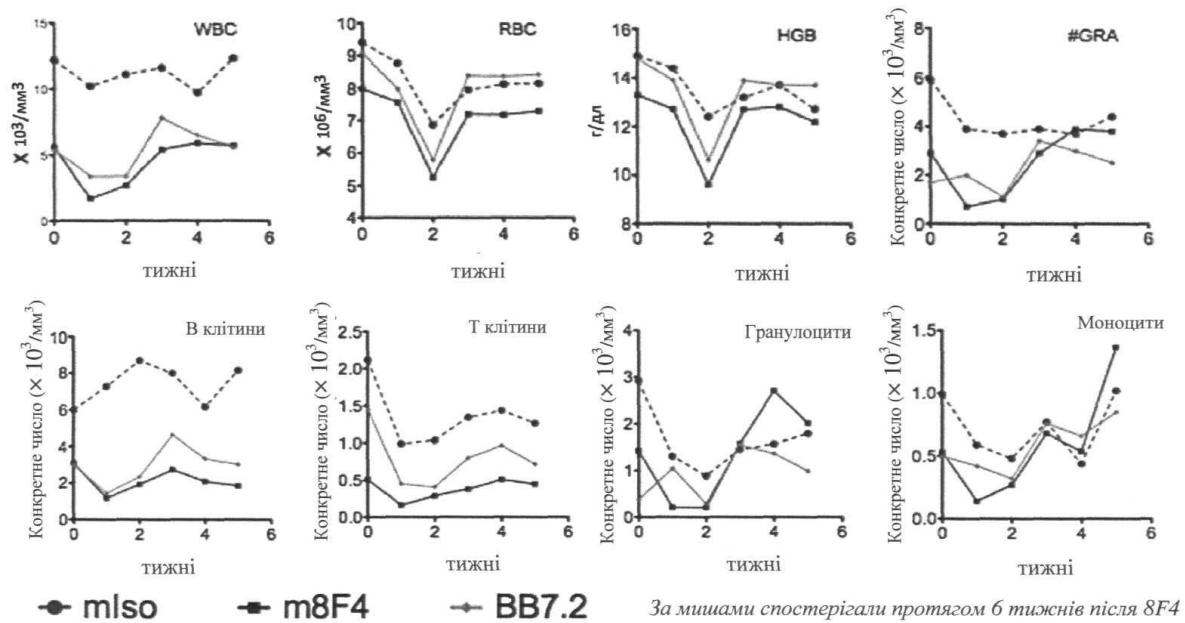


За мишами спостерігали протягом 6 місяців після 8F4

Fig. 18

mAb: 8F4 або IgG 10 мг/кг

Мишача модель: PR1/HLA-A2 + миші B6

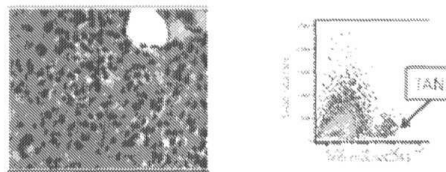


За мишами спостерігали протягом 6 тижнів після 8F4

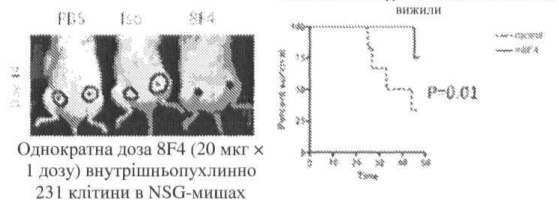
Фіг. 19

8F4 уповільнює ріст пухлини раку молочної залози і подовжує тривалість життя

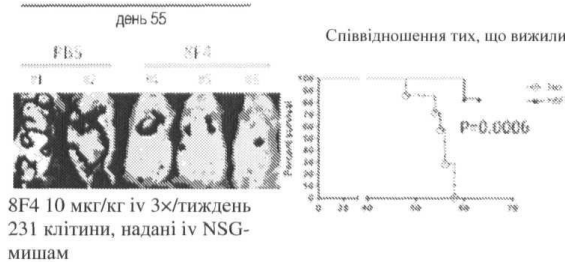
A. Пухлиноасоційовані нейтрофіли в 231 BrCA ксенотрансплантатних пухлинах



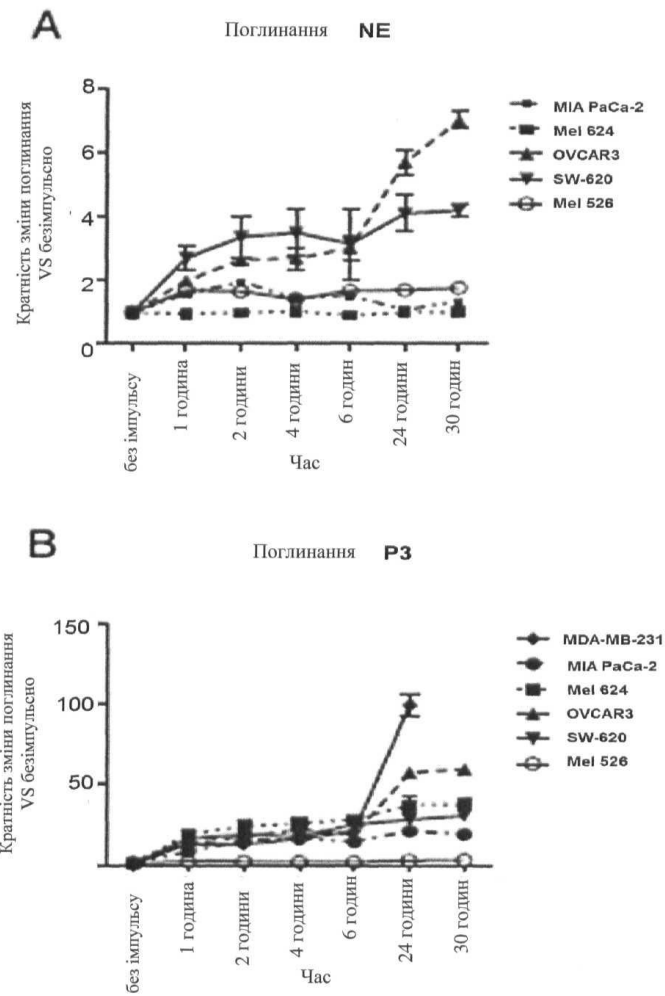
B. Модель первинної пухлини



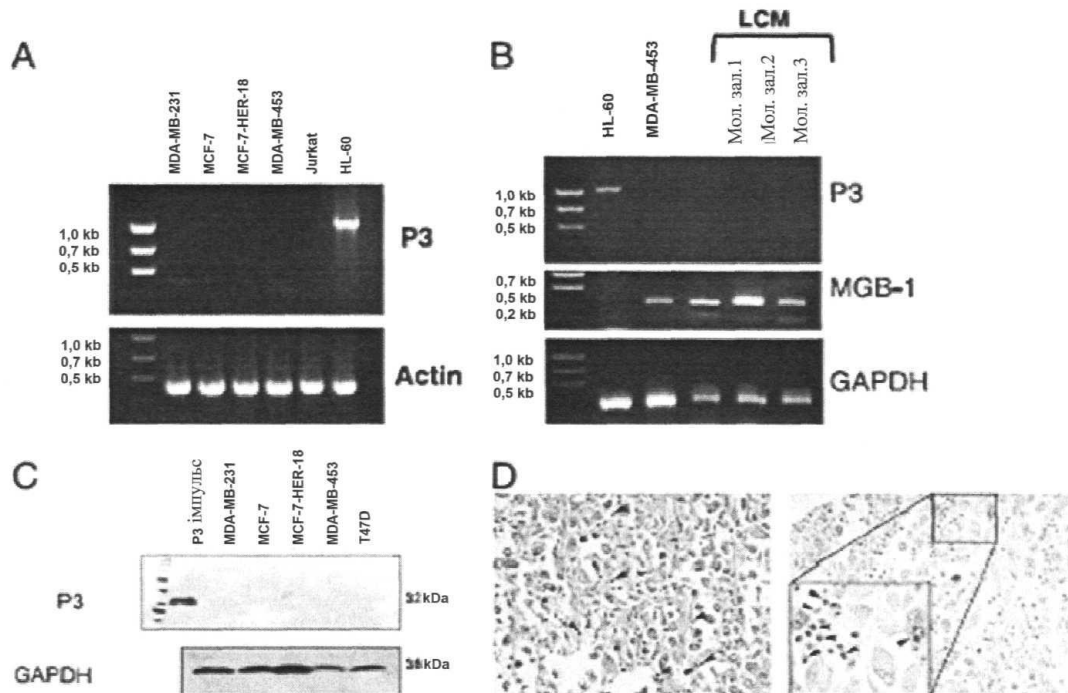
C. Модель метастазуючої пухлини,



Фіг. 20 A-C

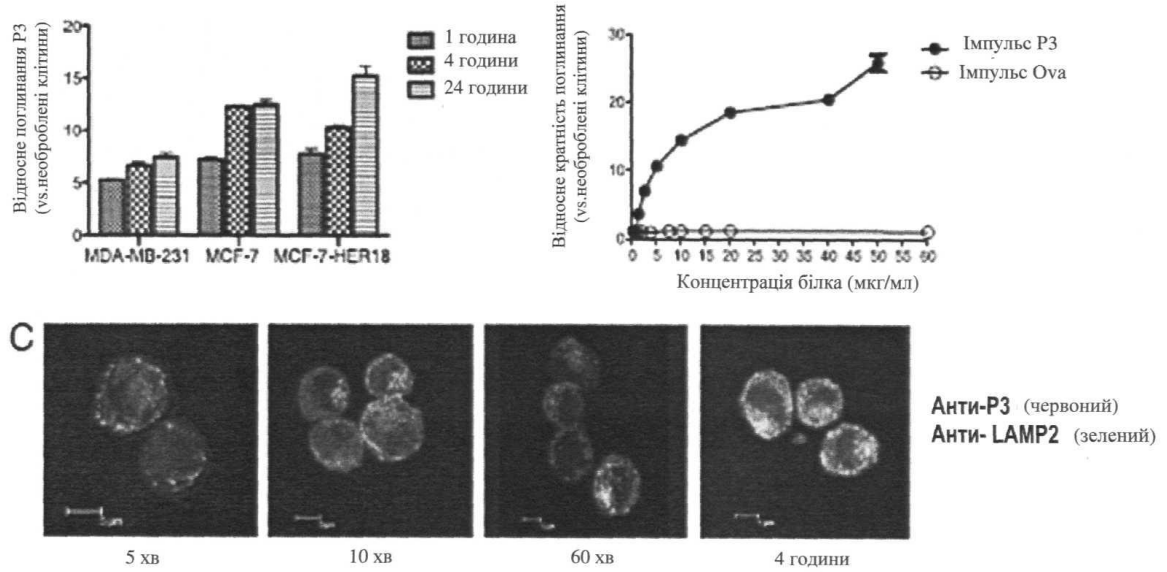


Фіг. 21A-B

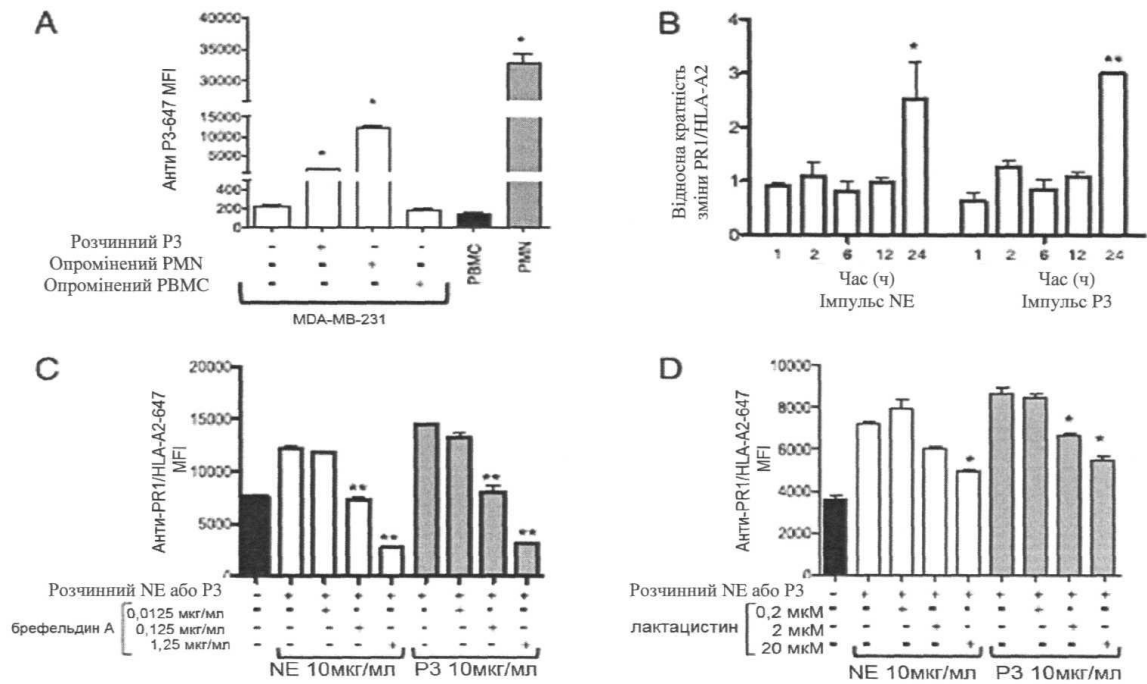


Фіг. 22A-D

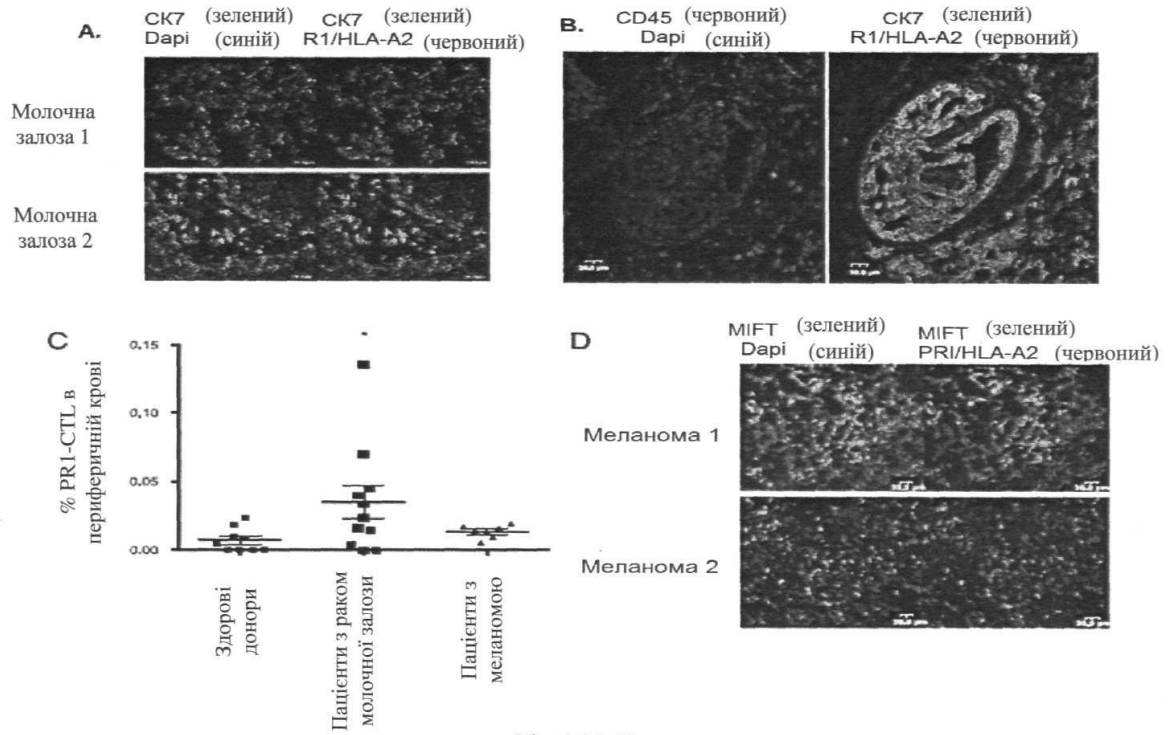




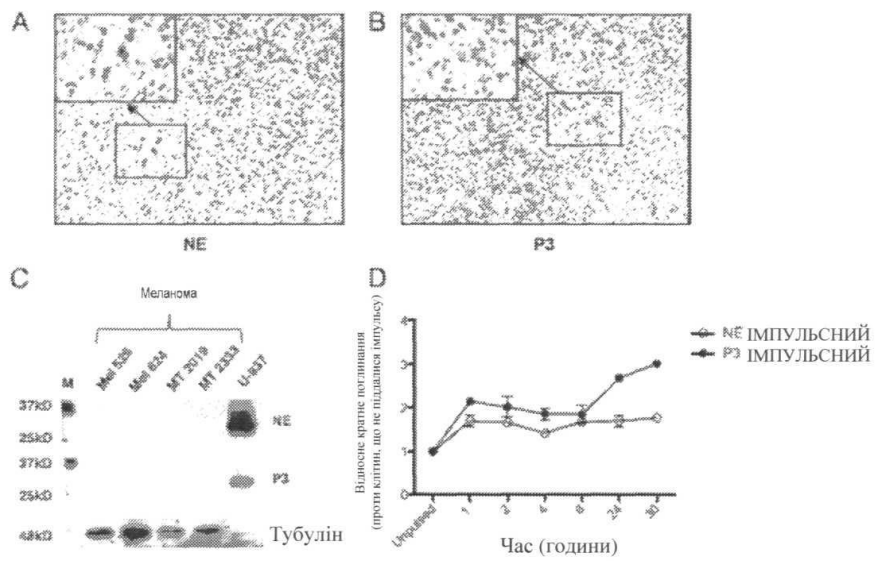
Фіг. 23A-C



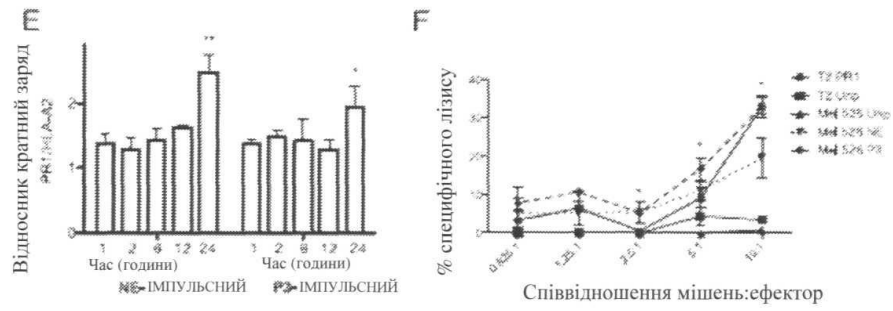
Фіг. 24A-D



Фіг. 25A-D



Фіг. 26A-D



Фіг. 26E-F

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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