

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **024629**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.10.31

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201270654

(22) Дата подачи заявки
2010.12.08

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ В7Н6, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/285,018**

(32) **2009.12.09**

(33) **US**

(43) **2013.02.28**

(86) **PCT/IB2010/003411**

(87) **WO 2011/070443 2011.06.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСТИТУТ НАСЬОНАЛЬ ДЕ
ЛА САНТ ДЕ ЛА РЕШЕРШЕ
МЕДИКАЛЬ (FR)**

(72) Изобретатель:
**Пьерр Мишель, Вивье Эрик, Баратен
Мириам (FR)**

(74) Представитель:
Лыу Т.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2009046407**

BRANDT CAMERON S. ET AL.: "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 206, no. 7, 6 July 2009 (2009-07-06), pages 1495-1503, XP009145615, ISSN: 0022-1007, DOI: DOI:10.1084/JEM.20090681 [retrieved on 2009-06-15], the whole document

WO-A1-0151514

VON STRANDMANN ELKE POGGE ET AL.: "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells", IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 27, no. 6, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 965-974, XP009145630, ISSN: 1074-7613, the whole document

MORETTA LORENZO ET AL.: "Unravelling natural killer cell function: Triggering and inhibitory human NK receptors", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 2, 28 January 2004 (2004-01-28), pages 255-259, XP009145631, ISSN: 0261-4189, the whole document
WO-A1-2006124668

SCHLEINITZ NICOLAS ET AL.: "Expression of the CD85j (Leukocyte Ig-like Receptor 1, Ig-like Transcript 2) Receptor for Class I Major Histocompatibility Complex Molecules in Idiopathic Inflammatory Myopathies", ARTHRITIS & RHEUMATISM, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 58, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 3216-3223, XP009147259, ISSN: 0004-3591 [retrieved on 2008-09-29], the whole document

(57) Предложены моноклональные антитела, специфически связывающие молекулу В7Н6 семейства В7, включая антитела, способные подавлять взаимодействие В7Н6 с NKp30. Также предложены конъюгаты антитела против В7Н6 с лекарственными средствами, содержащие моноклональное антитело против В7Н6, конъюгированное с терапевтическим веществом. Данные антитела против В7Н6 и конъюгаты антител с лекарственными средствами применимы для оказания терапевтических эффектов против В7Н6-экспрессирующих клеток, а также в диагностических приложениях для детекции В7Н6 или экспрессирующих В7Н6 клеток.

B1**024629****024629****B1**

Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США №61/285018 поданной 9 декабря 2009 г., описание которой включено в данную заявку во всей полноте посредством отсылки.

Область техники

Данное изобретение относится к антителам, в частности моноклональным антителам, связывающим лиганд опухолевых клеток, обозначаемый как B7H6. Также изобретение относится к способам применения данных антител.

Уровень техники

Семейство B7.

Положительные и отрицательные ко-стимуляторные сигналы играют решающую роль при регуляции активности лимфоцита. Показано, что опосредующие такие сигналы молекулы являются эффективными мишенями для иммунорегуляторных агентов. Например, связывание лигандов B7-1 или B7-2 на поверхности антиген-презентирующих клеток (APC) с CD28, ко-стимуляторным рецептором наивных Т-лимфоцитов, обеспечивает сигнал к пролиферации и дифференцировке Т-лимфоцита в ответ на связывание Т-клеточного рецептора (TcR). В то же время, связывание рецептора CTLA4, гомологичного CD28, приводит к ингибированию пролиферации и эффекторных функций Т-клеток. (См. Chambers et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 19:565-594, 2001; Egen et al, *Nature Immunol.*, 3:611-618, 2002.)

В последнее время активно изучается роль ряда молекул, гомологичных семейству B7, в процессе активации лимфоцитов (Abbas et al., *Nat. Med.*, 5:1345-6, 1999; Coyle et al, *Nat. Immunol.*, 2: 203-9, 2001; Carreno et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 29-53, 2002; Liang et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 384-90, 2002). Такими новыми ко-стимуляторными контррецепторами являются молекулы B7h2, PD-L1, PD-L2, B7-H3 и B7-H4.

Экспрессия известных на настоящий момент молекул семейства B7 в основном ограничена антиген-презентирующими клетками. По современным данным на лимфоидных клетках эти молекулы выступают в роли контррецепторов, взаимодействующих с соответствующими им рецепторами на лимфоцитах и обеспечивающих, таким образом, позитивные или негативные ко-стимуляторные сигналы, играющие решающую роль в регуляции клеточного иммунного ответа. НК-клетки и рецептор NKp30

Натуральные киллеры (НК-клетки) являются важной субпопуляцией лимфоцитов и составляют в среднем около 15% от мононуклеарной фракции клеток периферической крови у человека. Впервые, НК-клетки были функционально описаны в 1971 г. на основе экспериментов по изучению отторжения клеток костного мозга (ВМС) трансплантируемых от мышей других линий или от мышей родительской линии летально облученным мышам (см. Cudowicz and Bennett, *J. Exp. Med.* 134:83-102, 1971; Cudowicz and Bennett, *J. Exp. Med.* 135:1513-1528, 1971). Cudowicz и Bennett в своих экспериментах наблюдали отторжение ВМС от родительской гомозиготной линии H2 (А или В), трансплантированных гетерозиготным гибридам первого поколения линии H2 (А × В). Это наблюдение шло в разрез с классическими законами трансплантологии того времени, согласно которым считалось, что тканевые антигены наследуются кодоминантно и потомки, полученные в результате скрещивания, будут, таким образом, толерантны к родительским антигенам главного комплекса гистосовместимости (МНС) (см. Cudowicz and Bennett, *J. Exp. Med.* 134:83-102, 1971). Ответственные за описанный процесс клетки были радиологически устойчивы и идентичны лимфоидным клеткам, для которых позднее, в 1975 г., была показана цитотоксическая активность против клеток опухоли *in vitro*, осуществляемая по МНС-независимому пути (см. Herberman and Ortaldo, *Science*, 214:24-30, 1981; Ortaldo and Herberman, *Annu. Rev. Immunol.* 2:359-394, 1984; Trinchieri, *Adv. Immunol.* 47:187-376, 1989; Murphy et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 85:1475-1482, 1993). Дальнейшие доказательства того, что НК-клетки сами по себе могут опосредовать отторжение костномозгового трансплантата были получены в 1987 году, когда было показано, что у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (линия SCID), у которых нет Т- и В-лимфоцитов, функция НК-клеток в норме (см. Murphy et al., *J. Exp. Med.* 165:1212-1217, 1987).

В настоящее время считается, что НК-клетки являются важной составляющей системы врожденного иммунитета и играют основную роль при борьбе иммунной системы с опухолевыми и вирусинфицированными клетками. Однако, до активации НК-клетки не способны выполнять свои функции, даже если присутствуют в достаточном количестве. Сниженная активность НК-клеток ассоциирована с развитием онкологических и инфекционных заболеваний (См. Yamazaki et al., *Oncology Reports* 9:359-363, 2002; Rosenberg et al., *Cancer Research* 51:5074-5079 (suppl.), 1991; Britteenden et al., *Cancer* 77:1226-1243, 1996; U.S. Patent Nos. 5082833 и 4883662). В то же время, как сказано выше, НК-клетки опосредуют острое отторжение аллогенных трансплантатов ВМС. Таким образом, различные уровни активности НК-клеток, по-видимому, играют важную роль в развитии заболеваний, обусловленных нарушениями функций иммунной системы.

В норме активность НК-клеток регулируется посредством взаимодействия между молекулами МНС I-типа с ингибиторными и активационными рецепторами НК-клеток (см., например, Barao and Murphy, *BB&MT* 9:727-741, 2003). Гипотеза "неправильный свой" ("missing self") изначально основана на наблюдении, что опухолевые клетки, не несущие на своей поверхности молекул МНС-I, убиваются НК-

клетками (см. Ljunggren and Karre, *Immunol. Today* 11:237-244, 1990; Ohlen et al., *J. Immunol.* 145:52-58, 1990). Кроме того, было показано, что человеческие НК-клетки способны лизировать трансфицированные вирусом Эпштейна-Барр клетки В-лимфобластоидных линий не экспрессирующие МНС (Storkus et al., *Proc. Natl. Acad. Set. USA* 86:2361-2364, 1989). Также было показано, что трансфекция генами МНС-I клеток, дефектных по МНС-I, приводит к частичной или полной устойчивости данных клеток к лизису, опосредуемому НК-клетками (см. Storkus et al., *supra*; Shimizu and DeMars, *Eur. J. Immunol.* 19:447-451, 1989). Однако присутствия молекул МНС-I на поверхности целевых клеток не всегда достаточно для устойчивости к лизису НК-клетками, равно как распознавание молекул МНС-I на поверхности целевых клеток не всегда предотвращает их лизис НК-клетками (Barao and Murphy, *ранее*). В последние годы были открыты разнообразные МНС-I-специфичные ингибиторные и активирующие рецепторы, а также активационные рецепторы, специфичные к другим молекулам. Такие рецепторы задействуются в различных терапевтических подходах, например при аллогенной трансплантации ВМС и противораковой терапии (См. *id.*)

Активирующие рецепторы, специфичные к не-МНС-I молекулам, опосредующие цитотоксичность НК-клеток против МНС-I-дефектных или МНС-I-негативных целевых клеток, представляют собой специфичное для НК-клеток гетерогенное семейство иммуноглобулин-подобных молекул, называемых рецепторами цитотоксичности НК-клеток (см., например, Moretta et al., *Annu. Rev. Immunol.* 19:197-223, 2001; Diefenbach and Raulet, *Immunol. Rev.*, 181:170-184, 2001). При отсутствии экспрессии на клеточной поверхности молекул МНС-I (например, на опухолевых или вирус-инфицированных клетках) связывание таких активирующих рецепторов НК-клеток с лигандами запускает механизм лизиса целевой клетки. Одним из таких рецепторов является рецептор NKp30, селективно и конститутивно экспрессирующийся на зрелых НК-клетках. Сигналинг такого рецептора, *inter alia*, включает в себя взаимодействие с субъединицей CD3 ζ (См. Barao and Murphy, *ранее*) Лиганд для рецептора NKp30, экспрессирующийся на поверхности целевой клетки, до настоящего времени не был определен.

Данная система врожденного распознавания НК-клетками является потенциально мощным инструментом для клинических приложений при аллогенной трансплантации ВМС, противоопухолевой терапии или терапии других заболеваний, связанных с нарушением функционирования НК-клеток. (См., например, Barao and Murphy, *ранее*) Например, стимуляция или ингибирование активации NKp30 может применяться для изменения активности НК-клеток и терапии заболеваний или расстройств, связанных с НК-клеточной активностью. В частности, повышение активности НК-клеток за счет связывания NKp30 было бы применимо при терапии заболеваний или расстройств, характеризующихся недостаточной активностью НК-клеток, таких как рак или инфекционные заболевания. Ингибирование НК-клеточной активности за счет блокировки NKp30 было бы применимо при терапии расстройств, опосредуемых НК-клетками, например отторжения трансплантата при аллогенной трансплантации ВМС.

Недавно открытый и охарактеризованный член семейства B7 - B7H6, является контр-партнером рецептора NKp30, который селективно экспрессируется на зрелых НК-клетках и функционирует в качестве активирующего рецептора при осуществлении НК-клетками своих функций (Brandt et al., *J. Exp. Med.*, 206(7): 1495-1503, 2009). Молекула B7H6 экспрессируется на опухолевых клетках человека и не экспрессируется нормальными клетками тканей.

Таким образом, существует необходимость в поиске антител, способных ингибировать взаимодействие B7H6 с NKp30. Терапевтический потенциал применения таких антител основывается на их способности регулировать ко-стимуляторные сигналы и, таким образом, иммунный ответ. Кроме того, распознающие B7H6 антитела, конъюгированные с цитотоксическими веществами, могут применяться против целевых клеток, экспрессирующих B7H6. Такое применение, а также другие способы применения данных антител, являются весьма актуальными. Данное изобретение охватывает композиции и способы их применения, а также другие способы применения, очевидные для экспертов в данной области на основе сведений, приводимых в данной заявке.

Сущность изобретения

Объектом данного изобретения являются выделенные моноклональные антитела, специфически связывающиеся с внеклеточным доменом B7H6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2). В одном варианте исполнения антитела содержат определяющие комплементарность участки (CDR) тяжелой и легкой цепей или последовательности тяжелой и легкой цепей антитела, продуцируемого гибридомным клоном 4E5.5 (деPOSITный номер CNCM I-4242). В другом исполнении антитела содержат определяющие комплементарность участки (CDR) тяжелой и легкой цепей или последовательности тяжелой и легкой цепей антитела, продуцируемого гибридомным клоном 17B1.3 (деPOSITный номер CNCM I-4245).

В определенных вариантах исполнения описанные выше моноклональные антитела против B7H6 являются мышиными антителами, гибридными антителами, гуманизированными антителами или человеческими антителами. В некоторых вариантах исполнения антитела способны конкурировать за связывание с внеклеточным доменом B7H6 человека и ингибировать взаимодействие B7H6 человека с NKp30. Ингибирование может быть полным или частично блокирующим, и может нейтрализовать или понизить

силу взаимодействия. Подходящими антителами также являются одноцепочечные антитела. Другие варианты исполнения включают антитело, содержащие Fc фрагмент, обладающий, по крайней мере, одной из ADCC- или CDC-активностей. В некоторых из таких вариантов, Fc-фрагмент является одноцепочечным (scFc). Каждое из используемых моноклональных антител, которые связывают В7Н6 человека, может входить в состав композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемое средство доставки. Такие антитела применимы для диагностических наборов, где определяется связывание данного антитела.

Другим объектом настоящего изобретения является конъюгат антитела с лекарственным средством, в котором моноклональное антитело, специфически связывающееся с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2), связано с цитотоксическим агентом. В некоторых вариантах исполнения антитело, являющееся частью конъюгата с лекарственным средством, представляет собой антитело, способное конкурировать за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2), с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242); с антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245). Данное моноклональное антитело может быть, например, мышинным антителом, гибридным антителом, гуманизированным антителом или человеческим антителом. Подходящими антителами, так же, являются простые одноцепочечные антитела. В некоторых вариантах исполнения антитело содержит Fc-фрагмент, обладающий, по крайней мере, одной из ADCC- или CDC-активностей. В некоторых вариантах таких исполнений Fc-фрагмент представляет собой одноцепочечный Fc-домен (scFc). Цитотоксический агент может быть, к примеру, антибулиновым агентом, веществом, связывающимся с малой бороздкой в спирали ДНК, веществом, алкилирующим малую бороздку ДНК, дуокармицином или пуромицином. Подходящим антибулиновым агентом может быть, к примеру, доластатин, винкаалкалоид, подофиллотоксин, таксан, производное баккатина, криптофизин, майантозиноид или комбретастатин. В некоторых вариантах исполнения антитело связано с лекарственным средством через линкер, и в некоторых случаях линкер расщепляется под действием внутриклеточных условий. Применимые расщепляемые линкеры включают пептидные линкеры, включающие те, которые расщепляются внутриклеточной протеазой. Любые варианты исполнения конъюгатов антитела с лекарственным средством подходят для использования в составе композиций, включающих конъюгат антитела с лекарственным средством и фармацевтически приемлемый носитель.

К объектам данного изобретения также относятся способы снижения активности натуральных киллеров (НК-клеток) против клеток, экспрессирующих В7Н6 человека, путем подавления взаимодействия В7Н6 человека с человеческим NKp30. Такие способы обычно включают взаимодействие экспрессирующей В7Н6 человека клетки, в присутствии НК-клетки человека, с эффективным количеством моноклональных антител, конкурирующих за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242) или с антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245), где антитело ингибирует взаимодействие В7Н6 человека с человеческим NKp30.

Также объектом данного изобретения являются способы применения антитела или его антигенсвязывающей части для лечения отторжения аллотрансплантата клеток костного мозга (ВМС) с помощью ингибирования взаимодействия В7Н6 человека с человеческим NKp30. Такие способы обычно включают прием в эффективном для ингибирования активности НК-клеток количестве и, таким образом, лечения острого отторжения аллотрансплантата клеток костного мозга, моноклонального антитела, конкурирующего за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242) или продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245), когда антитело ингибирует взаимодействие В7Н6 человека с человеческим NKp30.

Также объектом данного изобретения является композиция для лечения отторжения аллотрансплантата клеток костного мозга (ВМС) у пациента, содержащая антитело или его антигенсвязывающую и фармацевтически приемлемый носитель.

Способ снижения активности человеческих НК-клеток и способ применения для лечения отторжения аллотрансплантата клеток костного мозга включают определенные варианты исполнений, в которых антитела являются человеческими или гуманизированными моноклональными антителами. Эти способы также включают варианты исполнения, где антитело является одноцепочечным.

Также к объектам данного изобретения относятся способы уничтожения или подавления роста В7Н6-экспрессирующих клеток внутри клеточной популяции, с помощью конъюгатов антител с лекарственным средством. Эти способы обычно включают взаимодействие В7Н6-экспрессирующих клеток с эффективным количеством конъюгата антитела с лекарственным средством, включающего (а) антитело, конкурирующее за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242); антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245); и (b) цитотоксическим агентом, конъюгированным с антителом.

Также к объектам данного изобретения относятся способы применения конъюгата антитела с лекар-

ственным средством для лечения В7Н6-экспрессирующей опухоли. Эти способы обычно включают введение эффективного количества конъюгата антитела с лекарственным средством, содержащего (а) антитело, конкурирующее за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242); или с антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245); и (b) цитотоксический агент, конъюгированный с антителом. Включены исполнения, в которых опухоль представляет собой рак толстой кишки, печени, шейки матки, легких, поджелудочной железы или простаты. Другими подходящими для терапии В7Н6-экспрессирующими опухолями являются, к примеру, прогеомоцитарная лейкемия, В-клеточная лимфома, моноцитарная лимфома, эритролейкоз, лимфома Беркитта и хронический миелолейкоз.

Для способа уничтожения или подавления роста В7Н6-экспрессирующих клеток и/или для способа терапии В7Н6-экспрессирующей опухоли применимы человеческие или гуманизированные моноклональные антитела в качестве антител, входящих в состав конъюгата антитела с лекарственным средством. Для обоих способов также применимы одноцепочечные антитела, в качестве антител, входящих в состав конъюгата антитела с лекарственным средством.

Также к объектам данного изобретения относятся способы применения моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части для лечения В7Н6-экспрессирующей опухоли. Данный способ обычно включает введение эффективного количества моноклонального антитела, конкурирующего за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242); или с антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245); когда антитело содержит Fc-фрагмент, обладающий ADCC- и/или CDC-активностью. Применимыми моноклональными антителами являются также человеческие антитела, гуманизированные антитела и одноцепочечные антитела. В некоторых вариантах исполнения Fc-фрагмент является одноцепочечным (scFc). В7Н6-экспрессирующие опухоли, поддающиеся лечению, включают, к примеру, рак толстой кишки, печени, шейки матки, легких, поджелудочной железы или простаты, поддаются лечению. Другие подходящие опухоли, экспрессирующие В7Н6, включают, к примеру, прогеомоцитарную лейкемию, В-клеточную лимфому, моноцитарную лимфому, эритролейкоз, лимфому Беркитта и хронический миелолейкоз.

Также объектом данного изобретения является композиция для лечения В7Н6-экспрессирующей опухоли у пациента, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть или конъюгата антитела с лекарственным средством и фармацевтически приемлемый носитель.

Также к объектам настоящего изобретения относятся способы определения клеточной экспрессии В7Н6, где связывание антитела указывает на присутствие В7Н6 на поверхности клетки. В общем, этот способ включает (1) взаимодействие биологического образца, содержащего человеческие клетки с моноклональными антителами, конкурирующими за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242); или с антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245); и (2) определение связывания антитела, при этом связывание указывает на присутствие В7Н6 на поверхности клетки и показывает экспрессирует ли клетка В7Н6. В некоторых вариантах исполнения биологические образцы для исследования представляют собой интактные человеческие клетки или мембранную фракцию клеток. В некоторых вариантах исполнения используются антитела с детектируемыми метками. Подходящие метки включают радиоизотопы, флуоресцентные метки, хемилюминисцентные метки, ферментные метки или биолюминисцентные метки.

К объектам настоящего изобретения также относятся также способы диагностики больных с подозрением на опухоль, клетки которой экспрессируют В7Н6. Этот способ обычно включает (1) введение больному моноклональных антител, конкурирующих за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) с антителом, продуцируемым гибридным клоном 4Е5.5 (депозитный номер CNCM I-4242); с антителом, продуцируемым гибридным клоном 9G9.2 (депозитный номер CNCM I-4243); с антителом, продуцируемым гибридным клоном 10E2.9 (депозитный номер CNCM I-4244); или с антителом, продуцируемым гибридным клоном 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245), конъюгированных с детектируемой меткой; и (2) определение распределения антител в организме пациента. Подходящие применения включают диагностику рака толстой кишки, печени, шейки матки, легких, поджелудочной железы или простаты.

Другим объектом настоящего изобретения являются следующие клетки продуцирующие антитела: гибридный клон 4Е5.5 (депозитный номер. CNCM I-4242); гибридный клон 9G9.2 (депозитный номер CNCM I-4243); гибридный клон 10E2.9 (депозитный номер CNCM I-4244); гибридный клон 17В1.3 (депозитный номер CNCM I-4245).

Подробное описание изобретения

I. Обзор

Настоящее изобретение относится к области идентификации и характеристики антител против

В7Н6, которые связываются с клеточным поверхностным белком семейства В7, в частности моноклональных антител против В7Н6 человека.

Полипептид В7Н6 был впервые описан как контррецептор для рецептора NKp30 человека - селективно экспрессирующегося на зрелых НК-клетках активирующего рецептора, связанного с цитотоксическими функциями НК-клеток (см. US Patent Application Publication No/2009|0220502), приводимый здесь во всей полноте посредством отсылки. Нуклеотидная последовательность, кодирующая В7Н6 человека, показана здесь как SEQ ID NO:1, а кодируемый ею полипептид показан как SEQ ID NO:2. Полипептид В7Н6 последовательности SEQ ID NO:2 включает в себя внеклеточный домен размером около 242 аминокислотных остатков (остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2), трансмембранный домен размером около 18 аминокислотных остатков (остатки 267-284 последовательности SEQ ID NO:2) и внутриклеточный домен размером около 158 аминокислотных остатков (остатки 285-454 последовательности SEQ ID NO:2). Структура В7Н6 включает домен IgV размером около 117 аминокислотных остатков (остатки 25-141 последовательности SEQ ID NO:2) и домен IgC размером около 97 аминокислотных остатков (остатки 142-238 последовательности SEQ ID NO:2). Кроме того, в последовательности В7Н6 выделяются несколько потенциальных сигнальных мотивов, расположенных во внутриклеточной части молекулы, такие как мотив ITIM (SaYtpL, аминокислотные остатки 293-298 последовательности SEQ ID NO:2), мотив связывания SH2 (YqlQ, аминокислотные остатки 229-332 последовательности SEQ ID NO:2) и мотив связывания SH3 (PdaPilPvsP, аминокислотные остатки 418-427 последовательности SEQ ID NO:2).

Настоящее изобретение касается получения моноклональных антител мыши против В7Н6 человека и характеристики свойств этих антител. С помощью гибридомной технологии были получены пять мышиных моноклональных антител с изотипом IgG1 против В7Н6 человека. Полученные антитела обозначены как 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 и 17B1.3. С помощью конкурентных анализов было показано, что данные антитела связываются с разными эпитопами молекулы В7Н6. Антитела 17B1.3 и 4E5.5 частично блокируют взаимодействие между NKp30 и В7Н6, о чем свидетельствует ингибирование связывания NKp30Fc и активации DOMSP30.

Результаты этих экспериментов приводят в соответствие структуру и функцию и описаны в Примерах. Эти разные моноклональные антитела, как было показано, могут быть использованы для биохимических и диагностических анализов, а также имеют терапевтическое значение.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает моноклональные антитела, связывающие мембранный белок В7Н6 человека с такой же или схожей специфичностью и другими характеристиками как МКА 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 и/или 17B1.3. Как описано в данной заявке, были получены мышиные моноклональные антитела и показана их способность связываться с различными эпитопами. Таким образом, одним объектом данного изобретения являются антитела, способные конкурировать за связывание с В7Н6 с описанными антителами (например, антитела, способные связывать те же самые эпитопы, что и антитела 4E5.5, 9G9.2, 10E2.9 и 17B1.3). Кроме того, для некоторых из этих антител показана способность воздействия на взаимодействие В7Н6-NKp30. В соответствии с этим в некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека, описанные в настоящем изобретении, ингибируют активацию NKp30 опосредованную В7Н6.

Настоящее изобретение охватывает также гуманизированные антитела, полученные из анти-В7Н6 антител других организмов (напр. гуманизированные антитела мыши), нейтрализующие антитела, моноклональные антитела человека, а также антиген-связывающие фрагменты перечисленных антител. Типичными фрагментами антител являются F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv и минимальные единицы узнавания. Нейтрализующие антитела связываются с В7Н6 таким образом, что снижается сила или вовсе блокируется связывание В7Н6 с NKp30. Также к области данного изобретения относится моноклональное антитело, конкурирующее за место связывания с внеклеточным доменом В7Н6, которое может быть использовано для ингибирования иммунного ответа, обусловленного НК-клетками, например, при остром отторжении трансплантата ВМС, когда данное антитело вводится в терапевтически эффективных количествах для блокирования активности НК-клеток.

В соответствии с данным изобретением, анти-В7Н6 антитела также могут быть использованы для воздействия против В7Н6-экспрессирующих клеток, в частности против В7Н6-экспрессирующих клеток опухоли. Конъюгаты моноклональных антител против В7Н6 человека с лекарственным средством оказывают положительный клинический эффект против В7Н6-экспрессирующих клеток при введении субъекту, имеющему В7Н6-положительную опухоль. Такое антитело в основном вводится отдельно, однако может применяться и в комбинации с другими терапевтическими агентами. В наиболее распространенном варианте применения моноклональные антитела против В7Н6 человека конъюгированы с цитотоксическим агентом, в результате чего такой конъюгат при связывании или интернализации экспрессирующей В7Н6 клеткой (например, В7Н6-экспрессирующей клеткой опухоли) оказывает цитотоксический или цитостатический эффект.

Таким образом, некоторые объекты данного изобретения включают конъюгаты моноклональных антител против В7Н6 человека с лекарственными средствами. Часть такого конъюгата, представляющая собой антитело, будет связывать клеточный поверхностный белок человека В7Н6 с такой же или сходной специфичностью и другими характеристиками, как и описанные здесь. Часть конъюгата, представ-

ляющая собой лекарственное средство будет оказывать терапевтическое воздействие (является терапевтическим агентом). Такой конъюгат анти-В7Н6 антитела с лекарственным средством будет оказывать положительный клинический эффект на В7Н6-экспрессирующие клетки при введении субъекту с опухолью, клетки которой экспрессируют В7Н6. Обычно часть такого конъюгата, которая является лекарственным средством, является цитотоксическим агентом и будет оказывать цитотоксический или цитостатический эффект на клетки, экспрессирующие В7Н6. В таких конъюгатах часть, являющаяся антителом, будет распознавать конкретные эпитопы молекулы В7Н6. Отдельные варианты таких конъюгатов влияют на взаимодействие В7Н6 с НКp30. Например, в некоторых вариантах исполнения, конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством, в соответствии с настоящим изобретением, подавляет активацию НК-клеток за счет НКp30.

В других вариантах исполнения моноклональное антитело против В7Н6 человека содержит Fc-фрагмент с эффекторной функцией, применяемый для активизации антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) против клеток, экспрессирующих В7Н6. Настоящее изобретение включает моноклональные антитела против В7Н6 человека, содержащие Fc-фрагмент, обладающий ADCC-активностью, для применения в качестве индукторов ADCC. В таком применении обычно В7Н6-экспрессирующие клетки взаимодействуют с эффективным количеством содержащих Fc-фрагмент моноклональных антител против В7Н6 человека в присутствии экспрессирующих Fc-рецептор эффекторных иммунных клеток, обладающих цитолитической активностью.

Эффекторными клетками иммунной системы, экспрессирующими Fc-рецепторы, вызывающие цитолитическую активность, являются, например, НК-клетки, а также отдельные субпопуляции CD8⁺ Т-клеток. В вариантах исполнения, когда моноклональные антитела против В7Н6 человека, содержащие Fc-фрагмент с CDC-активностью, используются для индукции CDC, обычно, В7Н6-экспрессирующие клетки взаимодействуют, в присутствии белков системы комплемента, с эффективным количеством содержащих CDC-активный Fc-фрагмент моноклональных антител против В7Н6 человека. В7Н6-экспрессирующие клетки, которые могут являться мишенями для цитолиза с помощью антител и способов, заявляемых в данной заявке на изобретение, включают, например опухолевые клетки, такие как, например, клетки рака толстой кишки, клетки рака печени, клетки рака мочеиспускательного канала, клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака простаты, клетки прогеомоцитарной лейкемии, клетки В-клеточной лимфомы, клетки моноцитарной лимфомы, клетки эритролейкемии, клетки лимфомы Беркитта, клетки хронического миелолейкоза и многие другие.

Эти и другие объекты изобретения станут очевидны при последующем детальном описании. Кроме того, различные ссылки указываются ниже и включаются в данное описание во всей их полноте посредством отсылки.

II. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же общепринятое значение, которое применяется специалистами в данной области по отношению к описываемым способам и композициям. При использовании в данной заявке следующие термины и выражения имеют принятое для них значение, если не указано иное.

Термин "полипептид" подразумевает собой полимер из аминокислот, соединенных пептидной связью, независимо натурального или синтетического происхождения. Полипептиды, состоящие менее чем из 10 аминокислотных остатков, традиционно обозначаются термином "пептиды".

Термин "белок" означает макромолекулу, состоящую из одной или более полипептидных цепей. Белок также может содержать непептидные компоненты, например углеводные группы. Углеводные группы и другие заместители непептидной природы могут вноситься в белковую молекулу системами клетки, в которой синтезируется белок, и, таким образом, будут различаться в зависимости от типа клеток. В данном документе белки называются по структуре их аминокислотного скелета; такие заместители, как углеводные группы, в основном не указываются, хотя могут присутствовать.

Выражение "очищенный полипептид" обозначает полипептид, практически полностью очищенный от загрязняющих клеточных компонентов, таких как углеводы, липиды или другие белковые примеси, ассоциированные с данным полипептидом в естественных условиях. Обычно препарат очищенного полипептида содержит наиболее очищенную фракцию данного полипептида, т.е. с чистотой не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, более 95%, с чистотой 96, 97 или 98% или с большей степенью чистоты или с чистотой более 99%. Единственный способ демонстрации, что конкретный препарат полипептида содержит выделенный полипептид, - электрофореграмма данного препарата, полученная с помощью электрофореза в полиакриамидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ-электрофорез) с окрашиванием красителем Кумасси бриллиантовый синий (Coomassie Brilliant Blue), на которой присутствует только одна полоса белковой природы. Однако термин "очищенный" не исключает присутствия того же полипептида в альтернативных физических формах, таких как димеры или альтернативно гликозилированные формы или производные.

Термины "N-концевой" и "C-концевой" применяются в данной заявке для обозначения положения внутри полипептидов. Там где позволяет контекст, эти термины используются с указанием конкретной последовательности или фрагмента полипептида для обозначения близости или относительности распо-

ложения. Например, определенная последовательность, расположенная с С-конца относительно референсной последовательности внутри полипептида, может быть расположена проксимально от С-конца референсной последовательности, но не обязательно на С-конце последовательности всего полипептида.

Термин "экспрессия" обозначает биосинтез продукта гена. Например, в случае структурного гена экспрессия подразумевает транскрипцию последовательности структурного гена в последовательность мРНК и трансляцию этой мРНК в одну или более полипептидных цепей.

Используемый в данной заявке термин "иммуномодулятор" включает цитокины, ростовые факторы стволовых клеток, ко-стимуляторные молекулы, факторы гемопоза и подобные им, а также синтетические аналоги данных молекул.

Используемый в данном документе термин "антитело" означает иммуноглобулиновые полипептиды и иммунологически активные части иммуноглобулиновых полипептидов, т.е. полипептиды иммуноглобулинового семейства или их фрагменты, содержащие сайт связывания антигена, который иммуноспецифически связывается со специфическим антигеном (например, внеклеточным доменом В7Н6).

Термин "антиидиотипическое антитело" означает антитело, связывающее вариабельный домен иммуноглобулина. В данном контексте, антиидиотипическое антитело связывается с вариабельным участком моноклонального антитела против В7Н6 человека. Таким образом, антиидиотипическое антитело является миметиком эпитопа молекулы В7Н6.

Термин "фрагмент антитела" означает часть антитела, такую как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab и подобную им. Независимо от структуры фрагмент антитела связывает тот же антиген, который распознается интактным антителом. Например, фрагмент моноклонального антитела против В7Н6 человека связывает эпитоп на молекуле В7Н6.

Термин "антитело" также охватывает интактные антитела, полученные генно-инженерным путем, или их фрагменты. Например, химерные антитела, гуманизированные антитела, Fv-фрагменты, состоящие из вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей, полипептиды состоящие из вариабельного домена легкой цепи, рекомбинантные одноцепочечные антитела, у которых вариабельные домены легкой и тяжелой цепей соединены пептидным линкером ("scFv"-белки), минимальные единицы узнавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые являются миметиками гипервариабельной области, а также схожие молекулы, также как синтетические антиген-связывающие пептиды и полипептиды.

Термин "химерное антитело" означает рекомбинантный белок, содержащий вариабельные домены и определяющие комплементарность участки (CDR) из антитела грызуна, в то время как остальная часть молекулы антитела получена от антитела человека.

Термин "гуманизированные антитела" означает рекомбинантные белки, у которых участки, определяющие комплементарность и происходящие от моноклонального антитела другого, чем человек, организма (например, мыши), перенесены с вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей исходного антитела на вариабельный домен антитела человека. Создание гуманизированных антител, являющихся производными антител других, кроме человека организмов (например, мыши), и связывающих или нейтрализующих белки человека, для терапевтического применения у человека является сферой деятельности экспертов в соответствующей области.

Термины "Fc-фрагмент", "Fc-область" или "Fc-домен", используемые в данной заявке, являются синонимами и означают часть антитела, которая ответственна за связывание с рецепторами для антител на клетках и с компонентом C1q системы комплемента. Fc означает "кристаллиновый фрагмент" - фрагмент антитела, который легко кристаллизуется, при получении кристалла белка. Отдельные белковые фрагменты, которые изначально были описаны с помощью протеолитического анализа, определяют общую структуру иммуноглобулинов. Согласно принятым в литературе определениям, Fc-фрагмент состоит из связанных дисульфидной связью шарнирных областей тяжелых цепей, а также C_H2 и C_H3 доменов. Однако в последнее время данный термин употребляется для обозначения одной цепи, состоящей из C_H3, C_H2 и по меньшей мере части шарнирной области, достаточной для формирования димера за счет дисульфидной связи со второй цепью такой же структуры. Литературный обзор по структуре и функциям иммуноглобулинов доступен по данной ссылке: Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; и Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994. При использовании в данном документе термин "Fc" включает варианты природных последовательностей.

Термины "одноцепочечный Fc", "одноцепочечный Fc-домен" и "scFc" при использовании в данном документе синонимичны и означают фьюжн-полипептиды, содержащие мономеры Fc-доменов, соединенные посредством гибкого линкера таким образом, что два мономера Fc способны димеризоваться и формировать функциональный димерный Fc-домен, способный связываться с Fc-рецепторами. Одноцепочечные Fc-полипептиды более подробно описаны в международной патентной заявке No. WO 08/0131242, озаглавленной "Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment", и описание которых включается в данную заявку во всей полноте посредством отсылки.

Термин "Fc-область обладающая ADCC-активностью" используемый в данной заявке, означает Fc-фрагмент, способный обуславливать реакции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) посредством связывания с цитолитическим Fc-рецептором (например, FcγRIIIα) на цитолитической эффекторной иммунной клетке экспрессирующей данный Fc-рецептор (например, НК-клетке или CD8⁺ T-

клетке).

Обобщающий термин "система комплемента" означает компоненты нормальной сыворотки, которые при взаимодействии с комплексами антиген-антитело на поверхности клетки способны осуществлять лизис клеток. Система комплемента состоит из группы сывороточных белков, которые последовательно функционируют в единой системе для осуществления лизирующего эффекта.

Термины "классический путь активации системы комплемента" и "классическая система комплемента", используемые в данной заявке, являются синонимами и означают определенный каскад реакций для активации системы комплемента. Для осуществления данного пути активации необходимо присутствие комплексов антиген-антитело для инициации последовательного каскада взаимодействий девяти основных компонентов, называемых C1-C9. В результате некоторых стадий процесса активации образующим продуктом является фермент, катализирующий реакцию последующей стадии. Данный каскад обеспечивает умножение сигнала и активацию большого количества компонентов системы комплемента при относительно слабом иницирующем сигнале.

Термин "Fc-фрагмент обладающий CDC-активностью", используемый в данной заявке, означает Fc-фрагмент, способный обуславливать реакции комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) посредством связывания белка C1q системы комплемента и инициации классического пути активации системы комплемента.

Термин "агент", используемый в данной заявке, означает элемент, вещество или другое молекулярное формирование, включающее, например, фармацевтическое, терапевтическое или фармакологическое вещество. Агенты могут быть естественными или синтетическими или являться их комбинацией. "Терапевтическим агентом" является агент, который оказывает терапевтический (например, положительный) эффект на клетку или ткань (например, на клетку или ткань экспрессирующую B7H6, такую как B7H6-экспрессирующую клетку опухоли), либо отдельно, либо в комбинации с другим агентом (например, комбинация неактивного лекарственного средства с активирующим его ферментом). В отдельных областях данного изобретения "терапевтический агент" представляет собой агент, конъюгированный с антителом с получением конъюгата, применимого для терапии. Примерами терапевтических агентов являются лекарственные средства, токсины, иммуномодуляторы, соединения бора, фотоактивные агенты или красители, радиоизотопы. В некоторых вариантах исполнения терапевтическим агентом для конъюгации с антителом является агент, обладающий цитотоксическим или цитостатическим эффектом.

Термин "цитотоксический эффект" по отношению к эффекту, оказываемому агентом на клетку, означает уничтожение клетки. Термин "цитостатический эффект" означает ингибирование пролиферации клетки. Термин "цитотоксический агент" означает вещество, которое оказывает цитотоксический или цитостатический эффект на клетку, таким образом, соответственно, снижая численность или ингибируя рост клеток в клеточной популяции.

"Детектируемой меткой" является молекула или атом, которые могут быть конъюгированы с носителем в форме антитела, с образованием молекулы, применимой для диагностики. Примерами детектируемых меток являются хелаторы, фотоактивные вещества, радиоизотопы, флуоресцентные вещества, парамагнитные ионы и другие маркеры подвижных носителей.

Термин "аффинная метка", применяемый в данной заявке, означает полипептидный фрагмент, который может быть присоединен ко второму полипептиду для детекции или очистки второго полипептида, или для образования сайтов связывания второго полипептида с субстратом. Принципиально любой пептид или белок, для которого доступно антитело или другой специфический связывающий агент, могут быть использованы в качестве аффинной метки. Аффинными метками могут являться полигистидиновый тракт, белок A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991), глутатион-S-трансфераза (Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988), аффинная метка Glu-Glu Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952, 1985), вещество P, пептид FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6:1204, 1988), стрептавидин-связывающий пептид и другие антигенные эпитопы или связывающие домены. См. общий обзор Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95, 1991. Молекулы ДНК, кодирующие аффинные метки доступны у коммерческих поставщиков (например, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Термин "свободное антитело" означает полноразмерное, по сравнению с фрагментом, антитело, не конъюгированное с каким-либо терапевтическим агентом. Свободные антитела могут быть поли- и моноклональными, а также являться некоторыми видами рекомбинантных антител: химерными или гуманизированными.

Термин "моноклональное антитело" означает антитело, имеющее происхождение от одного клона клеток, включая любые, прокариотические или эукариотические, клетки, а также фаговые клоны, и не обозначает способ их получения. Таким образом, термин "моноклональное антитело" при применении в данной заявке не ограничен только антителами, полученными с помощью гибридомной технологии.

Термин "иммуноконъюгат" означает конъюгат антитела с терапевтическим агентом или детектируемой меткой.

Термин "эпитоп" относится к любой белковой последовательности, способной специфично связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, аминокислот или углеводных боковых цепей,

и чаще всего обладают специфической пространственной структурой, а также специфическим распределением зарядов. Более определенно, термин "В7Н6" эпитоп, используемый в данной заявке, относится к части полипептида В7Н6, обладающего антигенной или иммуногенной активностью у животных, предпочтительно у млекопитающих, а наиболее предпочтительно - у мыши или человека. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой часть полипептида В7Н6, которая вызывает иммунный ответ у животных. Эпитопом, обладающим антигенной активностью является часть В7Н6 полипептида, с которой иммуноспецифически связываются антитела, что определяется любым методом, принятым и известным в соответствующей области деятельности, например: с помощью различных иммуноанализов. Антигенные эпитопы могут не являться иммуногенными. "Прерывистые эпитопы" представляют собой конформационные эпитопы сформированные по меньшей мере из двух удаленных в первичной последовательности белка друг от друга фрагментов последовательности В7Н6. В присутствии денатурирующих растворителей (например, при Вестерн-блот анализе) конформационные эпитопы теряют способность специфически связываться с распознающей их молекулой.

Термин "НК-клеточная активность", используемый в данной заявке, означает цитолитическую активность НК-клеток. Разработано большое количество тестов, которые хорошо известны специалистам в данной области, для детекции и/или мониторинга активности такого рода, включая, но не ограничиваясь, тестами, описанными в примерах в данной заявке.

Используемая в данной заявке фраза "взаимодействие В7Н6 и НКр30" относится к прямому физическому взаимодействию (например, связыванию) и/или другому непрямому взаимодействию функционального рецептора В7Н6 и НКр30 на поверхности НК-клетки, которое приводит к стимуляции рецептора В7Н6 и/или НКр30 и передаче сигнала внутрь клетки.

Используемый в данной заявке термин "блокирующее антитело" относится к антителам, препятствующим (т.е. ингибирующим) взаимодействию В7Н6 и НКр30 и/или препятствующим активации НК-клеток с помощью В7Н6, например, по результатам определения цитотоксической активности. Ингибирование может не являться полным и быть "частичным", т.е. выражаться в снижении или ограничении активности по отношению к стандартной величине или величине контрольного эксперимента.

Выражение "заболевание или расстройство характеризуемое присутствием В7Н6-экспрессирующих клеток", используемое в данной заявке, относится к любому заболеванию или расстройству, в развитии которых принимают участие, по меньшей мере частично, клетки экспрессирующие В7Н6. Такими патогенными клетками, например, могут являться клетки определенных видов опухолей. В соответствии с этим, типичными заболеваниями или расстройствами, характеризуемыми присутствием В7Н6-экспрессирующих клеток, являются определенные виды рака. Такие заболевания и расстройства особенно поддаются определенным способам лечения, направленным против В7Н6-экспрессирующих клеток, что описано далее в данной заявке.

Выражения "заболевание или расстройство, опосредованное НКр30-экспрессирующими клетками" и "заболевание или расстройство, характеризующееся повышенной активностью НКр30-экспрессирующих клеток" используются в данной заявке в качестве синонимичных выражений по отношению к заболеваниям или расстройствам, патология которых опосредована, по крайней мере отчасти, цитолитической активностью НКр30-экспрессирующих клеток. В некоторых случаях заболевания или расстройства, обусловленные НКр30-экспрессирующими клетками и патогенез которых опосредован, по крайней мере частично, цитолитической активностью НК-клеток, являются "заболеваниями или расстройствами, обусловленными НК-клетками". Примером таких заболеваний или расстройств является острое отторжение аллотрансплантатов клеток костного мозга (ВМС). Такие заболевания и расстройства особенно поддаются определенным способам лечения, направленным против В7Н6-экспрессирующих клеток, что описано далее в данной заявке.

Термин "эффективное количество" в контексте описания в данной заявке лечения заболевания или расстройства опосредуемого НКр30-экспрессирующими клетками посредством введения субъекту блокирующих анти-В7Н6 антител, или в контексте описания лечения заболевания или расстройства, характеризующегося присутствием В7Н6-экспрессирующих клеток, посредством введения анти-В7Н6 антител или конъюгатов антитела с лекарственным средством субъектом, относится к такому количеству молекул, которого достаточно для подавления патогенеза или облегчения состояния по одному или более клиническим или диагностическим симптомам данного заболевания или расстройства у субъекта. Эффективное количество терапевтического агента вводится в соответствии со способами, описанными в настоящем изобретении, в режиме "эффективного дозирования". Термин "эффективное дозирование" относится к сочетанию вводимого количества терапевтического агента и частоты введения, подходящих для осуществления лечения или профилактики данного заболевания или расстройства.

Вследствие недостаточной точности стандартных аналитических методов молекулярные веса и линейные размеры полимеров следует понимать как аппроксимированные значения. Когда такое значение указывается как "около" X или "примерно" X, величину данного значения следует понимать как указанную с точностью $\pm 10\%$.

III. Антитела к белкам B7H6

Одним из объектов данного изобретения являются моноклональные антитела против B7H6 человека, специфически связывающиеся с эпитопом B7H6 человека (к примеру, с полипептидным фрагментом аминокислотной последовательности, содержащейся в остатках 25-266 последовательности SEQ ID NO:2). В некоторых вариантах исполнения данные моноклональные антитела против B7H6 человека способны ингибировать взаимодействие B7H6 с NKp30. Ингибирование не обязательно является полным блокированием взаимодействия B7H6 с NKp30, возможно снижение активности по сравнению с показаниями контроля или стандарта. В определенных вариантах исполнения моноклональные антитела против B7H6 человека в соответствии с данным изобретением способны конкурировать за связывание с B7H6 человека с антителом, продуцируемым одним из гибридомных клонов: 4E5.5 (депозитный номер CNCM I-4242), 9G9.2 (депозитный номер CNCM I-4243), 10E2.9 (депозитный номер CNCM I-4244), или 17B1.3 (депозитный номер CNCM I-4245). Данные четыре гибридомы депонированы в Национальную коллекцию культур микроорганизмов (CNCM, Институт Пастера, Париж, Франция) 18 ноября 2009 г. от имени Национального института здравоохранения и медицинских исследований (INSERM).

Были идентифицированы, охарактеризованы и описаны пять мышинных моноклональных антител против B7H6 человека. При характеристике антител показано, что определенные моноклональные антитела распознают различные эпитопы белка B7H6, что показано с помощью анализов конкурентного связывания и описано в данной заявке. В дальнейшем, при характеристике антител показано, что два из них, по крайней мере частично, блокируют взаимодействие B7H6 с NKp30.

Группирование антител по эпитопам может быть использовано для идентификации антител, которые попадают в область заявленного изобретения. Под группировкой антител по эпитопам понимается использование анализов конкурентного связывания для идентификации пар антител, которые способны или неспособны одновременно связывать белок B7H6, таким образом, идентифицируя пары антител, связывающихся с теми же или перекрывающимися эпитопами белка. Эксперименты по группированию антител по эпитопам демонстрируют существование эпитопов с различной иммуногенностью. Для идентификации или "картирования" эпитопов на специфической аминокислотной последовательности белка B7H6 требуются дополнительные данные.

Конкуренцию за связывание можно оценить для любых пар антител или фрагментов. К примеру, при использовании соответствующих реактивов для детекции, специфичность связывания антител или связывающих фрагментов из любого источника можно сравнить со специфичностью связывания описанных в данной заявке моноклональных антител. Группировка антител по эпитопам на основе конкуренции за связывание может быть выполнена с "выделенными антителами" или с супернатантами клеточных культур. Часто группировка по эпитопам выполняется для супернатантов клонов первого раунда, с целью выбора клонов для дальнейшего культивирования. Сравнимые антитела должны обладать в значительной мере однородными доменами, связывающими антиген. В случае "биспецифических" или "бифункциональных" антител оценка специфичности связывания двух различных центров связывания или сортировка должны проводиться независимо.

Специфичность связывания антител, описываемых в данном изобретении, может быть исследована любым известным в соответствующей области деятельности способом. Многие различные форматы анализов конкурентного связывания могут быть использованы для группировки по эпитопам. Набор иммуноанализов, которые могут быть использованы, включает, но не ограничивается следующими видами: системы конкурентных анализов, использующие такие методики, как вестерн блоттинг, радиоиммуноанализы, ИФА, "сендвич"-иммуноанализы, иммунопреципитационные анализы, преципитиновые анализы, гель-диффузионные преципитиновые анализы, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммуноанализы, иммуноанализы с белком А и реакции связывания комплемента. Такие способы являются потоковыми и хорошо известны в соответствующей области (см., к примеру, Ausubel et al., eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New York). Кроме того могут быть использованы такие обычные перекрестные конкурентные анализы, как описаны в Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988.

BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) - один из множества вариантов форматов анализа поверхностного плазмонного резонанса, используемый для построения сгруппированных панелей моноклональных антител по эпитопам. По другим ссылкам, к примеру, The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn Morris ed. Humana Press, 1996, описаны альтернативные способы, которые могут быть использованы для связывания антител и, как ожидается, могут дать сопоставимую информацию о специфичности связывания антител с лигандом B7H6. При использовании системы BIACORE® эксперименты по группировке по эпитопам проводятся с растворимыми, нативными или рекомбинатными антигенами. Такие исследования могут быть выполнены на системе BIACORE1000® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Для управления анализом может быть использовано программное обеспечение BIAlogue® v. 1.2. К примеру, для группирования мышинных моноклональных антител полученных против B7H6 человека по аффинности связывания, козы поликлональные антитела против IgG-Fc мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) могут быть ковалентно иммобилизованы

на сенсорном чипе BIACORE® CM5 и использованы для связывания (захвата) первичных моноклональных антител в тесте. Незанятые сайты связывания Fc-фрагментов на чипе затем блокируются с использованием поликлональных IgG-Fc-фрагментов (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Затем в систему вводится белок B7H6, который специфически связывается с иммобилизованными первичными моноклональными антителами. Прибор BIACORE® измеряет массу белка, связавшегося с сенсорным чипом; связывание как первичного антитела, так и антигена B7H6 может быть измерено для каждого цикла. После связывания первичных антител и антигена с чипом, в систему вводятся растворимые вторичные антитела, которые связываются с предварительно связанным антигеном. Если вторичные моноклональные антитела способны связывать антиген B7H6 одновременно с первичными моноклональными антителами, такое связывание определяется BIACORE®. Если, однако, вторичные моноклональные тела не способны связывать антиген B7H6 одновременно с первичными моноклональными антителами, дополнительное связывание не детектируется. Для каждого моноклонального антитела проводится отрицательный контроль относительно себя самого, с целью установления уровня фонового сигнала (отсутствие связывания).

Формат конкурентного ИФА без метки (LFC-ELISA) также может использоваться для группировки антител по эпитопам. В этом способе, описанном Nagata и соавторами, J. Immunol. Methods 292:141-155, 2004, используются биотинилированные молекулы B7H6. Например, для группирования мышиных моноклональных антител, полученных против B7H6, лунки планшета для микротитрования заполняют 100 мкл раствора с концентрацией 1 мкг/мл козьих специфических антител против IgG-Fc- γ мыши (Jackson ImmunoResearch), разведенными в буфере В для ИФА (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20, 1% бычий сывороточный альбумин). После связывания этих антител с подложкой в течение 3 часов при комнатной температуре, каждую кондиционированную среду содержащую моноклональные антитела разводят в буфере В для ИФА до концентрации моноклональных антител приблизительно 0,5 мкг/мл, и инкубируют в течение ночи при 4°C с подготовленным планшетом для связывания с козьими антимышиными IgG (mAb#1). Параллельно второй набор кондиционированных сред (mAb#2) разводят в пробирках из полистирола до концентрации приблизительно 0,5 мкг/мл моноклональных антител в буфере В для ИФА, смешивают с 50 нг/мл биотинилированного B7H6 и инкубируют в течение ночи при 4°C. После инкубации mAb#1 с антителами, сорбированными на подложке, планшет блокируется какими-либо не относящимися к эксперименту антителами, чтобы заполнить свободные центры связывания на планшете. Смеси mAb#2 с биотинилированным B7H6 добавляют в планшет и инкубируют. В качестве контроля (отсутствие конкуренции) 50 нг/мл биотинилированного B7H6 добавляют непосредственно (без предварительной инкубации с mAb#2) в лунки, содержащие иммобилизованный mAb#1. После инкубации с комплексом биотинилированного B7H6 с mAb#2 в планшет добавляют 0,5 мкг/мл конъюгата стрептавидин-HRP (Pierce, Rockford, Ill.). Количество связанного конъюгата в лунке визуализируется с помощью реакции с TMB-субстратом (BioFX Laboratories, Owings Mills, Md.) и измерения поглощения при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов (Molecular Devices SPECTRAMAX 340, Sunnyvale, Calif.). Если mAb#1 связывается с отличным от mAb#2 эпитопом, комплекс биотинилированного B7H6 с mAb#2 будет связываться с планшетом, приводя к высокому уровню сигнала поглощения. Если mAb#1 связывается с тем же эпитопом, что и mAb#2, комплекс биотинилированного B7H6 с mAb#2 не будет связываться с планшетом, приводя к низкому уровню сигнала поглощения.

В некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против B7H6 человека, описанные в настоящей заявке, способны ингибировать взаимодействие B7H6 с человеческим NKp30; такие антитела применимы, к примеру, для ингибирования клеточных или других физиологических событий, связанных с взаимодействием B7H6 с NKp30, включая, к примеру, B7H6- и/или NKp30-опосредованный внутриклеточный сигналинг и ассоциированная с ним эффекторная функция (например, NKp30-опосредованная цитолитическая активность).

Антитела к B7H6 могут быть получены, например, с использованием в качестве антигена продукта экспрессионного вектора для наработки B7H6 или B7H6, выделенного из природного источника. В частности применимые моноклональные антитела против B7H6 человека «специфически связывают» B7H6. Антитела считаются специфически связывающими, если обладают хотя бы одним из следующих двух свойств: (1) антитела связывают B7H6 с пороговым значением активности связывания, и (2) антитела не обладают значительной кросс-реактивностью по отношению к полипептидам, относящимися к B7H6.

В отношении первой характеристики антитела специфически связываются, если они связываются с полипептидом B7H6, пептидом или эпитопом с аффинностью связывания (K_a) 10^6 M^{-1} или более, а наиболее предпочтительно - 10^9 M^{-1} или более. Аффинность связывания антитела может быть легко определена с помощью одного из обычных способов, применяемых в соответствующей сфере, например, с помощью анализа Скэтчарда (Scatchard, Ann. NY Acad. Set. 51:660, 1949). В отношении второй характеристики антитела не обладают значительной кросс-реактивностью по отношению к иным полипептидам, например, если при вестерн-блоттинге данные антитела детектируют B7H6 и не реагируют с известными в настоящее время полипептидами. Примеры известных полипептидов, относящихся к анализу, включа-

ют известные белки семейства B7.

Моноклональные антитела против B7H6 человека могут быть получены с помощью антигенных эпитоп-содержащих пептидов и полипептидов. Пептиды и полипептиды, несущие антигенные эпитопы обычно содержат последовательность, содержащую не менее девяти или 15-30 аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. Однако для индукции выработки антител, которые связывают B7H6, также применимы пептиды и полипептиды включающие большую часть аминокислотной последовательности, описываемой в данной заявке, 30 до 50 аминокислотных остатков, или любой длины вплоть до полноразмерной последовательности полипептида B7H6. Желательно, чтобы аминокислотная последовательность пептида, несущего эпитоп выбиралась так, чтобы обеспечить достаточную растворимость в водном растворе (к примеру, последовательность включает относительно гидрофильные остатки, в то время как гидрофобные остатки обычно избегают). Кроме того, аминокислотные последовательности, содержащие остатки пролина также желательны для получения антител.

Потенциальные антигенные сайты связывания B7H6 могут быть идентифицированы с помощью метода Джеймсона-Вульфа, Jameson and Wolf (CABIOS 4:181, 1988), как это реализовано в программе PROTEAN (версия 3.14) LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI). Для данного анализа могут использоваться параметры по умолчанию.

Метод Джеймсона-Вульфа предсказывает потенциальные антигенные детерминанты с помощью комбинирования шести основных подпрограмм для предсказания структуры белков. К примеру, метод Хоппа-Вудса (см. Hopp et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78:3824, 1981) может быть использован для идентификации областей аминокислотной последовательности с наибольшей локальной гидрофобностью (параметр: усреднение по 7 остаткам). На второй стадии может применяться метод Эмини (см. Emini et al., J. Virology 55:836, 1985) для подсчета поверхностных вероятностей (параметры: порог принятия решения по поверхности (0.6) = 1). На третьей стадии может быть использован метод Карплюса-Шульца, Karplus and Schultz (Naturwissenschaften 72:212, 1985) для предсказания гибкости цепи скелета (параметры: порог гибкости (0.2) = 1). На четвертой и пятой стадиях анализа к полученным данным могут применяться предсказания вторичной структуры с помощью метода Чоу-Фасмана (см. Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition," в Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation 549-586 (Fasman, ed, Plenum Press 1990) и метода Гарниера-Робсона (см. Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97, 1978) (параметры метода Чоу-Фасмана: таблица конформаций = 64 белка; порог для α области = 103; порог для β области = 105; параметры метода Гарниера-Робсона: α и β константы решения = 0). На шестом шаге анализа могут быть комбинированы параметры гибкости и факторы гидрофобности и доступности остатков растворителю для определения значения профиля поверхности, называемого "антигенный индекс". Наконец, функция расширения пиков может быть применена к антигенному индексу, которая увеличивает основные пики поверхности путем добавления, например, 20, 40, 60 или 80% от соответственного значения пика, чтобы учесть дополнительную свободную энергию, возникающую из подвижности поверхностных участков по сравнению с внутренними участками. Эти вычисления, однако, обычно не применяют к любым основным пикам, которые располагаются в спиральных участках, поскольку спиральные участки имеют тенденцию к снижению гибкости.

Способы получения моноклональных антител обычно известны. К примеру, моноклональные антитела грызунов к специфическим антигенам могут быть получены способами, известными специалистам в данной области, (см., например, Kohler et. al., Nature 256:495, 1975; Coligan et. al. (eds.), Current Protocols in Immunology, Vol. 1 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"]; Picklesley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition 93 (Glover et al., eds., Oxford University Press 1995). В определенных вариантах исполнения моноклональные антитела получают вводя мышам композицию, содержащую продукт гена B7H6 (например, полипептид, содержащий или состоящий из остатков 25-266 последовательности SEQ ID NO:2), после чего проверяют наличие антител, отбирая образец плазмы, выделяют селезенку для получения В-лимфоцитов, после чего проводят слияние В-лимфоцитов с миеломными клетками для получения гибридом, затем клонируют гибридомы, отбирают положительные клоны, продуцирующие антитела к антигенам, культивируют клоны для наработки антител к целевому антигену и выделяют антитела из культур гибридом.

Моноклональные антитела против B7H6 человека также могут быть человеческими антителами или производными этих антител. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены, к примеру, из трансгенных мышей, продуцирующих человеческие антитела в ответ на иммунизацию антигеном. В данной методике элементы локуса тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека введены в геном линий мышей, полученных из линий эмбриональных стволовых клеток, содержащих целевые делеции локусов эндогенных тяжелой и легкой цепи. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела специфические для человеческих антигенов, такие мыши могут использоваться для получения гибридом, секретирующих человеческие антитела. Способы получения человеческих антител из трансгенных мышей описаны, к примеру, Green et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg et al., Nature 368:856, 1994; and Taylor et al., Int. Immun. 6:579, 1994.

Альтернативные способы получения или селекции моноклональных антител включают, к примеру,

презентацию белка В7Н6 или пептида лимфоцитам *in vitro* и последующий выбор антител из фаговых или сходных библиотек, кодирующих антитела (к примеру, с помощью иммобилизованного или меченого белка В7Н6 или пептида). Методики создания и скрининга таких библиотек, кодирующих антитела, известны в соответствующей области (см, к примеру, U.S. Patent Nos. 5580717; 5885793; 5969108 and 6040136).

Моноклональные антитела могут быть выделены из клеточных культур и очищены с помощью широкого набора хорошо разработанных методик. Такие методики выделения включают, к примеру, аффинную хроматографию на белок-А-сефарозе, гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию (см., например, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in *Methods in Molecular Biology* (Vol. 10) 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

Аминокислотная последовательность моноклонального антитела может быть изменена с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Таким образом, структура антител может быть изменена для получения необходимых характеристик. Модифицированные антитела могут обладать, например, лучшей стабильностью и/или терапевтической эффективностью относительно их немодифицированных форм. Возможных вариантов много и они варьируют от замены одной или нескольких аминокислот до почти полной перестройки, например, вариабельной или константной области. Изменения в константной области будут в основном осуществляться для того, чтобы улучшить или изменить такие характеристики, как связывание компонентов системы комплемента, взаимодействие с мембранами и другие эффекторные функции. Обычно изменения в вариабельной области могут осуществляться для того чтобы улучшить характеристики связывания антигена, повысить стабильность вариабельной области или снизить риск иммуногенности. Также могут быть использованы методики фагового дисплея (см., например, Huse et al., *Science* 246:1275-1281, 1989; Ladner et al., U.S. Patent No. 5571698).

В некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека являются фрагментами антител, содержащими антиген-связывающие домены интактного (полноразмерного) антитела. Такие фрагменты антител могут быть получены, например, с помощью протеолитического расщепления антител. Фрагменты антител могут быть получены с помощью расщепления пепсином или папаином интактных антител стандартными способами. В качестве примера, фрагменты антител могут быть получены с помощью ферментативного расщепления антител пепсином с получением 5S фрагмента, обозначаемого F(ab')₂. Этот фрагмент может быть дополнительно расщеплен с помощью тиолвосстанавливающего агента с получением одновалентных 3.5S Fab'-фрагментов. Опционально реакция расщепления может быть проведена с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, образующихся при расщеплении дисульфидных связей. Как альтернативный вариант, ферментативное расщепление с использованием пепсина напрямую приводит к образованию двух одновалентных Fab-фрагментов и Fc-фрагмента. Эти способы описаны, например, в U.S. patent No. 4331647 to Goldenberg; Nisonoff et al., *Arch Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman et al., in *Methods in Enzymology* (vol. 1) 422 (Academic Press 1967); and Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10.-2.10.4.

Другие способы расщепления антител, такие как разделение тяжелых цепей для получения одновалентных фрагментов легких-тяжелых цепей, дальнейшее расщепление фрагментов или использование других ферментных, химических или генетических методик, также могут быть использованы, до тех пор, пока фрагменты связывают антиген, распознаваемый интактным антителом.

К примеру, Fv фрагменты содержат комплекс V_H и V_L цепей. Такой комплекс может быть нековалентным, как описано у Inbar et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659, 1972. В другом случае, вариабельные цепи могут быть связаны межмолекулярной дисульфидной связью или сшиты посредством таких химических соединений как глutarальдегид (см., например, Sandhu, *Cnt. Rev. Biotech.* 12:437, 1992).

Fv-фрагменты могут содержать V_H и V_L цепи, связанные посредством пептидного линкера. Эти однопептидные белки, связывающие антигены (scFv), получают при помощи сборки структурных генов, содержащих последовательности ДНК, кодирующие V_H и V_L домены, связанных между собой олигонуклеотидом. Структурный ген встраивается в экспрессионный вектор, который затем вводится в клетку-хозяина, например *E. coli*. Полученные рекомбинантные клетки синтезируют единую полипептидную цепь с пептидным линкером, связывающим два V домена. Способы получения scFv описаны, к примеру, в Whitlow et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97, 1991 (см., также Bird et al., *Science* 242:423, 1988; U.S. Patent No. 4,946,778 to Ladner et al.; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993, and Sandhu, выше.) Например, scFv может быть получен скринингом библиотеки scFv (к примеру фаговых библиотек scFv) на специфическое связывание с В7Н6 (к примеру, иммобилизованного или меченого белка В7Н6 или пептида).

Другой формой фрагмента антитела является пептид, образующий участок определяющий комплементарность (CDR). CDR-пептиды ("минимальные единицы узнавания") могут быть получены путем конструирования генов, кодирующих CDR антител, представляющих интерес. Такие гены получают, к примеру, используя полимеразную цепную реакцию для наработки ДНК вариабельных областей антител, используя РНК клеток, продуцирующих антитела, (см., например, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in

Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application 166 (Ritter et al., eds., Cambridge University Press 1995); and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," в Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 137 (Birch et al., eds., Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Также моноклональные антитела против В7Н6 человека могут быть "гуманизированными" моноклональными антителами против В7Н6, полученными из антител других организмов. Гуманизированные моноклональные антитела получают переносом участков, определяющих комплементарность тяжелых или легких переменных цепей антител других организмов (к примеру, мышиных), в переменные домены человеческих антител. Типичные аминокислотные остатки в каркасных участках человеческих антител являются, таким образом, замещенными на соответствующие остатки антител других организмов. Использование гуманизированных моноклональных антител устраняет проблему иммуногенности константных доменов мыши. Основные методики для клонирования переменных доменов иммуноглобулинов мыши описаны, например Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833, 1989. Методики получения гуманизированных моноклональных антител описаны, например, Jones et al., Nature 321:522, 1986; Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, Cnt. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," в Protein Engineering: Principles and Practice 399-434 (Cleland et al., et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. 1996) и в U.S. Patent No. 5,693,762 to Queen et al.

В отдельных вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека содержат Fc-фрагмент, содержащий домены C_H2 и C_H3 тяжелой цепи иммуноглобулина (Ig) и обычно часть шарнирной области иммуноглобулина. Fc-фрагмент отвечает за два очень желательных свойства IgG: активацию эффекторных функций и длительный период полужизни в плазме. Способность уничтожать целевые клетки, к которым прикрепляются антитела, связана с активацией эффекторных клеток иммунной системы (ADCC) и путей активации комплемента (CDC) за счет связывания Fc-фрагмента с Fc-рецептором и комплементарным белком C1q соответственно. Связывание опосредовано остатками, содержащимися преимущественно в участках, расположенных ниже шарнирной области и выше домена C_H2. (см., например, Wines et al., J. Immunol. 164:5313, 2000; Woof and Burton, Nature Reviews 4:1, 2004.) Длительный период полужизни в плазме для IgG связан с pH зависимым взаимодействием между аминокислотами в доменах C_H2 и C_H3 и неонатальным Fc рецептором - FcRn. (см., например, Getie and Ward, Immunology Today 18:592, 1997; Petkova Wines et al., Int. Immunol. 18:1759, 2006.)

Таким образом, в некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека содержат Fc-фрагмент, обладающий ADCC и/или CDC активностями. Такие антитела весьма применимы для уничтожения целевых клеток, экспрессирующих В7Н6, таких как, к примеру, раковые или вирус-инфицированные клетки. В других вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека содержат Fc-фрагмент, у которого отсутствуют одна или более эффекторные функции (например, отсутствуют ADCC и/или CDC-активности). Fc-фрагменты с отсутствующей или значительно пониженной эффекторной функцией, могут быть получены, к примеру, включением одной или более аминокислотных замен в нативную последовательность Fc-фрагмента, так что Fc-фрагмент не связывается или гораздо слабее связывается с цитолитическими Fc-рецепторами и/или с белком C1q системы комплемента. В соответствующей области знаний описаны различные модификации Fc-фрагментов с отсутствующей или сильно ограниченной эффекторной функцией. В частности применимые Fc-фрагменты, не обладающие или обладающие сильно сниженной эффекторной функцией включают, к примеру, варианты Fc-фрагментов как описано в US Patent Application Publication № 2009/0220502.

В некоторых вариантах исполнения, включающих Fc-фрагмент, данный Fc-фрагмент представляет собой одноцепочечный Fc (scFc), состоящий из двух мономеров Fc-фрагмента, связанных гибким линкером, так что два Fc мономера способны к димеризации с образованием функционального димерного Fc-фрагмента. Например, в нескольких вариантах моноклональных антител против В7Н6 человека, содержащих scFc, антитела содержат одноцепочечные Fv (scFv), слитые с scFc-фрагментом, при этом scFv-фрагмент специфически связывается с В7Н6. Одноцепочечные Fc-полипептиды, включающие фьюжн-полипептиды, содержащие scFc и один или более антиген-связывающих доменов (например, scFv), описаны подробнее в International PCT Patent Application Publication № WO 08/0131242 "Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment", и описание которых включено в настоящую заявку во всей полноте посредством отсылки.

Также моноклональные антитела против В7Н6 человека или фрагменты антител, описанные в данной заявке, могут быть пегилированы с помощью способов, используемых в данной сфере и описанных в данной заявке.

Моноклональные антитела против В7Н6 человека могут быть конъюгированы с детектируемыми метками с образованием иммуноконъюгатов против В7Н6. Подходящие детектируемые метки включают, например, радиоизотопы, флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, ферментные метки, биолюминесцентные метки или коллоидное золото. Способы создания и детекции таких меченых иммуноконъюгатов, широко известны специалистам в данной области, и ниже описаны более подробно.

Детектируемая метка может быть радиоизотопной, детектируемой с помощью автордиографических методов. Изотопами, которые в основном применимы для целей, описываемых в настоящем изобре-

тении, являются ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S and ^{14}C .

Иммуноконъюгаты против В7Н6 могут быть мечены флуоресцентными соединениями. Присутствие антител с флуоресцентной меткой детектируется облучением иммуноконъюгатов светом с нужной длиной волны и регистрацией результирующей флуоресценции. Соединения, используемые в качестве флуоресцентных меток, содержат флуоресцентный изоцианат, родамин, фикоцианин, аллофикоцианин, флалальдегид и флуорескамин.

Кроме того, иммуноконъюгаты против В7Н6 могут быть мечены хемилюминесцентными соединениями. Присутствие иммуноконъюгатов, меченых хемилюминесцентными метками, определяют по возникновению люминесценции, нарастающей в течение химической реакции. Примеры соединений, применяемых в качестве хемилюминесцентных меток, включают люминол, изолуминол, ароматический эфир акридина, имидазол, акридиновую соль и эфир щавелевой кислоты

Также биолоуминесцентные соединения, могут быть использованы в качестве меток для иммуноконъюгатов против В7Н6, описанных в данном изобретении. Биолоуминесценция - это вид хемилюминесценции найденный в биологических системах, при котором каталитические белки увеличивают эффективность хемилюминесцентных реакций. Присутствие биолоуминесцентных белков определяют по появлению люминесценции. Биолоуминесцентные соединения, применимые в качестве меток, включают люциферин, люциферазу и акворин.

Кроме того, иммуноконъюгаты против В7Н6 могут быть помечены ферментом, связанным с моноклональным антителом против В7Н6 человека. Когда такой конъюгат фермента с антителом против В7Н6 инкубируется в присутствии подходящего субстрата, ферментативная часть конъюгата реагирует с субстратом с образованием вещества, которое может быть детектировано, например, спектрофотометрически, флуорометрически или визуально. Примерами ферментов, используемых в качестве ферментной метки для полиспецифических иммуноконъюгатов, являются Р-галакто시다за, глюкозооксидаза, пероксидаза и щелочная фосфатаза.

Специалистам в данной области будут известны другие применимые метки, которые могут использоваться в соответствии с данной заявкой. Связывание маркеров с моноклональными антителами против В7Н6 человека может быть выполнено с помощью стандартных способов, известных в данной области. Типичная методология в этой области описана в Kennedy et. al., Clin. Chim. Acta 70:1, 1976; Schurs et. al., Clin. Chim. Acta 81:1, 1977; Shih et. al., Int'U. Cancer 46:1101, 1990; Stein et. al., Cancer Res. 50:1330, 1990; and Coligan, выше.

Кроме того, воспроизводимость и гибкость иммунохимической детекции может быть увеличена за счет использования конъюгатов моноклональных антител против В7Н6 человека с авидином, стрептавидином и биотином (см., например, Wilchek et. al., (eds.), "Avidin-Biotin Technology," Methods In Enzymology (vol. 184) (Academic Press 1990); Baye et. al., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," in Methods In Molecular Biology (vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992))

Способы проведения иммуноанализов хорошо разработаны (см., например, Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application 180-208 (Ritter and Ladyman, eds., Cambridge University Press 1995); Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 107-120 (Birch and Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996).

IV. Конъюгаты анти-В7Н6 моноклональных антител с лекарственными средствами

Другим объектом изобретения данной заявки является конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством. Выражение "конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством" в данной заявке означает моноклональное антитело против В7Н6 человека (как описано в разделе III, выше) конъюгированное с каким-либо терапевтическим агентом. Такие конъюгаты оказывают положительные терапевтические эффекты на экспрессирующие В7Н6 клетки при введении субъекту, например, с В7Н6-экспрессирующей опухолью. Обычно положительный клинический эффект достигается при приеме конъюгата отдельно, но также может использоваться комбинация конъюгата с другими терапевтическими агентами.

В обычных вариантах исполнения конъюгат состоит из моноклонального антитела против В7Н6 человека и цитотоксического агента, таким образом, такой конъюгат обладает цитотоксическим или цитостатическим эффектом по отношению к В7Н6-экспрессирующим клеткам (например, В7Н6-экспрессирующим клеткам опухоли) при контакте с клеткой или интернализации. В частности, применимыми веществами для конъюгации с антителами являются химиотерапевтические агенты, ферменты, активирующие неактивные лекарственные средства, радиоактивные изотопы или соединения, токсины. Например, моноклональное антитело против В7Н6 человека может быть конъюгировано с химиотерапевтическим агентом (см. ниже) или токсином (например, цитостатическое или цитотоксическое вещество, к примеру, абрин, ризин А, экзотоксин из бактерий рода *Pseudomonas*, дифтерийным токсином). Дополнительные примеры веществ, которые могут быть использованы для конъюгирования с моноклональным антителом против В7Н6 человека, приводятся ниже.

В других исполнениях моноклональное антитело против В7Н6 человека конъюгируется с фермен-

том, конвертирующим пролекарство. Такой фермент может быть соединен с антителом посредством технологии рекомбинантных ДНК или химически конъюгирован с антителом с помощью известных способов. Типовыми ферментами, конвертирующими пролекарство, являются карбоксипептидаза G2, β -глюкуронидаза, пенициллин-V-амидаза, пенициллин-G-амидаза, β -лактамаза, β -глюкозидаза, азотредуктаза и карбоксипептидаза А.

Методики, применяемые для конъюгирования терапевтических веществ с белками, в частности, с антителами, хорошо известны (См., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); and Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Также, см., например, PCT publication WO 89/12624.)

В определенных вариантах исполнения в соответствии со способами, описанными в данной заявке, конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека и лекарственного средства интернализуется и накапливается внутри В7Н6-экспрессирующих клеток, против которых оказывает терапевтический эффект (цитотоксический или цитостатический). Способы детекции накопления и определения скорости накопления описаны, например, в WO 2004/010957, озаглавленном "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease."

В типичных вариантах исполнения, при использовании моноклонального антитела против В7Н6 человека конъюгированного с терапевтическим веществом (например, лекарственным средством или ферментом, конвертирующим пролекарство), данное вещество преимущественно проявляет активность при интернализации целевыми В7Н6-экспрессирующими клетками (например, клетками В7Н6-экспрессирующей опухоли). В других вариантах исполнения, моноклональное антитело против В7Н6 человека конъюгированное с лекарственным средством не интернализуется клеткой, а лекарственное средство оказывает терапевтический эффект (например, уничтожение или подавление роста В7Н6-экспрессирующих клеток) при связывании с клеточной мембраной.

Для минимизации активности терапевтического вещества вне В7Н6-экспрессирующих клеток (например, В7Н6-экспрессирующих клеток опухоли), конъюгирование терапевтического вещества с антителом, чаще всего, производится таким образом, чтобы активность терапевтического вещества в составе конъюгата была ограничена до тех пор, пока терапевтическое вещество не будет отщеплено от антитела (например, вследствие гидролиза или под действием отщепляющего агента). В таких исполнениях терапевтическое вещество соединяется с антителом с помощью расщепляемого в условиях внутриклеточной среды В7Н6-экспрессирующих клеток линкера, достаточно устойчивого к действию внешней среды, так что конъюгат антитела с терапевтическим веществом расщепляется при интернализации В7Н6-экспрессирующей клеткой (например, в эндосомах клетки или, например, за счет pH-чувствительности или чувствительности к действию протеаз в лизосомах или в мембранных ямках клетки). (См. Раздел IV(A), ниже).

Далее в определенных вариантах исполнения конъюгат антитела с лекарственным средством содержит заряженное относительно плазматической мембраны терапевтическое вещество, что тем самым еще более снижает способность терапевтического вещества проникать через плазматическую мембрану будучи интернализованным клеткой. Используемое в данной заявке выражение "заряженный агент" означает, что агент (а) поляризован, т.е. одна часть молекулы агента заряжена относительно плазматической мембраны, или (б) молекула агента имеет суммарный заряд относительно плазматической мембраны.

А. Линкеры

Чаще всего конъюгат антитела против В7Н6 и лекарственного средства содержит соединительную область (линкер) между терапевтическим веществом и моноклональным антителом против В7Н6 человека. Как указано выше, в определенных исполнениях линкер может быть расщепляемым под действием внутриклеточных условий. Таким образом, такое расщепление линкера высвобождает терапевтическое вещество из конъюгата с антителом во внутриклеточной среде.

Например, в некоторых исполнениях линкер является расщепляемым под действием расщепляющих агентов, присутствующих во внутриклеточной среде (например, внутри лизосом, эндосом или кавеола). Такой линкер может иметь пептидную природу и расщепляться под действием внутриклеточных пептидаз или протеаз, включая, но не ограничиваясь ими, лизосомные или эндосомные протеазы. Обычно, пептидный линкер состоит по меньшей мере из двух или трех аминокислотных остатков. Расщепляющими агентами могут являться катепсины В и D и плазмин, для которых описана способность гидролизовать дипептидные производные лекарственных средств, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутри клетки (см., например, Dubowchik and Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999). Наиболее типичными являются пептидные линкеры, расщепляемые ферментами, присут-

вующими внутри В7Н6-экспрессирующих клеток. Например, может использоваться пептидный линкер, расщепляемый катепсином В - тиолзависимой протеазой, экспрессирующейся на высоком уровне в опухолевой ткани (например, линкеры Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly). Другие линкеры такого типа описаны в U.S. Patent No. 6214345. В специфических вариантах исполнения пептидным линкером, расщепляемым внутриклеточной протеазой, может быть линкер Val-Cit (валин-цитруллин) или Phe-Lys (фенилаланин-лизин) (см., например, U.S. Patent No. 6,214,345, в которой описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одно из преимуществ внутриклеточного высвобождения терапевтического вещества под действием протеолитических ферментов заключается, как правило, во временной инактивации терапевтического вещества в составе конъюгата с антителом и, как правило, в высокой стабильности таких конъюгатов в сыворотке.

В других вариантах исполнения расщепляемый линкер является pH-чувствительным, т.е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Обычно pH-чувствительный линкер гидролизует-ся в кислых условиях. Часто может использоваться кислотно-лабильный линкер, расщепляемый в кислых условиях внутри лизосомы (таким линкером может быть, например, гидразон, полукарбазон, тиополукарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацетальный, кетальный или подобный им), (см., например, U.S. Patent Nos. 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999; Neville et al., Biol. Chem. 264:14653-14661, 1989). Такие линкеры относительно стабильны при нейтральном pH крови и нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительно соответствующем pH внутри лизосомы. В определенных исполнениях гидролизующим линкером является тиозфирный линкер (такой как, например, тиозфир, соединенный с терапевтическим веществом посредством ацилгидразоновой связи (см., например, U.S. Patent No. 5622929)).

В других вариантах исполнения линкер является расщепляемым в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Существует большое количество дисульфидных линкеров, известных в соответствующей области, которое включает, например, линкеры, которые могут быть получены при использовании SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбоинил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол), SPDB и SMPT. (см., например, Thorpe et al., Cancer Res. 47:5924-5931, 1987; Wawrzynczak et al., In Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См., также, U.S. Patent No. 4880935).

В других вариантах исполнения линкер представляет собой малонатный линкер (Johnson et al., Anticancer Res. 15:1387-93, 1995), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3:1299-1304, 1995) или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3:1305-12, 1995).

Как правило, линкер не обладает значительной чувствительностью к внеклеточным условиям. Используемое в данной заявке выражение "не обладает значительной чувствительностью к внеклеточным условиям" в контексте свойств линкера означает, что не более 20%, обычно не более 15%, часто не более 10%, еще более часто не более 5%, не более 3% или не более 1% линкера в образце конъюгата антитела с лекарственным средством, расщепляется под действием внеклеточной среды (например, в плазме крови). Определение, не обладает ли линкер значительной чувствительностью к внеклеточным условиям, может проводиться, например, с помощью инкубирования с плазмой независимо двух образцов: (а) тестируемого конъюгата антитела с лекарственным средством ("образец конъюгат антитела с лекарственным средством") и (б) эквивалентного количества неконъюгированного антитела или терапевтического средства ("контрольный образец") в течение заранее определенного времени (например, 2, 4, 8, 16, или 24 ч) и последующего сравнения количества неконъюгированного антитела или терапевтического вещества, присутствующего в образце конъюгата антитела с лекарственным средством с количеством такого вещества в контрольном образце. Измерения количеств могут быть осуществлены, например, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения.

В некоторых вариантах исполнения линкер способствует интернализации конъюгата клеткой. В определенных исполнениях такой линкер способствует (обеспечивает) интернализации клеткой при конъюгировании его с терапевтическим веществом (т.е. в составе линкер-терапевтическое вещество части конъюгата антитела с лекарственным средством). В других исполнениях такой линкер способствует (обеспечивает) интернализации при конъюгировании как с терапевтическим веществом, так и с антителом против В7Н6 (т.е. в составе конъюгата антитело-лекарственное средство).

Множество линкеров, которые могут быть использованы в представленных композициях и способы применения описаны, например, в WO 2004/010957, озаглавленной "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease".

В. Терапевтические агенты

В соответствии с настоящим изобретением любое вещество, обладающее терапевтическим эффектом в отношении В7Н6-экспрессирующих клеток, может быть использовано как терапевтический агент для конъюгирования с моноклональным антителом против В7Н6 человека. В определенных вариантах исполнения, таких как применение для терапии В7Н6-экспрессирующих опухолей, терапевтическое вещество является цитотоксическим агентом.

Применяемые цитотоксические агенты включают, например, антитубулиновые агенты, ауристатины, вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК-дуплекса, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цис-платин, комплексы моно(платины), бис(платины) и триядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, вещества, повышающие чувствительность к химиотерапевтическому воздействию, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, предварительные соединения, пуриновые антиметаболиты, пуромицины, вещества, повышающие чувствительность к радиоизлучению, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомераз, винка-алкалоиды или подобные.

Характерными цитотоксическими агентами являются, например, андроген, антрамицин (АМС), аспарагиназа, 5-азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бусульфид, бутионин, сульфоксимин, камптотecin, карбоплатин, кармустин (BSNU), CC-1065 (Li et al., *Cancer Res.* 42:999-1004, 1982), хлорамбуцил, цисплатин, колхицин, циклофосфамид, цитарабин, цитидина арабинозид, цитохалазин В, дакарбазин, дактиномицин (ранее актиномицин), даунорубин, декарбазин, доцетаксел, доксорубин, эстроген, 5-фтордезоксифуридин, этопозид фосфат (VP-16), 5-фосфоурацил, грамицидин D, гидроксимочевина, идарубицин, ифосфамид, иринотекан, ломустин (CCNU), мехлорэтамин, мелфалан, 6-меркаптопурин, метотрексат, митрамицин, митомицин С, митоксантрон, нитроимидазол, паклитаксел, пликамицин, прокарбазин, стрептозотозин, тенопозид (VM-26), 6-тиогуанин, тиоТЕРА, топотекан, винбластин, винкристин и винорелбин.

Наиболее применимыми цитотоксическими агентами являются, например, доластатины (например, ауристатин Е, АРР, ММАF, ММАЕ), вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, энедины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), пуромицины, винка алкалоиды, CC-1065, SN-38-(7-этил-10-гидроксикамптотecin), топотекан, морфолинодоксорубин, ризоксин, цианоморфолинодоксорубин, эхиномицин, комбрестатин, нетропсин, эпотиолон А и В, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, дискодермолит, элеутеробин и митоксантрон.

В отдельных вариантах выполнения цитотоксический агент представляет собой традиционное вещество для химиотерапии, например, доксорубин, паклитаксел, мелфалан, винка алкалоиды, метотрексат, митомицин С или этопозид. Кроме того, потенциальные цитотоксические агенты, такие как аналоги CC-1065, каликеамицин, майтанзин, аналоги доластатина 10, ризоксин и палитоксин, могут быть соединены с антителом против В7Н6 человека.

В определенных вариантах выполнения цитотоксическим или цитостатическим агентом является ауристатин Е (также известный в соответствующей сфере как доластатин-10) или его производные. Обычными дериватами ауристатина Е является, например, эфир ауристатина Е и кето-кислоты. Например, может быть проведена реакция между ауристатином Е и параацетил бензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с получением АЕВ и АЕВВ, соответственно. Другими типичными производными ауристатина являются АРР (диметилвалин-валин-долаизолейнин-долапролин-фенилаланин-р-фенилендиамин), ММАF (довалин-валин-долаизолейнин-долапролин-фенилаланин) и МАЕ (монометил ауристатин Е). Синтез и структура ауристатина Е и его производных описаны в U.S. Patent Application Publication № 20030083263; International Patent Publication Nos. WO 2002/088172 and WO 2004/010957; and U.S. Patent Nos. 6884869; 6323315; 6239104; 6034065; 5780588; 5665860; 5663149; 5635483; 5599902; 5554725; 5530097; 5521284; 5504191; 5410024; 5138036; 5076973; 4986988; 4978744; 4879278; 4816444; 4486414.

В других вариантах выполнения цитотоксическим агентом является вещество, связывающееся с малой бороздкой ДНК. (См., например, U.S. Patent № 6130237). Например, в некоторых исполнениях, веществом, связывающимся с малой бороздкой ДНК, является соединение СВ1. В других исполнениях, веществом, связывающимся с малой бороздкой ДНК, является вещество из группы энедининов (например, калихеамицин).

В определенных вариантах выполнения, конъюгат антитела с лекарственным веществом содержит анти-тубулиновый агент. Примерами антитубулиновых агентов являются, например, таксаны (например, Таксол® (паклитаксел), Таксотере® (доцетаксел), Т67 (Туларик), винка-алкалоиды (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и доластатины (например, ауристатин Е, АРР, ММАF, ММАЕ, АЕВ, АЕВВ). Другими антитубулиновыми агентами являются, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотиолон А и В), нокодазол, колхицин и кольцимид, экстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбрестатины, дискодермолит и элеутеробин. В некоторых исполнениях цитотоксическим агентом является вещество из группы других антитубулиновых агентов майтанзиноидов. Например, в определенных исполнениях веществами из группы майтанзиноидов являются майтанзин или DM-1 (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131, 1992).

В других вариантах выполнения цитотоксическим агентом является вещество-антиметаболит. Антиметаболитом может являться, например, пуриновый антагонист (например, азатиоприн или микофенолата мофетил), ингибитор дигидрофолатредуктазы (например, метотрексат), ацикловир, ганцикловир, зидовудин, видарабин, рибавирин, азидотимидин, цитидина арабинозид, амантадин, дидезоксифуридин,

йоддезоксигуанидин, поскарнет или трифлуридин.

C. Получение конъюгатов моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным веществом

Получение конъюгатов моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством может быть выполнено любым способом, известным специалистам в данной области. Схематично, конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством состоит из моноклонального антитела против В7Н6 человека, лекарственного средства и, необязательно, линкера, соединяющего лекарственное средство с антителом. Существует ряд реакций для ковалентного соединения лекарственных средств с антителами. Часто для таких реакций используют боковые группы аминокислотных остатков молекулы антитела, включая аминокислоты лизина, свободные карбоксигруппы остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, сульфгидрильные группы цистеина и различные группы ароматических аминокислотных остатков. Одним из наиболее применяемых неспецифических способов ковалентного присоединения является карбодиимидная реакция для соединения карбокси (или амино) группы соединения с амино (карбокси) группами антитела. Также используются бифункциональные реагенты, такие как диальдегиды или имидоэфир для соединения аминокислотных групп соединения с аминокислотными группами молекулы антитела. Также для соединения лекарственных средств с антителами может быть использована реакция образования оснований Шиффа. Данный способ подразумевает преисходное окисление лекарственного средства, содержащего спиртовые или гидроксильные группы, с получением альдегида, который затем взаимодействует с молекулой антитела. Присоединение происходит за счет формирования основания Шиффа с аминокислотными группами молекулы антитела. Также для ковалентного присоединения лекарственного средства к антителам могут использоваться изотиоцианаты. Также существуют другие способы, известные специалистам в данной области и относящиеся к области данного изобретения. Не ограничивающий список таких способов описан, например, в патентах США № 665358; 5643573 и 5556623.

В некоторых вариантах исполнения интермедиат, который является предшественником линкера, взаимодействует с лекарственным средством при соответствующих условиях. В определенных вариантах исполнения используются реакционные группы лекарственного средства и/или интермедиата. Продукт такой реакции, производное лекарственного средства, затем, в соответствующих условиях, взаимодействует с моноклональным антителом против В7Н6 человека.

D. Способы анализа цитотоксического и цитостатического активностей

В определенных вариантах исполнения конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека содержит моноклональное антитело против В7Н6 человека конъюгированное с цитотоксическим агентом; таким образом, данный конъюгат обладает цитотоксическим или цитостатическим эффектом по отношению к клеткам, экспрессирующим В7Н6 (например, к экспрессирующим В7Н6 клеткам опухоли). В качестве В7Н6-экспрессирующих клеток для определения цитотоксического или цитостатического эффекта конъюгата моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством могут быть использованы клетки различных линий, например, перечисленные в табл. 5, ниже. После подтверждения цитостатического или цитотоксического эффекта по отношению к В7Н6-экспрессирующим клеткам конъюгата моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством, терапевтическое значение такого конъюгата может быть валидировано на соответствующей животной модели. В предпочтительных вариантах исполнения, конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством содержащий цитотоксический агент применяется для терапии В7Н6-экспрессирующих опухолей. Типичные животные модели различных опухолей, которые могут быть использованы для оценки терапевтической эффективности конъюгата моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством, описаны в разделе V(B) и в примере X, ниже.

Способы определения наличия цитостатической или цитотоксической активности определенного агента по отношению к клетке, в общем, известны в соответствующей области. Показательные примеры таких способов описаны ниже. Обнаружение любых из данных эффектов по отношению к В7Н6-экспрессирующим клеткам показывает, что конъюгат моноклонального антитела против В7Н6 человека применим для лечения или предотвращения развития заболеваний или расстройств, патология которых опосредуется, по крайней мере отчасти, нарушением роста или активации В7Н6-экспрессирующих клеток, например, В7Н6-экспрессирующих опухолей.

Для определения наличия цитостатической активности по отношению к В7Н6-экспрессирующим клеткам конъюгата моноклонального антитела против В7Н6 человека с лекарственным средством может быть использован анализ на основе включения тимидина. Например, культуру В7Н6-экспрессирующих клеток, при плотности 5000 клеток/лунку, культивируют в течение 72 ч с последующим добавлением к среде 0,5 мкКи Н-тимидина в последние 8 ч инкубации. После этого измеряют внутриклеточное содержание ³Н-тимидина в присутствии и в отсутствие исследуемого конъюгата моноклонального антитела с лекарственным средством.

Для определения цитотоксической активности может быть измерена степень некроза или апоптоза (программируемой клеточной смерти) соответствующих клеток-мишеней. При некрозе обычно происходит повышение проницаемости мембраны клетки, разбухание клеток и разрывы мембраны. Апоптоз, как

правило, характеризуется образованием пузырьков на мембране, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз.

Жизнеспособность клеток может определяться по уровню поглощения клетками какого-либо красителя, например, нейтрального красного, трипанового синего или AlamarBlue® (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH). Также, см., например, Page et al., *Intl. J. of Oncology* 3:473-476, 1993. При таком анализе исследуемые клетки инкубируются в среде, содержащей краситель, после чего суспензия клеток отмывается от красителя и спектрофотометрически измеряется количество оставшегося внутри клеток красителя, содержание которого отражает степень клеточного поглощения данного красителя. Также для определения степени цитотоксической активности может быть использован белок-связывающий краситель сульфодиамин В (SRB) (Skehan et al., *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12, 1990).

В качестве альтернативы, для измерения жизнеспособности и пролиферативной активности клеток млекопитающих используется тетразолиновая соль, например МТТ, для количественного калориметрического анализа, который позволяет отличать живые клетки от мертвых, {см., например, *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983}.

Степень апоптоза может быть количественно определена на основе измерения, например, степени фрагментации ДНК. Существуют коммерческие фотометрические методы для количественного определения степени фрагментации ДНК. Примеры такого анализа, включая TUNEL (на основе определения уровня включения меченых нуклеотидов в молекулы фрагментированной ДНК) и анализы на основе ИФА, описаны в *Biochemica*, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Также степень апоптоза может быть определена по морфологическим изменениям клетки. Например, при некрозе может определяться степень нарушения целостности мембраны за счет измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентные красители, такие как акридиновый оранжевый и бромистый этидий). Метод определения числа апоптотических клеток ранее описан Duke и Cohen, *Current Protocols In Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Исследуемые клетки окрашиваются ДНК-связывающим красителем (например, акридиновым оранжевым, бромистым этидием или пропидиум иодидом) и наблюдают за конденсацией и скоплением хроматина вокруг внутренней ядерной мембраны. Другими морфологическими изменениями, которые могут быть измерены для определения апоптоза, являются, например, конденсация цитоплазмы, повышенное образование мембранных пузырьков и сжатие клеток.

Наличие апоптотических клеток может быть определено как для прикрепленных, так и для неприкрепленных частей культур. Например, обе части могут быть выделены путем удаления супернатанта, обработкой трипсином прикрепленных клеток с последующим объединением с клетками неприкрепленной фракции с помощью центрифугирования при удалении остатков среды (например, при 2000об/мин в течение 10 мин), и последующего измерения количества апоптотических клеток (например, при измерении степени фрагментации ДНК). (См., например, Piazza et al., *Cancer Research* 55:3110-16, 1995).

V. Способы применения

A. Общее

Другим аспектом настоящего изобретения являются способы изменения активности (например, цитотоксической активности) NKp30-экспрессирующих клеток, включая, например, натуральные киллеры (НК-клетки) и Т-клетки (например, CD8+ Т-клетки). Такие способы включают, например, способы терапии заболеваний и расстройств, связанных с повышенной активностью NKp30-экспрессирующих клеток. Применимыми антителами являются антитела, способные конкурировать за связывание с B7H6 с антителами, продуцируемыми гибридными клонами из списка:

- (i) гибридный клон 4E5.5 (депозитный № CNCM-I-4242),
- (i) клоны гибридомы 9G9/2 (депозитный № CNCM I-4243),
- (iii) гибридный клон 10E2.9 (депозитный номер CNCM I-4244) и
- (iv) гибридный клон 17B1.3 (депозитный № CNCM I-4245).

В отдельных вариантах антитела являются химерными или гуманизированными антителами, являющимися производными от антител, продуцируемых клонами гибридом (i)-(iv) из списка выше.

В некоторых вариантах исполнения антитела, описываемые в данной заявке, используются для конкуренции за связывание при взаимодействии B7H6 с NKp30. В таком исполнении способ применения заключается во взаимодействии экспрессирующих функциональный B7H6 клеток, в присутствии NKp30-экспрессирующих клеток, с эффективным количеством моноклонального антитела против B7H6 человека или другим агентом, способным конкурировать за связывание с B7H6 с NKp30. Применимыми антителами являются антитела способные конкурировать за связывание с B7H6 с антителами, продуцируемыми одним из гибридных клонов: (i) либо гибридным клоном 4E5.5 (депозитный № CNCM I-4242), либо (ii) гибридным клоном 17B1.3 (депозитный № CNCM I-4245). В отдельных вариантах исполнения антитело представляет собой химерное или гуманизированное антитело, которое является производным от антител, продуцируемых гибридными клонами (i) и (ii), выше. Такие способы могут осуществляться *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В отдельных предпочтительных вариантах исполнения NKp30-экспрессирующие клетки представляют собой НК-клетки. Такой способ изменения активности НК-клеток может быть применен, например, для лечения заболеваний или расстройств, связанных с по-

вышенной активностью НК-клеток. В других вариантах исполнения NKp30-экспрессирующими клетками являются Т-клетки (например, CD8+ Т-клетки). Такое применение или способ изменения активности NKp30-экспрессирующих Т-клеток может быть применено для лечения заболеваний или расстройств, связанных с повышенной активностью NKp30-экспрессирующих Т-клеток. Было показано, что определенные Т-клетки, включая субпопуляцию CD8+ Т-клеток, экспрессируют NKp30 (см., например, Srivastava and Srivastava, *Leuk. Res.* 30:37-46, 2006.).

Как упомянуто выше, в отдельных вариантах исполнения антитела, описываемые в данной заявке, применимы для лечения заболеваний или расстройств, связанных с повышенной активностью НК-клеток. Например, в некоторых вариантах исполнения, данный способ применения антител включает введение эффективного количества моноклонального антитела против B7H6 человека, которое способно конкурировать за взаимодействие B7H6 с NKp30, пациенту, страдающему или имеющему высокий риск развития заболевания или расстройства опосредуемого НК-клетками (например, опосредованное НК-клетками отторжение аллотрансплантата, такое как, например, опосредуемое НК-клетками отторжение аллотрансплантата BMC). В данном изобретении осуществлен подход к супрессии опосредуемого НК-клетками отторжения аллотрансплантата костного мозга с помощью моноклональных антител против B7H6 человека. Пересадка костного мозга (BMT) - принятый метод терапии при лечении различных гематологических опухолей. Однако эффективность аллогенной трансплантации костного мозга ограничена в связи с рядом трудностей, например, с отторжением трансплантата. Существует достаточное количество данных о том, что НК-клетки являются помехой для приживления аллотрансплантатов клеток костного мозга и способны сами по себе опосредовать специфичность отторжения трансплантатов костного мозга у мышей (см., например, Murphy et al., *J. Exp. Med.* 165:1212-1217, 1987; Murphy et al., *J. Exp. Med.* 166:1499-1509, 1987; Murphy et al., *J. Immunol.* 144:3305-3311, 1990; Murphy et al., *Eur. J. Immunol.* 20:1729-1734, 1990; Murphy et al., *Immunol. Rev.* 181:279-289, 2001). Клинически, резистентность по отношению к аллогraftу наблюдаемая у пациентов со SCID, получивших HLA-несоответствующий трансплантат BMC с деплецией Т-клеток, без циторедуктивного кондиционирования, связана с высокой активностью НК-клеток донора. (See O'Reilly et al., *Vox. Sang.* 51:81-86, 1986.)). Соответственно, антитела против внеклеточного домена B7H6, способные ингибировать взаимодействие B7H6 с NKp30, как описано в данной заявке, могут быть использованы при пересадке костного мозга для подавления цитолитической активности НК-клеток против аллотрансплантата, и, таким образом, оказывать терапевтический эффект или предотвращать отторжение аллотрансплантата BMC.

В остальных вариантах исполнения моноклональное антитело против B7H6 человека используется для индукции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) против клеток, экспрессирующих B7H6, например, при лечении заболеваний или расстройств, характеризующихся наличием B7H6-экспрессирующих клеток. Например, в некоторых вариантах исполнения, моноклональное антитело против B7H6 человека используется для индукции антитело-зависимой клеточной цитотоксической активности (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксической активности (CDC) против клеток опухоли, экспрессирующей B7H6. Применение антител особенно успешно при лечении опухолей, так как определенные опухоли либо обладают уникальными опухолеспецифичными антигенами, либо их антигены экспрессируются на значительно большем количественном уровне, чем у нормальных клеток. Экспериментальные данные свидетельствуют, что B7H6 экспрессируется на высоком, относительно нормальных тканей, уровне клетками многих видов рака, включая клетки рака толстой кишки, печени, шейки матки, легких, поджелудочной железы и простаты, а также клетки многих видов рака крови, таких как прогомоцитарная лейкемия, В-клеточная лимфома, моноцитарная лимфома, эритролейкемия, лимфома Беркита, хронический миелолейкоз. Основываясь на этих данных, B7H6 является новым опухолеспецифичным или опухолеассоциированным антигеном. Моноклональные антитела против B7H6 человека могут применяться для противоопухолевой терапии. Одним из механизмов, связанных с противоопухолевой активностью терапии с помощью моноклональных антител, является антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). При этом процессе моноклональные антитела связываются с целевой клеткой (например, клеткой опухоли), тогда как определенные эффекторные клетки (например, НК-клетки, CD8+ Т-клетки) за счет определенного рецептора связываются с комплексом моноклонального антитела с целевой клеткой, что приводит к гибели целевой клетки.

В соответствии с этим в некоторых вариантах исполнения моноклональное антитело против B7H6 человека содержит Fc-фрагмент с эффекторными функциями для индукции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплемент зависимой цитотоксичности (CDC) по отношению к B7H6-экспрессирующим клеткам. Способы индукции ADCC, в основном, заключаются в контакте B7H6-экспрессирующей клетки с эффективным количеством моноклонального антитела против B7H6 человека обладающего Fc-областью с ADCC-активностью. При этом этап взаимодействия происходит в присутствии эффекторных иммунных клеток, экспрессирующих Fc-рецептор и обладающих цитолитическими функциями. Эффекторными клетками иммунной системы, экспрессирующими цитолитические Fc-рецепторы (например, Fc RIII или CD16), являются, например, НК-клетки наряду с определенными субпопуляциями CD8+ Т-клеток. Способы индукции CDC в основном заключаются в контакте B7H6-экспрессирующих клеток с эффективным количеством моноклонального антитела против B7H6 человека

содержащего Fc-фрагмент с CDC-активностью в присутствии белков системы комплемента. B7H6-экспрессирующими клетками-мишенями для описанных способов цитолиза могут являться, например, опухолевые клетки, например клетки рака толстой кишки, клетки рака печени, клетки рака шейки матки, клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака простаты, клетки прогематоцитарной лейкемии, клетки В-клеточной лимфомы, клетки моноцитарной лимфомы, клетки эритролейкемии, клетки лимфомы Беркитта и хронического миелолейкоза и многих других типов рака. Применимыми антителами являются антитела, способные конкурировать за связывание с B7H6 с антителами, продуцируемыми следующими гибридными клонами: (i) гибридный клон 4Y5.5 (депозитный № CNCM I-4242); (ii) гибридный клон 9G9.2 (депозитный № CNCM I-4243); (iii) гибридный клон 10E2.9 (депозитный № CNCM I-4244); и (iv) гибридный клон 17B1.3 (депозитный № CNCM I-4245). В некоторых исполнениях антитело способно конкурировать за связывание с B7H6 с антителом, продуцируемым клоном гибридомы (ii)-(iii) из списка выше. В отдельных вариантах исполнения антитело является химерным или гуманизированным производным от антитела, продуцируемого клоном гибридомы (i)-(iv) из списка выше или (ii)-(iii) из списка выше.

В соответствующих исполнениях содержащее Fc-фрагмент с эффекторной функцией моноклональное антитело против B7H6 человека, как описано в данной заявке, применяется для лечения B7H6-экспрессирующей опухоли у пациента. Такие способы обычно включают прием пациентом эффективного количества содержащего Fc-фрагмент, обладающий ADCC и/или CDC активностью, моноклонального антитела против B7H6 человека. B7H6-экспрессирующими опухолями, в значительной степени отвечающими на лечение с использованием таких способов, являются, например, рак толстой кишки, печени, шейки матки, легкого, поджелудочной железы или простаты, а также такие типы рака крови, как, например, прогематоцитарная лейкемия, В-клеточная лимфома, моноцитарная лимфома, эритролейкемия, лимфома Беркитта или хронический миелолейкоз.

В других вариантах исполнения конъюгат моноклонального антитела против B7H6 человека с лекарственным средством (см. раздел IV, выше) применяется для доставки терапевтического вещества к B7H6-экспрессирующей клетке, по отношению к которой терапевтическое вещество оказывает терапевтический эффект. Такие способы особенно применимы для лечения заболеваний или расстройств, характеризующихся присутствием B7H6-экспрессирующих клеток. В отдельных предпочтительных вариантах исполнения, использующих конъюгат моноклонального антитела с лекарственным средством, терапевтическое вещество является цитотоксином, оказывающим цитотоксический или цитостатический эффект по отношению к B7H6-экспрессирующей клетке, например B7H6-экспрессирующей клетке опухоли. Как описано выше, на основе экспериментальных данных показано, что B7H6 экспрессируется на высоком, по сравнению с нормальной тканью, уровне многими опухолевыми линиями клеток, включая линии клеток рака толстой кишки, печени, шейки матки, легкого, поджелудочной железы или простаты, а также линиями клеток различных типов рака крови, таких как, прогематоцитарная лейкемия, В-клеточная лимфома, моноцитарная лимфома, эритролейкемия, лимфома Беркитта или хронический миелолейкоз. Эти данные показывают, что B7H6 является новым опухолеспецифичным или опухолеассоциированным антигеном, применимым для целевой доставки веществ, обладающих терапевтической активностью в отношении опухоли, в частности для доставки цитотоксических веществ, которые способны элиминировать или остановить рост клеток опухоли. Таким образом, в некоторых вариантах исполнения конъюгат моноклонального антитела против B7H6 человека с лекарственным средством, содержащий моноклональное антитело против B7H6 человека, конъюгированное с цитотоксическим веществом, применяется для лечения B7H6-экспрессирующих опухолей. Применимые конъюгаты антитела с лекарственным средством включают те, которые состоят из антитела, способного конкурировать за связывание с B7H6 с антителами, продуцируемыми клонами гибридом из следующего списка: (i) гибридный клон 4E5.5 (депозитный № CNCM I-4242); (ii) гибридный клон 9G9.2 (депозитный № CNCM I-4243); (iii) гибридный клон 10E2.9 (депозитный № CNCM I-4244) и (iv) гибридный клон 17B1.3 (депозитный № CNCM I-4245). В некоторых исполнениях конъюгат антитела с лекарственным средством содержит антитело, способное конкурировать за связывание с B7H6 с антителом, продуцируемым клоном гибридом (ii)-(iii) из списка выше. В отдельных вариантах исполнения конъюгат антитела с лекарственным средством содержит химерное или гуманизированное антитело, являющееся производным от антитела, продуцируемого гибридным клоном (i)-(iv) из списка выше или (ii)-(iii) из списка выше.

В каждом варианте исполнения способов лечения, описанных в данной заявке, прием моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата моноклонального антитела против B7H6 человека с лекарственным средством, осуществляется в соответствии с общепринятыми способами, существующими для терапии того заболевания или расстройства, о лечении которого идет речь. В соответствии с описанием, приведенным в данной заявке, эффективное количество антитела или конъюгата антитела с лекарственным средством вводится пациенту в течение того времени и в таких условиях, которые являются достаточными для профилактики или лечения данного заболевания или расстройства.

Субъектами для введения описанных в данной заявке моноклональных антител или конъюгатов моноклональных антител с лекарственным средством являются пациенты с высоким, по сравнению с нормальным, риском развития заболевания или расстройства, опосредуемого NKp30-экспрессирующими

клетками или характеризующиеся присутствием В7Н6-экспрессирующих клеток, а также пациенты с развившимся заболеванием или расстройством. Определенные варианты исполнения используются для скрининга или диагностики у субъектов, у которых еще нет развитого заболевания или расстройства. Другие определенные варианты исполнения используются для лечения заболевания или расстройства у субъектов, у которых диагностировано данное заболевание или расстройство. Также возможно применение для мониторинга изменений в ходе лечения заболевания или расстройства (например, возрастания или снижения выраженности клинических симптомов данного заболевания или расстройства).

При профилактических применениях фармацевтические композиции (медикаменты) вводятся пациенту с высоким риском развития или склонным к развитию данного заболевания, в количестве, достаточном для элиминации или снижения риска, или задержки развития данного заболевания. В терапевтических применениях композиции вводятся пациентам с диагностированным или с подозрением на данное заболевание, в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, остановки развития симптомов данного заболевания и сопутствующих ему осложнений. Количество, достаточное для достижения данных целей называется терапевтически или фармацевтически эффективной дозой или количеством. Как в профилактическом, так и в терапевтическом режиме приема, антитело или конъюгат антитела с лекарственным средством, обычно принимается в нескольких дозировках до достижения достаточного эффекта (например, переключения соответствующей активности НК-клеток или ингибирования нежелательной активности НК-клеток). Обычно, дозу повторяют при снижении достигнутого желаемого эффекта.

Для вариантов применения настоящего изобретения в целях диагностики или скрининга для оценки риска у пациента, не страдающего от заболевания или расстройства, опосредуемого НКp30-экспрессирующими клетками или характеризующегося присутствием В7Н6-экспрессирующих клеток, результаты, полученные на биологическом образце, полученном от пациента сравниваются с результатами, полученными на образце здорового субъекта или с предварительно определенным базальным уровнем. Риск развития опухоли определяется на основе детекции более высокого уровня, полученного на образце пациента, по сравнению с таковым на сопоставимом образце здорового субъекта или базальным уровнем. Способы обнаружения композиций антител, описываемых настоящим изобретением, описаны в разделе V.C.

Композиции и способы, описываемые в настоящем изобретении, могут быть использованы для мониторинга прогресса терапии с использованием образцов, полученных от пациента через определенные временные интервалы после трансплантации ВМС или после начала противоопухолевой терапии. Уровень экспрессии В7Н6 в биологическом образце пациента определяется перед началом терапии (Т1) и сравнивается с биологическим образцом того же пациента, полученным после курса терапии (Т2). Более высокий уровень экспрессии В7Н6, как правило, характеризует прогресс развития заболевания, а более низкий - регресс.

Для определения необходимости проведения для пациента скрининговых или терапевтических процедур в соответствии со способами, описанными в данном изобретении, могут быть применены подходящие способы скрининга для определения рисков факторов, ассоциированных с определенными заболеваниями или расстройствами, опосредуемыми НКp30-экспрессирующими клетками или характеризующимися присутствием В7Н6-экспрессирующих клеток. Также данные процедуры могут быть проведены для определения статуса уже диагностированного у пациента заболевания. Такие способы могут включать, например, выявление семейного анамнеза, т.е. наличия у пациента родственников, у которых диагностировано определенное заболевание. Также скрининговые методы могут включать, например, традиционные клинические обследования для определения семейного статуса определенного заболевания с известным наследуемым рисковым фактором (например, в случае трансплантации ВМС, по данным клинических исследований показано, что присутствие определенных аллелей HLA-C коррелирует с повышенным риском отторжения аллотрансплантата костного мозга (см., Scott et al., Blood 92:4864-4871, 1998), а также известно, что различные типы рака имеют определенные наследуемые рисковые факторы). Наследуемыми рисковыми факторами опухолей могут быть, например, мутации в различных генах, которые приводят к трансформации клетки (например, Ras, Raf, EGFR, cMet и другие), присутствие или отсутствие определенных молекул HLA и иммуноглобулин-подобных рецепторов натуральных киллеров (KIR), или механизмы, с помощью которых прямо или опосредованно опухолевые клетки способны регулировать иммунную супрессию клетками, подобными НК или Т-клеткам (см., например, Ljunggren and Malmberg, Nature Rev. Immunol. 7:329-339, 2007; Boyton and Altmann, Clin. Exp. Immunol. 149:1-8, 2007). С этой целью могут стандартно применяться олигонуклеотидные пробы для идентификации индивидуумов, несущих в геноме генетические маркеры, ассоциированные с определенным изучаемым заболеванием. Кроме того, в соответствующей области хорошо известен широкий набор иммунологических методов, применимых для идентификации маркеров для определенных заболеваний. Например, доступны и широко известны в соответствующей области, различные иммуноанализы на основе ИФА, в которых применяются моноклональные антитела для детектирования антигенов, ассоциированных со специфическими опухолями. Скрининг может быть осуществлен в соответствии с симптоматологией, возрастными и рисковыми факторами и др. Данные методики позволяют на практике консультирующим

врачам определять пациентов, которым необходимы описанные в данной заявке способы лечения. В соответствии с данными способами, регуляция активности НК-клеток может применяться в качестве независимой программы лечения или в качестве последующего, дополнительного или координированного с другими способами лечения.

В. Противораковое лечение

1. Типы опухолей

Как описано и показано по результатам исследований в данной заявке, антитела против B7H6 могут применяться для прямого уничтожения B7H6-экспрессирующих клеток путем активации каскадов ADCC или CDC за счет связывания Fc-фрагмента с Fc-рецептором и белком C1q системы комплемента. В других вариантах исполнения конъюгат моноклонального антитела против B7H6 человека с лекарственным средством, содержащий цитотоксическое вещество конъюгированное с моноклональным антителом против B7H6 человека, может использоваться для доставки цитотоксического вещества к B7H6-экспрессирующим клеткам опухоли, по отношению к которым цитотоксическое вещество оказывает терапевтический эффект путем уничтожения или торможения роста этих клеток.

В табл. 4 ниже приведен список некоторых видов рака, поддающихся лечению в соответствии с настоящей заявкой. Список организован преимущественно по месту локализации.

Таблица 4. Иллюстративный список типов рака

| | |
|-----------|-----------------------------|
| 1. | Опухоли головы и шеи |
| a. | Мозг |
| b. | Ротовая полость |
| c. | Ротоглотка |
| d. | Носоглотка |

| | |
|----|---|
| e. | Готраноглотка |
| f. | Носовые ходы и параназальные синусы |
| g. | Гортань |
| h. | Губа |
| 2. | Рак легкого |
| a. | Немелкоклеточная карцинома |
| b. | Мелкоклеточная карцинома |
| 3. | Опухоли желудочно-кишечного тракта |
| a. | Колоректальный рак |
| b. | Рак желудка |
| c. | Рак пищевода |
| d. | Анальный рак |
| e. | Рак внепеченочных желчных протоков |
| f. | Рак Фатерова сосочка |
| g. | Стромальный рак желудочно-кишечного тракта (GIST) |
| 4. | Рак печени |
| a. | Аденома клеток печени |
| b. | Гепатоклеточная карцинома |
| 5. | Рак груди |
| 6. | Гинекологические опухоли |
| a. | Рак шейки матки |
| b. | Рак яичника |
| c. | Рак влагалища |
| d. | Рак вульвы |
| e. | Гестационная трофобластическая неоплазия |
| f. | Рак матки |

- | | |
|-----|---------------------------------|
| 7. | Опухоли мочевыводящих путей |
| a. | Почечная карцинома |
| b. | Рак простаты |
| c. | Рак мочевого пузыря |
| d. | Рак полового члена |
| e. | Рак уретры |
| 8. | Рак мочевого пузыря |
| 9. | Нейрональные опухоли |
| a. | Астроцитомы и глиобластомы |
| b. | Первичная лимфома ЦНС |
| c. | Медуллобластома |
| d. | Герминогенные опухоли |
| e. | Ретинобластома |
| 10. | Неоплазии эндокринной системы |
| a. | Рак щитовидной железы |
| b. | Рак поджелудочной железы |
| 1) | Опухоли островков Лангерганса |
| a) | Инсулиномы |
| b) | Глюкагономы |
| c. | Феохромоцитомы |
| d. | Карциномы надпочечников |
| e. | Карциноидные опухоли |
| f. | Карциномы паращитовидной железы |
| g. | Неоплазии шишковидного тела |
| 11. | Рак кожи |
| a. | Злокачественная меланома |
| b. | Чешуйчато-клеточная карцинома |
| c. | Базально-клеточная карцинома |
| d. | Саркома Капоши |

| | | |
|-----|---|--|
| 12. | Рак кости | |
| a. | Остеобластома | |
| b. | Остеохондрома | |
| c. | Остеосаркома | |
| 13. | Неоплазии соединительной ткани | |
| a. | Хондробластома | |
| b. | Хондрома | |
| 14. | Опухоли системы гемопоеза | |
| a. | Неходжкинская лимфома | |
| | 1) В-клеточная лимфома | |
| | 2) Т-клеточная лимфома | |
| | 3) Недифференцированная лимфома | |
| b. | Лейкемии | |
| | 1) Хронический миелолейкоз | |
| | 2) Волосаклеточная лейкемия | |
| | 3) Хроническая лимфоцитарная лейкемия | |
| | 4) Хроническая миеломоноцитарная лейкемия | |
| | 5) Острая миелоцитарная лейкемия | |
| | 6) Острая лимфобластная лейкемия | |
| c. | Миелопролиферативные расстройства | |
| | 1) Множественная миелома | |
| | 2) Эссенциальная тромбоцитемия | |
| | 3) Миелофиброз с миелоидной метаплазией | |
| | 4) Гиперэозинофильный синдром | |
| | 5) Хроническая эозинофильная лейкемия | |
| | 6) Полицитемия Вера | |

| | | |
|-----|----|---|
| | d. | Ходжкинская лимфома |
| 15. | | Детские опухоли |
| | a. | Лейкемии и лимфомы |
| | b. | Опухоли мозга |
| | c. | Нейробластома |
| | d. | Опухоль Вильмса (нефробластома) |
| | e. | Рабдомиосаркома |
| | f. | Ретинобластома |
| 16. | | Иммунотерапевтически-чувствительные опухоли |
| | a. | меланома |
| | b. | рак почек |
| | c. | лейкемии, лимфомы и миеломы |
| | d. | рак груди |
| | e. | рак простаты |
| | f. | колоректальный рак |
| | g. | рак шейки матки |
| | h. | рак яичника |
| | i. | рак легкого |

Ниже более детально обсуждаются некоторые типы рака, из перечисленных выше, включая соответствующие животные модели для оценки эффективности антител против B7H6 или конъюгатов антител с лекарственным средством при терапии опухолей в соответствии с настоящим изобретением.

а) Хронический миелейкоз

Хронический миелейкоз (СМЛ) - редкий вид рака, встречающийся наиболее часто у взрослых индивидуумов. Данный тип рака обусловлен гранулоцитами (преобладающий вид белых клеток крови). В ходе развития СМЛ происходит образование и выход в кровоток большого количества незрелых и неспособных к нормальной функции гранулоцитов. Незрелые белые клетки крови известны как бласты. В ходе развития СМЛ также нарушается продукция других видов клеток крови. В норме процессы восстановления и воспроизведения белых клеток крови упорядочены и строго контролируются, тогда как при хроническом миелейкозе этот процесс не контролируется и клетки продолжают делиться и пролиферировать аномально. Данное заболевание обычно развивается очень медленно, и рассматривается как хронический миелолейкоз.

Вследствие медленного прогресса заболевания, СМЛ сложно определять на ранних стадиях. Иногда его обнаруживают, только при анализе крови, выполняемом по другим причинам. Симптомы СМЛ часто неопределенны, неспецифичны и вызваны увеличением числа аномальных белых клеток крови в костном мозге и снижением числа нормальных клеток крови, приводя к ощущению полноты и появлению болезненной шишки с левой стороны живота. При СМЛ может увеличиваться селезенка. Опухоль селезенки может также давить на желудок, приводя к нарушению пищеварения, плохому аппетиту и анемии. Из-за низкого числа тромбоцитов в крови некоторые пациенты могут замечать, что кровотечения стали длительнее и легче образуются синяки. Ассоциированные с СМЛ "петехии" являются особым видом синяков, когда мелкая кровяная сыпь обычно появляется на ногах или во рту. У женщин при СМЛ могут более тяжело проходить менструации. Однако эти симптомы и признаки встречаются редко. Хронический миелейкоз может встречаться в любом возрасте, но более типичен у пациентов среднего возраста и у пожилых людей и редко встречается у детей (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 08-3775" Rockville, MD, Sept. 2008). Терапевтический эффект моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антител с лекарственным средством по отношению к опухоли можно оценить, например, на модели ксенотрансплантата опухоли человека, заключающейся в пересадке клеток СМЛ человека к иммунодефицитным мышам (см., например, Ren, Leukemia and Lymphoma 8:1549-1561, 2002; Van Etten, Blood Cells Mol. Dis. 27:201-205, 2001; Wong and Witte, Oncogene 20:5644-5659, 2001).

b) Множественная миелома

Множественная миелома - вид рака, затрагивающий определенные белые клетки крови, называемые плазматическими клетками. При опухоли, затрагивающей плазматические клетки, данные клетки являются аномальными и идентичными и называются миеломными клетками. Миеломные клетки, как правило, накапливаются в костном мозге и плотном, наружном веществе костей. Иногда эти клетки накапливаются в только одной кости и образуют единую массу, или опухоль, называемую плазмоцитомой. В большинстве случаев, однако, миеломные клетки накапливаются в разных костях, часто формируя множественные опухоли и являясь причиной других проблем. При наступлении такой стадии данное заболевание называют множественной миеломой.

Вследствие аномально большого количества идентичных плазматических клеток при множественной миеломе, у пациентов также вырабатывается избыток антител одного вида. Эти миеломные клетки и антитела могут вызывать ряд серьезных медицинских проблем, которые могут включать:

(1) Увеличение количества миеломных клеток приводит к повреждению и ослаблению кости, вызывая боль и иногда переломы.

(2) При повреждении костей происходит вымывание кальция, что может приводить к гиперкальцемии. Гиперкальцемия может вызывать потерю аппетита, тошноту, жажду, утомляемость, мышечную слабость, беспокойность и спутанность сознания.

(3) Миеломные клетки препятствуют образованию в костном мозге нормальных плазматических клеток и белых клеток крови других типов, важных для иммунной системы.

(4) Раковые клетки также препятствуют росту новых красных клеток крови, вызывая анемию.

(5) У больных с множественной миеломой могут развиваться серьезные проблемы с почками. Избыток антител и кальция могут мешать должной очистке крови в почках. Симптомы заболевания зависят от степени прогресса. На ранних стадиях болезни симптомов может и не быть. При появлении симптомов заболевания у больного обычно присутствуют боли в костях, часто в костях спины и ребрах. Также у пациента могут присутствовать переломы костей, чувство слабости, утомляемости, потеря веса или частые инфекционные заболевания. На более поздних стадиях симптомами могут быть также тошнота, рвота, запоры, проблемы с мочеиспусканием, слабость или онемение ног (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 08-1575" Rockville, MD, Sept. 2008). Терапевтический эффект моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антител с лекарственным средством по отношению к опухоли можно оценить, например, на модели ксенотрансплантата опухоли человека, иммунодефицитным мышам, как описано Miyakawa и соавторами, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:258-62, 2004.

c) Неходжкинская лимфома

Существует два основных типа лимфомы. Болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома. Описано около 20 видов неходжкинской лимфомы. В большинстве случаев болезни Ходжкина, в биоптатах обнаруживаются определенные клетки, называемые клетками Рид-Стенберга. Эти клетки, обычно не находят при других лимфомах, что приводит к различным терапевтическим подходам против Ходжкинских и неходжкинских лимфом.

Часто первым признаком неходжкинской лимфомы является безболезненное опухание лимфатических узлов на шее, в подмышках или паху. Другими симптомами могут быть следующие: потение ночью или необъяснимый жар, потеря аппетита, необъяснимая потеря веса, сильная утомляемость; у детей может появиться кашель или одышка. Больные могут жаловаться на боль в животе или на сильный зуд кожи по всему телу, у детей может появиться шишка на животе, (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 07-1567" Rockville, MD, Sept. 2007). Терапевтический эффект по отношению к опухоли моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антител с лекарственным средством можно оценить, на модели ксенотрансплантата неходжкинской лимфомы, схожей с описанной Ansell et.al., *Leukemia* 18:616-23, 2004.

Наиболее часто используемая классификация неходжкинских лимфом - классификация REAL (Otensmeier, *Chemico-Biological Interactions* 135-136:653-664, 2001). Для классификации лимфом определены специфические иммунологические маркеры. Например, маркеры фолликулярной лимфомы включают CD20+, CD3-, CD10+, CD5-; маркеры лимфомы из малых лимфоцитов включают CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; маркеры В-клеточной лимфомы краевой зоны включают CD20+, CD3-, CD10-, CD23-; маркеры диффузной В-крупноклеточной лимфомы включают CD20+, CD3-; маркеры лимфомы из клеток майт-зона включают CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; маркеры периферийной Т-клеточной лимфомы включают CD20-, CD3+; маркеры первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы включают CD20+, CD3-, маркеры лимфобластной лимфомы включают CD20-, CD3+, Tdt+, и маркеры лимфомы Беркитта включают CD20+, CD3-, CD10+, CD5- (Decision Resources, *Non-Hodgkins Lymphoma*, Waltham, MA., Feb. 2002).

Клиническая классификация неходжкинских лимфом (NHL), предложенная в IWF (International Working Formulation) подразделяет заболевания на подтипы:

(1) лимфома с низкой степенью злокачественности (неактивная), включающая лимфому из малых лимфоцитов, соответствующую хронической лимфоцитарной лейкемии (SC); фолликулярную, преимущественно из малых клеток с расщепленным ядром (FSC); фолликулярную смешанную, из малых клеток

с расщепленным ядром и крупных клеток (FM);

(2) лимфома со средней степенью злокачественности, включающая фолликулярную, преимущественно с крупными клетками (FL); диффузную, с малыми клетками с расщепленным ядром (DSC); диффузную смешанную, с малыми клетками и крупными клетками (DM); диффузную, с крупными клетками с расщепленным и нерасщепленным ядром (DL) и

(3) лимфома с высокой степенью злокачественности, включающая иммунобластную, с крупными клетками (IBL); лимфобластную, из клеток со складчатым и нескладчатым ядром (LL); и малых клеток с нерасщепленным ядром, лимфома Беркитта или неберкиттовская лимфома (SNC; The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer 49:2112-35, 1982). Для больных с неходжкинской лимфомой обычно применяется система классификации стадий болезни Энн Арбор. I стадия означает поражение отдельного лимфатического узла или локализованное поражение одного нелимфоидного органа или участка. II стадия означает поражение двух или более областей лимфатических узлов по одну сторону диафрагмы или локализованное поражение экстранодального участка или органа и одной или более областей лимфатических узлов по одну сторону диафрагмы. III стадия означает поражение областей лимфатических узлов по обе стороны диафрагмы, возможно сопровождаемое локализованным поражением экстранодального органа или участка. IV стадия означает диффузное или диссеминированное поражение одного или более отдаленно расположенных экстранодальных органов, сопровождающееся или не сопровождающееся поражением ассоциированных лимфатических узлов ("Lymphoid neoplasms," в American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp. 393-406). Эффективность ритуксимаба была показана для терапии неактивной и фолликулярной лимфом (Boye et. al, Annals of Oncol. 14:520-535, 2003).

д) Рак шейки матки

Шейка матки - часть соединяющего влагалище и матку прохода, которая открывается во влагалище. Рак шейки матки, также называемый карциномой шейки матки, развивается из аномальных клеток на поверхности шейки матки и является одним из самых распространенных видов рака у женщин. Раку шейки матки обычно предшествует дисплазия - предраковые изменения в клетках на поверхности шейки матки. Эти аномальные клетки могут развиваться в инвазивную опухоль. Развитие рака также проходит четыре стадии, которые выделяют по степени распространения опухоли. Чем больше распространилась опухоль, тем, вероятно, более обширное лечение потребует. Существует два основных типа рака шейки матки:

(1) Плоскоклеточный тип (эпидермоидная опухоль): наиболее распространенный тип, на который приходится от 80 до 85% случаев рака шейки матки. Этот тип рака может быть вызван венерическими заболеваниями. Одно из таких венерических заболеваний - вирус папилломы человека, который вызывает образование венерических бородавок. Канцерогенная опухоль растет на поверхности и внутри шейки матки. Опухоль обычно начинается на поверхности шейки матки и может быть определена на ранней стадии с помощью мазка Папаниколау.

(2) Аденокарцинома: данный тип рака шейки матки развивается из ткани желез шейки матки в канале шейки матки. Ранняя стадия заболевания обычно не сопровождается симптомами. Данный тип рака обычно можно определить с помощью мазка Папаниколау и гинекологического обследования. Поздние стадии болезни вызывают аномальное вагинальное кровотечение или неожиданные выделения крови, между периодами менструации, после полового акта, после менопаузы. Аномальные влагалищные выделения могут быть мутными или кровянистыми, или содержать слизь с неприятным запахом. Более поздние стадии развития заболевания могут вызывать боль (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 08-2407" Rockville, MD, Sept. 2008). Терапевтический эффект моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антител с лекарственным средством по отношению к опухоли можно оценить, например, на модели ксенотрансплантата опухоли человека, аналогичной описанной в Downs et. al., Gynecol. Oncol. 98:203-10, 2005 and Li и соавторами, Int. J. Gynecol. Cancer 15:301-7, 2005.

е) Опухоли головы и шеи

Большинство опухолей головы и шеи относятся к типу опухолей, называемому карциномой (в частности плоскоклеточной карциномой). Карциномы головы и шеи начинаются в клетках, формирующих слизистые рта, носа, глотки или уха или поверхностном слое эпителия языка. Однако, опухоли головы и шеи могут развиваться и из других типов клеток. Лимфома развивается из клеток лимфатической системы. Саркома развивается из клеток соединительной ткани, составляющих мышцы, хрящи и кровеносные сосуды. Меланома развивается из клеток, называемых меланоцитами, определяющих цвет глаз и кожи. Симптомы рака головы и шеи будут зависеть от того, где локализуется развивающаяся опухоль - например, опухоль языка может вызывать невнятную речь. Наиболее распространенными симптомами являются язва или нарыв в области головы или шеи, которые не заживают в течение нескольких недель; трудности при глотании или боль при жевании или глотании, такие проблемы с дыханием или речью, как постоянное шумное дыхание, невнятная речь или хриплый голос; чувство онемения во рту; постоянная заложенность носа или носовое кровотечение; постоянная боль в ушах, звон в ушах или проблемы со слухом; отек или опухоль в области рта или шеи, боли лица или верхней челюсти; у людей, курящих или жующих табак, предраковые изменения могут происходить в слизистой оболочке полости рта или на

языке. Эти симптомы могут проявляться как постоянные белые пятна (лейкоплакия) или красные пятна (эритроплакия). Обычно такие пятна безболезненны, но иногда могут нарываться и кровоточить (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 09-1574" Rockville, MD, Sept. 2009). Терапевтический эффект моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антител с лекарственным средством по отношению к опухоли можно оценить, например, на модели ксенотрансплантата опухоли головы и шеи человека, схожей с описанной Kuriakose et al., Head Neck 22:57-63, 2000; Cao et al., Clin. Cancer Res. 5:1925-34, 1999; Braakhuis et al., Cancer Res. 51:211-4, 1991 and Baker, Laryngoscope 95:43-56, 1985.

г) Опухоль головного мозга

Опухоли, развивающиеся в ткани головного мозга, известны как первичные опухоли мозга и называются в соответствии с типами клеток или областями мозга, в которой они начали развиваться. Наиболее распространенными первичными опухолями головного мозга, развивающимися в глиальных клетках, являются глиомы. Существует большое количество типов глиом:

(1) Астроцитомы - данная опухоль происходит из звездновидных глиальных клеток, называемых астроцитами. У взрослых астроцитомы наиболее часто образуются в головном мозге. У детей они образуются в стволе головного мозга, головном мозге и мозжечке. Астроцитомы III степени иногда называют анапластичной астроцитомой. Астроцитомы IV степени обычно называют мультиформной глиобластомой.

(2) Глиомы ствола головного мозга - данный тип опухоли развивается в нижнем отделе мозга. Глиомы ствола головного мозга наиболее часто встречается у детей и людей среднего возраста.

(3) Эпендимомы - данный тип опухоли возникает из клеток, выстилающих желудочки и центральный канал спинного мозга и наиболее часто встречается у детей и пациентов молодого возраста. (4) Олигодендроглиомы - данный редкий тип опухоли возникает из клеток, формирующих жировую ткань, покрывающую и защищающую нервные пучки. Данные опухоли обычно возникают в головном мозге. Они растут медленно и обычно не распространяются в окружающие ткани мозга. Наиболее часто такой тип опухоли встречается у людей среднего возраста. Симптомы опухоли мозга зависят от размера, типа и расположения опухоли. Симптомы могут проявляться, когда опухоль давит на нерв или повреждает определенную область мозга. Они также могут проявляться, при опухании головного мозга или накоплении жидкости в полости черепа. Наиболее распространенные симптомы опухоли головного мозга включают головную боль (обычно самую сильную утром), тошноту или рвоту; нарушения речи, зрения или слуха; проблемы с равновесием и ходьбой, изменения в настроении, особенностях характера или способности к концентрации, проблемы с памятью, подергивания или сокращения мышц (судороги или конвульсии), а также онемение или покалывание в руках или ногах (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 09-1558" Rockville, MD, May 2009). Терапевтический эффект моноклональных антител против B7H6 человека и конъюгатов антитела с лекарственным средством по отношению к опухоли может быть оценен с помощью модели ксенотрансплантата глиомы человека сходной с описанной в Bello et. al., Clin. Cancer Res. 8:3539-48, 2002. г. Опухоль щитовидной железы

Папиллярная и фолликулярная опухоли щитовидной железы составляют от 80 до 90% от всех типов опухолей щитовидной железы. Оба типа возникают в фолликулярных клетках щитовидной железы. Большинство папиллярных и фолликулярных опухолей щитовидной железы, как правило, растут медленно. При выявлении на ранней стадии лечение может быть успешно. Медуллярный рак щитовидной железы составляет от 5 до 10% случаев рака щитовидной железы и имеет происхождение из нефолликулярных клеток - С клеток. Анапластичный рак щитовидной железы является наименее распространенным типом рака щитовидной железы (только 1-2% случаев), и происходит из фолликулярных клеток. Раковые клетки такого типа являются сильно измененными и труднораспознаваемыми. Такой тип опухоли сложно контролируется вследствие очень быстрого роста и распространения раковых клеток. На ранних стадиях рак щитовидной железы не имеет симптомов. Но по мере роста опухоли симптомы могут включать шишку или узел в передней части шеи рядом с адамовым яблоком; охриплость или трудности с произношением нормальным голосом, увеличение лимфатических узлов, особенно на шее, затрудненное глотание или дыхание или боль в глотке или шее (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 07-4994" Rockville, MD, Sept. 2007). Терапевтический эффект моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством по отношению к опухоли может быть оценен с помощью модели ксенотрансплантата опухоли человека сходной с описанной Quidville et. al., Endocrinology 145:2561-71, 2004.

д) Рак печени

Существует два типа первичного рака печени. Наиболее распространенным типом является рак, называется гепатомой или гепатоклеточной карциномой (HCC), который возникает из основных клеток печени (гепатоцитов). Такой тип опухоли обычно развивается в печени, хотя иногда может распространяться и на другие органы. Кроме того, существуют более редкие и несвязанные подтипы гепатомы, называемые фиброламеллярной гепатомой, которая может развиваться у пациентов юношеского возраста. Другой тип первичного рака печени, называемый холангиокарциномой или раком желчных протоков, развивается из клеток желчных протоков. Большинство людей, у которых развивается гепатома, обычно страдают циррозом печени. При циррозе печени происходит образование мелких рубцов по всей печени, что

является следствием различных причин, включая инфекции и употребление большого количества алкоголя в течение длительного периода времени. Однако только у небольшой части пациентов с циррозом печени развивается первичный рак печени. Такие инфекции как вирус гепатита В или гепатита С могут приводить к развитию рака печени, и могут вызывать цирроз, который увеличивает риск развития гепатомы. Наличие редкого заболевания, называемого гемахроматозом, которое вызывает избыточное содержание железа в организме, увеличивает шансы развития гепатомы. Моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством могут быть использованы для лечения, профилактики, замедления прогрессии, задержки начала, и/или снижения тяжести болезни или препятствования хотя бы одному из условий или симптомов, связанных с гепатоклеточной карциномой. Гепатоклеточная карцинома в некоторых случаях ассоциирована с инфекцией гепатитом (например, гепатит В, гепатит С и гепатит D). Терапевтический эффект моноклональных антител против В7Н6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством по отношению к опухоли может быть оценен с помощью модели ксенотрансплантата опухоли человека сходной с описанной в Zhou et al., *Clin. Cancer Res.* 9:6030-7, 2003; and Huynh et al., *J. Cell Mol. Med.* 2008 (E-Publication 10.1111/j. 1582-4934.2008.00364., 2008, Blackwell Synergy), i. Рак легких

Терапевтический эффект моноклональных антител против В7Н6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством по отношению к опухоли может быть оценен с помощью модели ксенотрансплантата мелкоклеточного/немелкоклеточного рака легких. Кратко, опухоль человека пересаживают иммунодефицитным мышам, и затем проводят лечение с помощью моноклональных антител против В7Н6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством отдельно или в комбинации с другими агентами. Эффективность такого лечения может быть оценена при мониторинге роста опухоли (Nemati et al., *Clin Cancer Res.* 6:2075-86, 2000; and Hu et al., *Clin. Cancer Res.* 10:7662-70, 2004).

2. Ожидаемые результаты и противоопухолевая активность по отношению к солидным опухолям

Хотя каждый протокол может определять различные оценки реакции опухоли на терапию, критерии RECIST (критерии оценки ответа солидных опухолей на терапию) в настоящее время считаются основным руководством для оценки ответа опухоли, рекомендуемыми Национальным Институтом Рака (National Cancer Institute) {см. Therasse et. al., *J. Natl. Cancer Inst.* 92:205-216, 2000}. В соответствии с критериями RECIST, ответ опухоли означает снижение или устранение всех измеримых очагов или метастаз. Обычно заболевание считается измеряемым, если имеются очаги ≥ 20 мм, которые могут быть точно измерены по крайней мере в одном измерении с помощью обычных способов или ≥ 10 мм, при измерении с помощью спиральной компьютерной томографии, с четко определенными границами с помощью рентгена, компьютерной осевой томографии (СТ), магнитно-резонансной томографии (MRI) или клиническими исследованиями (если повреждения поверхностные). Неизмеряемой считается болезнь, при котором очаги составляют < 20 мм при измерении с помощью обычной техники или < 10 мм, при измерении с помощью спиральной компьютерной томографии, или в случае, если очаги являются действительно неизмеряемыми (слишком малый размер для точного измерения). Неизмеряемые заболевания включают плевральный выпот, асциты и болезни, документированные по косвенным признакам.

Критерии объективного статуса требуются для протоколов оценки ответа солидных опухолей. Типичные критерии включают: (1) Полный ответ (CR), определяемый как полное исчезновение измеряемого заболевания; отсутствие новых очагов, отсутствие симптомов болезни; отсутствие признаков неизмеряемого заболевания; (2) Частичный ответ (PR), определяемый как 30%-ное уменьшение суммы наибольшего диаметра целевых очагов; (3) Прогресс заболевания (PD), определяемый как 20%-ное увеличение суммы наибольшего диаметра целевого очага или появление новых очагов; (4) Стабильный или отсутствующий ответ, определяемый как не соответствующий CR, PR или PD. (см. Therasse et. al. выше)

Дополнительными ожидаемыми результатами, принятыми в онкологии, являются общая выживаемость (OS), выживаемость без признаков заболевания (DFS), объективная степень ответа (ORR), время до прогрессирования (TTP), и выживаемость без прогрессирования (PFS) (см. Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, April 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD.)

3. Комбинированное противоопухолевое лечение

Как обсуждалось ранее, в некоторых вариантах исполнения, моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством используются в сочетании со вторым агентом для лечения заболевания или расстройства. При использовании для лечения опухоли моноклональных антител против В7Н6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством, они могут использоваться в сочетании с такими общепринятыми способами противоопухолевой терапии, как, например, хирургия, лучевая терапия, химиотерапия или их комбинации. В отдельных вариантах исполнения другие терапевтические агенты применимые для комбинированной противоопухолевой терапии с помощью антител к В7Н6 или конъюгатов антитела с лекарственным средством в соответствии с данным изобретением, включают антиангиогенные агенты. В некоторых других вариантах исполнения другие терапевтические агенты, пригодные для комбинационной терапии, включают антагонисты таких факторов, участвующих в росте опухоли, как, например, EGFR, ErbB2 (Her2), ErbB3, ErbB4 или TNF. В неко-

торых вариантах исполнения антитела и конъюгаты антитела с лекарственным средством в соответствии с данным изобретением вводятся в организм совместно с цитокинами (например, цитокин, стимулирующий иммунный ответ против опухоли). Иллюстративные примеры комбинированных вариантов терапии, применимые для лечения опухоли, описаны более детально ниже.

а) Антитела против опухолеассоциированных антигенов

Как было упомянуто ранее, антителная терапия особенно успешна при лечении опухоли, т.к. некоторые виды опухолей либо обладают уникальными антигенами, либо линия-специфическими антигенами, либо антигенами, присутствующими в избыточном количестве по сравнению с нормальными клетками. Одним из механизмов, связанных с противоопухолевой активностью моноклональных антител, является антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). При ADCC моноклональные антитела связываются с клетками-мишенями (например, опухолевой клеткой), после чего специфические эффекторские клетки, экспрессирующие рецепторы для моноклональных антител (например, НК-клетки, моноциты, гранулоциты) связывают комплекс моноклональное антитело/клетка-мишень, что приводит к уничтожению клетки-мишени. Соответственно в некоторых вариантах исполнения настоящего изобретения моноклональные антитела против B7H6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством, обладающие противоопухолевой активностью, вводят в организм вместе с моноклональными антителами против вторичных опухолеассоциированных антигенов (т.е. других опухолеассоциированных антигенов, кроме B7H6). Доза и график введения моноклональных антител (MAbs) основаны на описанных фармакокинетических и токсикокинетических свойствах совместного приема специфических антител и должны быть оптимизированы в сторону минимизации любой токсичности, которая может быть связана с приемом моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством.

Комбинированная терапия с использованием моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством, как описано в данной заявке, и вторичных моноклональных антител против опухолеассоциированных антигенов может применяться в случаях, когда лечение первой линии было неудачным, и, таким образом, может рассматриваться как способ лечения второй линии. Данное изобретение также включает использование такой комбинации как способа лечения первой линии для пациентов с впервые поставленным диагнозом или проходивших ранее курсов противораковой терапии ("de novo пациенты") и пациентов, не проходивших ранее никакой терапии моноклональными антителами ("naïve пациенты").

Описанные в данной заявке моноклональные антитела против B7H6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством также применимы для комбинированной терапии с моноклональными антителами против опухолеассоциированных антигенов при отсутствии любой прямой антителопосредованной ADCC- или CDC-активности по отношению к опухолевым клеткам. Например, антитела, блокирующие ингибирующий сигнал в иммунной системе могут приводить к обширному иммунному ответу. Примеры включают (1) антитела против молекул семейства B7R, которые обладают такой же функцией ингибирования, как цитотоксический-T-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA-4), белок запрограммированной смерти 1 (PD-1), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA); (2) антитела против ингибирующих цитокинов, таких как IL-10, TGFβ; и (3) антитела, уничтожающие или ингибирующие функции супрессорных клеток, например анти-CD25 или CTLA-4. Например, моноклональные антитела против CTLA4, как мышиные, так и человеческие, либо подавляют функцию иммуно-супрессивных регуляторных Т клеток (Tregs), либо ингибируют сигнал, передающийся посредством связывания CTLA-4 на Т клетках с молекулами B7-1 или B7-2 на APC или опухолевых клетках.

В табл. 6 представлен не исключающий список моноклональных антител, одобренных или проходящих испытания, для которых возможно применение для комбинированной терапии в соответствии с данным изобретением.

Таблица 6. Препараты моноклональных антител для использования в сочетании с антителами против B7H6 или конъюгатами антитела с лекарственным средством

| <u>Мишень</u> | <u>Название лекарственного средства</u> | <u>Клинические показания</u> | <u>Производитель</u> |
|----------------------------|---|---------------------------------------|----------------------|
| TRAIL-R1 | HGS-ETR1 | Опухоли | HGS |
| TRAIL-R2 | HGS-ETR2 | Солидные опухоли | HGS |
| CD40 | SGN40 | ММ | Seattle Genetics |
| HER2 | Герцептин | Рак груди | Genentech |
| EGF-R | ABX-EGF | CRC, NSCLC, RCC | Abgenix |
| EGF-R | EMD72000 | Солидные опухоли | Merck |
| EGF-R | MDX-214 | EGF-R-положительные опухоли | Medarex |
| EGF-R | Эрбитукс | CRC | Imclone |
| $\alpha 5\beta 3$ интегрин | Витаксин | Псориаз, рак предстательной железы | AME/Lilly |
| CD152 | CTLA-4 | Опухоли | Medarex |
| CD49e | Интегрин $\alpha 5$ | Опухоли | Protein Design Labs |
| MUC18 (TIM-подоб) | ABX-MA1 | Меланома | |
| TAG-72 муцин | Анатумомаб | Опухоли | |
| CD3 | Экромекимаб | Меланома | Kyowa Hakko |

| <u>Мишень</u> | <u>Название лекарственного средства</u> | <u>Клинические показания</u> | <u>Производитель</u> |
|---------------|---|----------------------------------|----------------------|
| CD64 (Fc GR1) | Анти-CD64 | Опухоли | Medarex |
| CEA | CEA-Cide | Опухоли | Immunomedics |
| EpCAM | Напорекс | Рак толстой кишки | Centocor |
| Lewis-Y-Ag | SGN15 | Опухоли | Seattle Genetics |

б) Ингибиторы тирозинкиназы

В некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против B7H6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством, как описано в данной заявке, используются в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Тирозинкиназы - это ферменты, катализирующие перенос γ -фосфатной группы с аденозинтрифосфата на белки-мишени. Тирозинкиназы можно разделить на тирозинкиназы рецепторных белков и тирозинкиназы нерецепторных белков. Они играют важную роль в различных нормальных клеточных процессах, включая активацию через рецепторы ростовых факторов и влияя на пролиферацию, длительность жизни и рост различных типов клеток. Кроме того, как предполагается, они способствуют пролиферации опухолевых клеток, индуцируют антиапоптотические пути и способствуют ангиогенезу и метастазированию. В дополнение к активации за счет факторов роста, активация протеинкиназы за счет соматических мутаций является общим механизмом образования опухолей. Некоторые из таких мутаций идентифицированы в киназах B-Raf, FLT3, BCR-ABL, c-KIT, киназах каскадов эпидермального фактора роста (EGFR) и PDGFR. Her2, VEGFR и c-Met - это другие важные каскады рецепторной тирозинкиназы (RTK), вовлеченные в образование и прогрессирование опухолей. Вследствие большого числа клеточных процессов, инициируемых тирозинкиназами, они были определены как ключевые мишени для ингибиторов.

Ингибиторы тирозинкиназы (TKI) являются небольшими молекулами, действующими внутри клетки, конкурируя с аденозинтрифосфатом (ATP) за связывание с каталитическим доменом рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ. Это конкурентное связывание блокирует инициацию нисходящего сигнала, приводящего к осуществлению эффекторных функций, связанных с такими событиями сигналинга, как рост, выживание и ангиогенез. Используя структурные и вычислительные подходы, из обширной химической комбинаторной библиотеки был идентифицирован ряд веществ-ингибиторов тирозинкиназ.

Предполагается, что большинство TKI ингибируют рост опухолей за счет прямого ингибирования опухолевых клеток или за счет ингибирования ангиогенеза. Кроме того, определенные TKI, включающие сорафениб и сунитиб, влияют на сигнальные каскады через рецепторы семейства VEGF. В некоторых случаях TKI, как было показано, активируют функции дендритных клеток и других клеток системы врожденного иммунитета, таких как НК-клетки. Для иматиниба это было недавно показано на животных моделях. Иматиниб является TKI, который, как было показано, повышает цитотоксическую активность

дендритных клеток и НК-клеток (обзор см., Smyth et al., NEJM 354: 2282, 2006).

BAY 43-9006 (сорафениб, Nexavar®) and SU11248 (сунитиниб, Sutent®) являются двумя TKI, недавно одобренными для использования при метастазирующей почечной карциноме (RCC). Ряд других TKI находятся в той или иной стадии разработки для терапии различных видов рака. Другие TKI включают следующие, но не ограничиваются ими: Иматиниб мезилат (Gleevec®, Novartis); Гефинитиб (Iressa®, AstraZeneca); Эрлотиниб гидрохлорид (Tarceva®, Genentech); Вандетаниб (Zactima®, AstraZeneca), Типифарниб (Zarnestra®, Janssen-Cilag); Дазатиниб (Sprycel®, Bristol Myers Squibb); Лонафарниб (Sarasar®, Schering Plough); Витаналиб сукцинат (Novartis, Schering AG); Лапатиниб (Tykerb®, GlaxoSmithKline); Нилотиниб (Novartis); Лестауртиниб (Cephalon); Пазопаниб гидрохлорид (GlaxoSmithKline); Акситиниб (Pfizer); Канертиниб гидрохлорид (Pfizer); Пелитиниб (National Cancer Institute, Wyeth); Тандутиниб (Millennium); Бозутиниб (Wyeth); Семаксаниб (Sugen, Taiho); AZD-2171 (AstraZeneca); VX-680 (Merck, Vertex); EXEL-0999 (Exelixis); ARRY-142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901 (Pfizer); AMG-706 (Amgen); BIBF-1120 (Boehringer Ingelheim); SU-6668 (Taiho); CP-547632 (OSI); (AEE-788 (Novartis); BMS-582664 (Bristol-Myers Squibb); JNK-401 (Celgene); R-788 (Rigel); AZD-1152 HQPA (AstraZeneca); NM-3 (Genzyme Oncology); CP-868596 (Pfizer); BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb); PTC-299 (PTC Therapeutics); ABT-869 (Abbott); EXEL-2880 (Exelixis); AG-024322 (Pfizer); XL-820 (Exelixis); OSI-930 (OSI); XL-184 (Exelixis); KRN-951 (Kirin Brewery); CP-724714 (OSI); E-7080 (Eisai); HKI-272 (Wyeth); CHIR-258 (Chiron); ZK-304709 (Schering AG); EXEL-7647 (Exelixis); BAY-57-9352 (Bayer); BIBW-2992 (Boehringer Ingelheim); AV-412 (AVEO); YN-968D1 (Advenchen Laboratories); Мидостаурин (Novartis); Перифосин (AETerna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322 (Pfizer); AZD-1152 (AstraZeneca); ON-01910Na (Onconova) и AZD-0530 (AstraZeneca).

с) Химиотерапевтические комбинации

В некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством вводят в организм в сочетании с одним или несколькими химиотерапевтическими препаратами. Химиотерапевтические препараты обладают различными способами действия, например, воздействуя на ДНК, или РНК и нарушая цикл репликации. Примерами химиотерапевтических препаратов, действующих на уровне ДНК или РНК, являются антиметаболиты (такие как Азатиоприн, Цитарабин, Флударабин фосфат, Флударабин, гемцитабин, цитарабин, кладрибин, 6-меркаптопурин, капецитабин, 6-тиогуанин, метотрексат, 5-фторурацил и гидроксимочевина; аликилирующие агенты (такие как Мелфалан, Бусульфид, Цисплатин, Карбоплатин, Циклофосфамид, Ифосфамид, Дакарбазин, Прокарбазин, Хлорамбуцил, Тиотеп, Томустин, Темозоломид); антимитотические препараты (такие как Винорелбин, Винкристин, Винбластин, Доцетаксел, Паклитаксел); ингибиторы топоизомераз (такие как Доксорубин, Амсакрин, Иронотекан, Даунорубин, Эпирубин, Митомицин, Митоксантрон, Идарубин, Тенипозид, Этопосид, Топотекан); антибиотики (такие как актиномицин и блеомицин); аспарагиназа; антрациклины, таксаны.

д) Радиотерапевтические комбинации

В некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством вводят в организм в сочетании с радиотерапией. Лечение некоторых видов опухолей может осуществляться при использовании облучения или радиофармацевтических препаратов. Радиотерапия обычно используется для терапии нерезектабельных или неоперабельных опухолей и/или опухолевых метастаз. Радиотерапия обычно проводится тремя способами. Внешнее облучение проводится на расстоянии от тела и включает гамма-лучи (^{60}Co) и рентгеновские лучи. Брахитерапия использует такие источники как, например, ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{192}Ir или ^{125}I , воздействуя непосредственно на целевую ткань или в контакте с ней.

е) Комбинации с гормональными препаратами

В некоторых вариантах исполнения моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством принимают в сочетании с гормонами или антигормонами. Определенные виды опухолей связаны с гормональной зависимостью и включают, например, рак яичников, рак груди и рак предстательной железы. Лечение гормонально-зависимой опухоли может включать использование антиандрогенов или антиэстрогенов веществ. Гормоны и антигормоны, используемые при лечении опухоли, включают Эстрамустин фосфат, Полиэстрадиол фосфат, Эстрадиол, Анастрозол, Эксеместан, Летрозол, Тамоксифен, Мегестрола ацетат, Медроксипрогестерона ацетат, Октреотид, Ципротерона ацетат, Бикалтамид, Флутамид, Триторелин, Лепротин, Бусерелин и Гoserелин.

При введении в организм моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством представляют собой фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством, может быть составлена в соответствии с известными способами приготовления применимых фармацевтических композиций, согласно которым терапевтическая молекула смешивается с фармацевтически приемлемым носителем. Композиция называется "фармацевтически приемлемым носителем", если ее введение может хорошо переноситься пациентом. Стерильный фосфатно-буферный солевой раствор является одним из примеров фармацевтически приемлемого носителя. Другие

приемлемые носители известны специалистам в данной области (см., например, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995).) Составление композиции может также включать одно или несколько вспомогательных веществ, консерванты, солюбилизаторы, буферные вещества, альбумин для предотвращения денатурации белков на поверхности флакона и так далее.

Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством, вводится пациенту в эффективном количестве. В соответствии со способами, описанными в данной заявке, антитела или конъюгаты антитела с лекарственным средством могут вводиться в организм пациента различными способами, включая, например внутримышечное, подкожное, внутривенное, внутрипредсердное, внутрисуставное, парентеральное, интраназальное, интритилежное, трансдермальное, внутриплевральное, интратекальное введение или введение оральным путем. Для профилактики и терапии антитела или конъюгаты антитела с лекарственным средством могут вводиться пациенту в форме одной таблетки, при постоянной подаче лекарства (например, постоянное трансдермальное введение) свыше продленного периода времени или при повторяющемся протоколе приема (например, каждый час, раз в день, раз в неделю).

В связи с этим определение эффективной дозировки обычно основывается на данных, полученных при изучении животных моделей, и в последующих клинических испытаниях на человеке. Кроме того, учитываются данные об эффективных дозировках и схемах введения, которые в значительной степени снижают частоту возникновения и тяжесть болезни или расстройства на модельных объектах. Эффективные дозы композиций настоящего изобретения зависят от многих различных факторов, включающих способ введения, целевой орган, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, принимаются ли другие лекарственные средства, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, а также специфическая активность композиции и ее способность вызывать желаемый отклик у пациента. Обычно пациентом является человек, но при некоторых болезнях пациентом может быть нечеловекоподобное млекопитающее. Обычно схемы дозировки должны обеспечивать оптимальный терапевтический эффект, т.е. оптимальную эффективность и безопасность. Соответственно терапевтически или профилактически эффективное количество также является таким количеством, при котором любые заложенные отрицательные эффекты перевешиваются положительными эффектами изменения эффективности НКр30-опосредованных НК-клеток. Вводимая доза моноклональных антител против В7Н6 человека или конъюгатов антитела с лекарственным средством обычно варьируется от 0,1 мг до 100 мг/кг или от 1 мкг/кг до около 50 мг/кг и чаще от 10 мкг до 5 мг на килограмм массы тела пациента. Дозировки в таком диапазоне могут достигаться с помощью одноразового или многократного введения, включающего, например, несколько раз в день или раз в день, в неделю, в две недели или в месяц. Например, в некоторых вариантах схема состоит из первого введения, а затем нескольких последующих введений с интервалом в неделю или в две недели. Другие схемы состоят из первого введения, а затем нескольких последующих введений с интервалом в месяц или два месяца. Кроме того, введение может быть нерегулярным, что связано с активностью НК-клеток и/или клиническими симптомами болезни или расстройства.

Лечащий врач может менять дозировку фармацевтической композиции для поддержания желаемой концентрации в целевом сайте. Например, при выборе внутривенного способа доставки лекарства, локальная концентрация препарата в кровеносных сосудах целевой ткани может быть около 1-50 нмоль/л, иногда от 1 нмоль/л до 10, 15 или 25 нмоль/л в зависимости от состояния пациента и прогнозируемого измеряемого ответа. Более высокая или более низкая концентрация может быть выбрана в зависимости от способа доставки лекарства, например, трансэпидермальное введение по сравнению с введением с поверхности слизистой оболочки. Дозировка также должна быть подобрана в зависимости от скорости высвобождения вводимого препарата, например, назальный спрей по сравнению с порошком, лекарственная форма, вводимая перорально с замедленным высвобождением или впрыскиваемые частицы, лекарственная форма для трансдермального введения и т.д. Например, для достижения такого же уровня концентрации в плазме, медленно высвобождающиеся частицы со скоростью высвобождения 5 нмоль (при стандартных условиях) нужно вводить в два раза чаще, чем частицы со скоростью высвобождения 10 нмоль.

Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональные антитела против В7Н6 человека или конъюгаты антитела с лекарственным средством, может доставляться в жидкой форме, в виде аэрозоля или в твердой форме. Жидкие формы представлены инъекционными растворами, аэрозолями, каплями, растворами для местного применения или оральными суспензиями. Типичные твердые формы включают капсулы, таблетки и формы с контролируемым высвобождением лекарственного вещества. Последняя форма представлена осмотическими миниомпами и имплантатами. (См., например, Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 95-123 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps," in *Protein Delivery: Physical Systems* 239-254 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems* 93-117 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997).) Другие твердые формы включают крема, пасты, местные аппликации и тому подобные.

Липосомы используются как одно из средств доставки терапевтических композиций, например, при внутривенном, внутрибрюшинном, внутримышечном, подкожном или пероральном введении, ингаляции или интраназальном введении. Липосомы - это микроскопические везикулы, содержащие один или более липидных бислоев, окруженных водным компонентом. (См., в общем, Bakker-Woudenberg et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Suppl. 1):S61, 1993; Kim, Drugs 46:618, 1993; Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in Drug Delivery Systems 3-24 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995).) Липосомы по строению похожи на биологические мембраны, в результате чего введение липосом безопасно и они биоразлагаемы. В зависимости от способа приготовления липосомы могут быть однослойными и многослойными, а размер липосом может варьировать от 0,02 мкм до более чем 10 мкм. В липосомы могут быть инкапсулированы различные вещества: гидрофобные вещества располагаются в бислоях, а гидрофильные во внутреннем водном пространстве(вах). (См, например, Machy et al., Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987); Ostro et al., Amncan J. Hosp. Pharm. 46:1576, 1989.) Кроме того, такой способ доставки позволяет контролировать терапевтическую доступность инкапсулированного вещества путем изменения размера липосом, числа бислоев, липидного состава, а также изменения заряда и характеристик поверхности липосом.

Липосомы могут абсорбироваться практически на любом типе клеток и затем медленно высвобождать инкапсулированное вещество. Кроме того, абсорбированная липосома может подвергнуться эндоцитозу фагоцитарными клетками. За эндоцитозом следует внутрилизосомная деградация липосомных липидов и высвобождение инкапсулированных веществ (см. Scherphof et al., Ann. N.Y. Acad. Set. 446:368, 1985). После внутривенного введения липосомы небольшого размера (0,1-1,0 мкм) обычно захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы, находящимися преимущественно в печени и селезенке, в то время как липосомы более 3,0 мкм накапливаются в легких. Это селективное поглощение более мелких липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы используется для доставки химиотерапевтических препаратов к макрофагам и опухолям печени.

Поглощение липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы можно избежать несколькими способами, включающими насыщение большими дозами липосомальных частиц или селективное подавление активности макрофагов фармакологическими средствами (см. Claassen et. al., Biochim. Biophys. Acta 802:428, 1984). Кроме того, введение гликолипид- или полиэтиленгликоль-производных фосфолипидов в липосомные мембраны, как было показано, приводит к значительному уменьшению захвата липосом клетками ретикулоэндотелиальной системой (см. Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1068:133, 1991; Allen et al, Biochim. Biophys. Acta 1150:9, 1993).

Липосомы могут быть также ориентированы на воздействие на определенные клетки или органы путем изменения фосфолипидного состава или включения рецепторов или контррецепторов в липосомы. Например, липосомы с большим содержанием неионных поверхностно-активных веществ были использованы для воздействия на печень, (см. например, Japanese Patent 04-244,018 to Hayakawa et. al, Kato et. al., Biol. Pharm. Bull. 16:960, 1993.) Эти составы были приготовлены путем смешения фосфатидилхолина из соевых бобов, α -токоферола и этоксилированного гидрогенизированного касторового масла (HCO-60) в метаноле, концентрирования смеси под вакуумом, и, затем, растворения смеси в воде. Липосомальный состав дипальмитилфосфатидилхолина (DPPC) со стерил-глюкозидной смесью, полученной из соевых бобов (SG) и холестерином (Ch), как было показано, также локализуется в печени (См. Shimizu et. al., Biol. Pharm. Bull. 20:881, 1997.)

Кроме того, различные контррецепторы для обеспечения специфичности контакта липосомы с мишенью могут быть связаны с поверхностью липосомы: антитела, антительные фрагменты, углеводы, витамины и транспортные белки. Например, для обеспечения специфичности липом к клеткам печени, липосомы могут быть модифицированы с помощью производных галактозиллипидов разветвленного типа, связывающихся с асиалогликопротеиновыми рецепторами (распознают остатки галактозы), которые селективно экспрессируются на поверхности клеток печени (см. Kato and Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:287, 1997; Murahashi et al., Biol Pharm. Bull. 20:259, 1997.) Более распространенный подход к обеспечению тканеспецифичности заключается в том, что клетки-мишени предварительно метят биотинилированными антителами, специфичными к контррецепторам, экспрессирующимся на клетках-мишенях (См. Narasym et. al, Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99, 1998.) После удаления из плазмы свободных антител в организм вводятся липосомы, конъюгированные со стрептавидином. При другом подходе тканеспецифические антитела непосредственно связаны с липосомами (См. Narasym et al., *вверху*.)

Антитела или конъюгаты антитела с лекарственным средством могут быть инкапсулированы в липосомы с помощью стандартных методик белкового микроинкапсулирования (см., например, Anderson et al., Infect. Immun. 31:1099, 1981; Anderson et al., Cancer Res. 50:1853, 1990; Cohen et. al, Biochim. Biophys. Acta 1063:95, 1991; Alving et. al., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in Liposome Technology (Vol. III) 317 (Gregoriadis, ed., CRC Press, 2nd ed. 1993); Wassef et. al, Meth. Enzymol 149:124, 1987.) Как отмечено выше, липосомы, пригодные для терапевтического применения, могут содержать различные компоненты. Например, липосомы могут содержать липидные производные полиэтиленгликоля. (См. Allen et. al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9, 1993.)

Деградирующие полимерные микросферы были разработаны для поддержания высокого системно-

го уровня терапевтических белков. Микросферы изготавливаются из таких деградирующих полимеров как сополимер лактида с гликолидом (PLG), полиангидриды, полиортоэфир небиоразлагаемые полимеры этиленвинилацетата, в которых белки заключены в полимер (см., например, Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 51-93 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems* 45-92 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997); Bartus et. al., *Science* 281:1161, 1998; Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153, 1998; Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548, 1998). Наносферы, покрытые полиэтиленгликолем (PEG), можно также вводить внутривенно для доставки терапевтических белков (См., например, Gref et. al., *Pharm. Biotechnol.* 10:167, 1997.)

Специалистами в соответствующей области могут быть разработаны другие лекарственные формы, как показано, например, Ansel и Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lea & Febiger, 5th ed. 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995) and Ranade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Фармацевтические композиции, как описано в данной заявке, могут также быть использованы для комбинированной терапии. Термин "комбинированная терапия" используется в данной заявке для обозначения той ситуации, когда пациенту вводят по крайней мере одну терапевтически эффективную дозу моноклональных антител против В7Н6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством в сочетании со вторым веществом для лечения заболевания или расстройства. Антитела против В7Н6 или конъюгат антитела с лекарственным средством и второе вещество могут, например, вводиться совместно (например, как одна композиция, содержащая оба вещества или одновременно как разные композиции в тот же или почти тот же целевой орган или ткань) или, в другом случае, вводиться отдельно (например, в разное время и/или разные целевые органы или ткани).

Фармацевтические композиции могут поставляться как наборы, содержащие контейнер, который содержит терапевтический полипептид или полинуклеотид, описанные в данной заявке. Терапевтическая молекула может поставляться, например, в форме впрыскиваемого раствора для однократного или многократного применения или как стерильный порошок, который необходимо растворять перед инъекцией. Кроме того, такой набор может включать диспенсер для сухих порошков, жидкостной аэрозольный генератор или ингалятор для введения терапевтических пептидов или полинуклеотидов. Такой набор может дополнительно содержать письменную информацию о показаниях и применении фармацевтической композиции. Например, такая информация может включать предписание о наличии противопоказаний к применению композиции против В7Н6 у пациентов с повышенной чувствительностью к В7Н6.

С. Способы определения экспрессии В7Н6

Антитела, описанные в данной заявке также применимы для определения экспрессии В7Н6, включая применение для диагностики. Определение уровня экспрессии может быть необходимо по ряду причин. Например, определение уровня экспрессии В7Н6 на клеточном уровне может применяться при диагностике рака. Определение уровня экспрессии В7Н6 может быть частью процедур скрининга, диагностики или прогнозирования развития рака. Способ определения уровня экспрессии В7Н6 может применяться для сравнения уровней экспрессии В7Н6 в образце пациента со стандартным образцом или референсным количеством, в качестве одного из анализов при определении степени тяжести или стадии развития опухоли или мониторинга результатов лечения. Данный способ детекции экспрессии В7Н6 может использоваться однократно или многократно для таких приложений, как мониторинг, например, для мониторинга прогресса лечения, давая информацию о рецидиве опухоли.

В определенных вариантах исполнения способ определения уровня экспрессии В7Н6 на клеточном уровне включает обработку тестируемого биологического образца моноклональными антителами против В7Н6 и последующее определение уровня связывания антител. Связывание антител показывает присутствие В7Н6 на клетках образца. Антитело и молекула В7Н6 образуют комплекс антиген-антитело, при этом определение условий, в которых формируется данный комплекс в зависимости от свойств биологического образца и способа анализа, не является затруднительным для специалистов в данной области. Применимыми антителами являются антитела, способные конкурировать за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека с антителами, продуцируемыми клонами гидридом из группы, состоящей из:

- (i) гибридомный клон 4Е5.5 (депозитный № CNCM I-4242);
- (ii) гибридомный клон 9G9.2 (депозитный № CNCM I-4243);
- (iii) гибридомный клон 10Е2.9 (депозитный № CNCM I-4244) и
- (iv) гибридомный клон 17В1.3 (депозитный № CNCM I-4245).

Тестируемый биологический образец может содержать интактные человеческие клетки или мембранную фракцию тестируемых клеток. Например, клетками, тестируемыми с помощью заявленных способов являются клетки, предположительно экспрессирующие В7Н6 и ассоциированные с развитием опухоли у пациента, такие как, например, клетки рака толстой кишки, клетки рака печени, клетки рака шейки матки, клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака простаты, клетки прогениторной лейкемии, клетки В-клеточной лимфомы, клетки моноцитарной лимфомы, клетки эритролейкемии, клетки лимфомы Беркитта, клетки хронического миелолейкоза и другие.

Определение связывания с антителом для обнаружения присутствия В7Н6-экспрессирующих клеток подразумевает анализы на специфическое связывание с помощью любого метода, известного в соответствующей области. Существует большое количество хорошо известных форматов для подобного анализа. Например, системы анализа связывания могут быть прямым и непрямым, с использованием таких методик, как Вестерн блоты, радиоиммуноанализ, ИФА, "сэндвич"-иммуноанализы, иммунопреципитационные анализы, преципитиновые анализы, гель-диффузионные преципитиновые анализы, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммуноанализы, иммуноанализы с использованием белка А, анализ фиксации комплемента и другие. Такие анализы являются потоковыми и хорошо известны в соответствующей области. Для повышения чувствительности определения, используемое антитело отмечается детектируемой меткой, например, радиоизотопной, флуоресцентной, хемилюминесцентной, ферментативной или биолюминесцентной меткой. Способы конъюгирования меток и антител описаны в соответствующей области, и любой соответствующий способ может быть использован.

Настоящее изобретение также включает способ диагностики пациента с подозрением на наличие опухоли экспрессирующей В7Н6. Данный метод включает введение субъекту, чаще всего человеку (однако субъектом может являться другой вид млекопитающих, например, не-человекообразный примат, собака, кошка, свинья и др.) моноклонального антитела против В7Н6 конъюгированного с детектируемой меткой, такой, как описано выше. Применимыми антителами являются антитела, конкурирующие за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) с антителом, продуцируемым клоном гибридомы из группы, состоящей из:

- (i) гибридомный клон 4E5.5;
- (ii) гибридомный клон 9G9.2;
- (iii) гибридомный клон 10E2.9 и
- (iv) гибридомный клон 17B1.3.

В некоторых вариантах исполнения, используемые антитела конкурируют за связывание с внеклеточным доменом В7Н6 с антителами, продуцируемыми клоном гибридомы (ii)-(iii) из списка выше. В отдельных вариантах исполнения антитело является химерным или гуманизированным антителом, производным от антител, продуцируемых клоном гибридом (i)-(iv) из списка выше или (ii)-(iii) из списка выше. После приема антитела, определяется распределение данного антитела в организме субъекта. Способы детекции распределения любой специфической метки известны специалистам в соответствующей области. Может использоваться любой подходящий способ. Неограничивающий список примеров включает компьютерную томографию (КТ), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ), флуоресценцию, хемилюминесценцию и ультразвуковое исследование.

Данная заявка ниже иллюстрируется неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1. Получение и отбор моноклональных антител мыши против В7Н6 человека

А. Иммунизация

Мыши линии Balb/c были иммунизированы в соответствии со следующим протоколом:

D0: внутривенное введение 100 мкг растворимого В7Н6 (внеклеточный домен В7Н6 человека слитый с мышинным Fc-фрагментом со стороны C-конца (hВ7Н6/mFc2; зрелая форма, остатки 25-500 последовательности №3))

D15: внутривенное введение 100 мкг растворимого В7Н6

D25: интраперитонеальное бустирование 100 мкг растворимого В7Н6

Три дня спустя после третьей иммунизации выделяли селезенку. Изолировали спленоциты, сливали с клетками миеломной линии и рассевали в 40 96-луночных планшетов. Через 3 недели культивирования анализировали супернатанты 3840 поликлональных линий гибридом на присутствие моноклональных антител против В7Н6 человека.

В. Первичный скрининг гибридомных клонов

Для отбора поликлональных линий гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против В7Н6 человека, клетки линии Р815, экспрессирующие В7Н1 и линии Р815, экспрессирующие В7Н6, инкубировали с супернатантами 3840 поликлональных линий гибридом. Результаты оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием для окрашивания иммуноглобулинов против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с красителем Cy5. В результате показано, что 144 из 3840 поликлональных линий гибридом были позитивны при взаимодействии с В7Н6-экспрессирующими клетками в отличие от В7Н1-экспрессирующих, что означает продукцию этими линиями моноклональных антител против В7Н6.

С. Второй скрининг поликлональных линий гибридом

Второй скрининг проводили для отбора блокирующих антител. Для идентификации таких поликлональных линий гибридом оценивали способность каждого из 114 супернатантов блокировать связывание NKp30Fc с клетками линии Р815.В7Н6. Для отобранных поликлональных линий гибридом параллельно проводили подтверждение продукции моноклональных антител против В7Н6 с помощью инкубации с клетками линии Р815.В7Н6. Дополнительно в качестве положительного контроля для анализа использовали поликлональные антитела против В7Н6, для которых предварительно была продемонстрирована

ингибирующая связывание NKp30 с B7H6-экспрессирующими клетками линии P815 активность.

Полученные результаты продемонстрировали, что клетки линии P815.B7H6 окрашивались NKp30Fc и данное окрашивание ингибировалось поликлональными антителами против B7H6 в концентрации 10 мкг/мл. В соответствии с полученными результатами 114 супернатанта разделили на 4 группы:

- (1) поликлональные линии гибридом, продуцирующие моноклональные антитела против B7H6, блокирующие связывание NKp30Fc (1/114);
- (2) поликлональные линии гибридом, продуцирующие моноклональные антитела против B7H6 не блокирующие связывание NKp30Fc (27/114);
- (3) поликлональные линии гибридом, продуцирующие моноклональные антитела против B7H6, которые лишь частично блокируют связывание NKp30Fc (1/114);
- (4) поликлональные линии гибридом, не продуцирующие каких-либо моноклональных антител против B7H6 (85/114). В итоге, 29 поликлональных линий гибридом эффективно продуцируют моноклональные антитела против B7H6 и только 2 линии продуцируют блокирующие моноклональные антитела. Данные 29 поликлональных линий гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против B7H6 клонировали.

Д. Клонирование поликлональных линий гибридом

После клонирования 29 отобранных поликлональных линий гибридом 11 линий не дали клонов, клоны, полученные от 5 поликлональных линий гибридом оказались негативны по требуемым свойствам, 13 поликлональных линий гибридом, дали позитивные и способные к росту гибридомные клоны. Нарращивание в культуральных колбах позволило получить только 9 клонов, производных 5 поликлональных линий гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против B7H6. Были охарактеризованы и определены как мышинные антитела изотипа IgG1 антитела следующих клонов гибридом: 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 и 17B1.3.

Гибридомные клоны, экспрессирующие моноклональные антитела против B7H6 депонировали в патентный депозитарий Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) Института Пастера в Париже, в качестве оригинальных депозитов в соответствии с Будапештским договором. Клонам были присвоены следующие депозитные номера: гибридомный клон 4E5.5 (депозитный № CNCM I-4242, депонирован 18 ноября, 2009); гибридомный клон 9G9.2 (депозитный № CNCM I-4243, депонирован 18 ноября, 2009); гибридомный клон 10E2.9 (депозитный № CNCM I-4244, депонирован 18 ноября, 2009); и гибридомный клон 17B1.3 (депозитный № CNCM I-4245, депонирован 18 ноября, 2009).

Пример 2. Характеристика моноклональных антител мыши против B7H6 человека

А. Активность моноклональных антител мыши против B7H6 человека по отношению к клеткам опухолевых линий

Каждое моноклональное антитело против B7H6 человека (4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9, и 17B1.3) сравнивали по способности окрашивать клетки опухолевых линий с препаратом поликлональных антител против B7H6. Использовали клетки следующих линий: HEK-293, HeLa EV2, K562, и Raji. Клетки линий P815.B7H6 и P815.B8H1 использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Каждое из данных пяти моноклональных антител было способно окрашивать клетки всех опухолевых линий, с незначительными вариациями по интенсивности окрашивания между исследуемыми антителами. Например, антитела клона 17B1.3 окрашивали клетки линии P815.B7H6 с такой же интенсивностью, что и препарат поликлональных антител, однако эффективность окрашивания ими клеток линии Raji была ниже. Также, окрашивание антителами клона 17B3.1 клеток линий HEK-293 и HeLa EV2 было менее интенсивным, чем у препарата поликлональных антител, тогда как окрашивание клеток линии K562 было более слабым с антителами клона 4E5.5, по сравнению с препаратом поликлональных антител.

С. Дифференцировка эпитопов с помощью конкурентного анализа

Для определения перекрытия эпитопов, связываемых моноклональными антителами клонов 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 and 17B1.3, проводили конкретный анализ. Только антитела гибридомного клона 9G9.2 были непосредственно конъюгированы с флуорохромом (Alexa 647, Molecular Probes). Таким образом, данное антитело использовали для оценки уровня связывания данного антитела с клетками линии HEK-293 после инкубации клеток с другими моноклональными антителами против B7H6. Клетки линии HEK-293 сначала инкубировали с препаратами очищенных моноклональных антител при концентрации 30 мкг/мл, после чего инкубировали клетки с конъюгатом 9G9.2-Alexa647 в концентрации 10 мкг/мл. После этого оценивали интенсивность окрашивания клеток антителами 9G9.2-Alexa647 с помощью проточной цитофлуориметрии (BD Sciences, Inc., Franklin Lakes, NJ). По результатам такого анализа показано, что предварительная инкубация клеток линии HEK-293 с моноклональными антителами клонов 10E2.9, 4E5.5, или 9G9.2 в значительной степени снижает интенсивность окрашивания данных клеток моноклональным антителом 9G9.2-Alexa 647. Предварительная инкубация клеток линии HEK-293 с моноклональными антителами клона 5E1.4 в значительно меньшей степени снижает интенсивность окрашивания этих клеток антителом 9G9.2-Alexa 647. Предварительная инкубация клеток с антителами клона 17B1.3 не оказывает значимого эффекта на последующее окрашивание этих клеток антителом 9G9.2-Alexa 647. Полученные результаты показывают, что антитела клонов 10E2.9, 4E5.5 и 9G9.2 связы-

ваются с перекрывающимися эпитопами (возможно, с одинаковыми или очень схожими). Антитела клонов 17B1.3 и 9G9.2 (и, возможно, 5E1.4 и 9G9.2) распознают неперекрывающиеся эпитопы.

D. Моноклональные антитела мыши против B7H6 человека блокируют связывание NKp30Fc в значительной степени

Для определения моноклональных антител, которые обладают блокирующей активностью по отношению к связыванию с NKp30Fc использовали конкурентный анализ связывания. NKp30Fc представляет собой растворимую форму NKp30 человека, состоящую из внеклеточного домена NKp30 человека слитый с Fc-фрагментом с C-конца. В ходе анализа оценивали связывание NKp30Fc с клетками линии HEK-293 после инкубации клеток с поликлональными антителами против B7H6, mIgG1, контролем и очищенными моноклональными антителами мыши против B7H6 человека 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 и 17B1.3. Сначала клетки линии HEK-293 инкубировали с очищенными моноклональными антителами в концентрации 30 мкг/мл, отмывали и, затем, инкубировали с комплексом NKp30Fc (5 мкг/мл)/PE-конъюгированные антитела против иммуноглобулинов человека (5 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Интенсивность флуоресцентного сигнала оценивали с помощью прибора BD FACSCalibur™ (BD Sciences Inc.) и программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR). По результатам анализа моноклональные антитела клонов 4E5.5 и 17B1.3 в значительной степени блокировали связывание NKp30Fc.

E. Моноклональные антитела мыши против B7H6 человека в значительной степени блокируют активацию DOMSP30.

Для подтверждения блокирующей активности моноклональных антител 17B1.3 и 4E5.5 проводили функциональный анализ с использованием клеток линии DOMSP30 в качестве репортеров. Клетки линии DOMSP30 использовали в качестве репортерной клеточной системы для подтверждения способности B7H6 индуцировать передачу сигнала напрямую через NKp30. (См. Schleinitz et al. Arthritis Rheum. 58:32156-3223, 2008, для описания DOMSP30). Активация DOMSP30 может быть детектирована либо по продукции интерлейкина 2 через 24 ч после стимуляции, либо по повышению уровня экспрессии CD69 через 4 ч после стимуляции. Клетки линии DOMSP30 культивировали совместно с клетками линий HeLa EV2 либо HeLa PF в присутствии и в отсутствии антител против NKp30, NKp46, поликлональных антител против B7H6, IgG1 мыши или одного из моноклональных антител против B7H6 человека 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 и 17B1.3 (в концентрации 10мкг/мл). После 4 ч совместного культивирования оценивали число (процент) CD69⁺ клеток DOMSP30.

По результатам анализа, антитела против NKp30 полностью блокировали DOMSP30 активацию, а моноклональные антитела 4E5.5 и 17B1.3 частично ингибировали активацию DOMSP30. Вкратце, в отсутствие антител около 75% клеток линии DOMSP30 были CD69, тогда как процент CD69 клеток при культивировании в присутствии антител был следующим: менее 10% при анти-NKP30 антителах, около 20% при поликлональных антителах против B7H6, около 45% при моноклональных антителах 4E5.5 или 17B1.3. В то же время, антитела против NKp46 и моноклональные антитела 9G9.2, 10E2.9 и 5E1.4 не оказывали эффекта на активацию DOMSP30.

F. Моноклональное антитело мыши против B7H6 человека приемлемо для иммуноблоттинга

Возможность применения описываемых моноклональных антител против B7H6 человека для иммуноблоттинга исследовали в экспериментах по иммуноблоттингу белковых экстрактов трех клеточных линий: KHYG-1 не экспрессирующей B7H6, и P825.B7H6 и HEK-293, каждая из которых экспрессирует B7H6. Поликлональные антитела против B7H6 использовали в качестве положительного контроля. Клетки собирали, промывали охлажденным 1×PBS, суспендировали в Лизирующем Буфере (10 mM Tris-HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 1% Triton X; 1X Ингибитор протеаз (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) в концентрации 20×10⁶ клеток/мл и инкубировали на льду в течение 30 мин. Полученные клеточные лизаты центрифугировали в течение 20 мин при 13200 об/мин и +4°C. Затем отбирали супернатант и измеряли суммарное содержание белка с помощью набора реактивов BCA (Pierce, USA), после чего доводили концентрацию белка до 1,5 мг/мл; 30 мкл каждого клеточного лизата смешивали с 10 мкл 4× буфера для нанесения и прогревали 10 мин при 95°C. Полученные образцы наносили на предварительно готовый к применению гель (2-20% Precise Protein Gel from Thermo scientific) и проводили электрофорез при NOV. После электрофореза образцы переносили на мембрану с использованием набора iBlot Gel Transfer Stack Nitrocellulose, Regular kit (Invitrogen, San Diego, CA). Мембрану насыщали 1X буферным раствором TBST (100 mM Tris HCl pH=7.5 + 0,9% HCl + 0,05% Tween) с 5% молока в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего инкубировали с каждым моноклональным антителом против B7H6 в концентрации 2 мкг/мл в буфере 1×TBST с 5% молока в течение ночи при +4C. Затем мембрану отмывали дважды по 10 мин в 1×TBST и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с препаратом овечьих антител против антител мыши конъюгированных с пероксидазой HRP в 1×TBST с 5% молока. После инкубации мембрану промывали 4 раза по 20 мин в TBST и обрабатывали набором реактивов для ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Из 5 протестированных моноклональных антител только антитело 10E2.9 (10 мкг/мл) являлось пригодным для применения в иммуноблоттинге в описанных условиях. Полученные результаты позволяют

предполагать, что эпитопы молекулы B7H6, с которыми связываются моноклональные антитела 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, и 17B1.3, возможно, не являются линейными, а состоят из удаленных участков линейной структуры B7H6, сближенных в пространстве за счет укладки полипептидной цепи B7H6.

Г. Три из пяти моноклональных антител мыши против B7H6 человека применимы для иммунопреципитации

Для оценки эффективности использования антител 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 и 17B1.3 для иммунопреципитации получали белковые экстракты клеток линии P815B7H6 и проводили иммунопреципитацию с использованием тестируемых моноклональных антител. Полученные иммунопреципитаты наносили на гель и, после электрофореза, анализировали присутствие B7H6 с помощью поликлональных антител против B7H6 и конъюгированных с HRP антител против антител мыши. В результате показано, что в иммунопреципитатах моноклональных антител 4E5.5, 9G9.2 и 10E2.9 содержится B7H6, а в иммунопреципитатах моноклональных антител 5E1.4 и 17B1.3 нет.

Пример 3. Модель карциномы поджелудочной железы B×PC3 для оценки эффективности подавления роста опухоли с помощью антител против B7H6 или конъюгата антитела с лекарственным средством

При определении способности моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгатов моноклональных антител против B7H6 человека с лекарственным средством к подавлению роста опухоли у мышей нескольким группам мышей делали подкожную инъекцию опухоли поджелудочной железы B×PC3 в день 0. После увеличения опухоли до 150-200 мм³ группам мышей (n=10/группу) делали инъекции в дозировках от 1 до 30 мг/Кг контрольного вещества, антитела против B7H6 или конъюгата антитела против B7H6 с лекарственным средством, от 1 до 3 раз в неделю в течение 3 недель. Размер опухоли оценивали 3 раза в неделю в течение 5 недель. Значимо меньший размер опухоли был детектирован у мышей, которым инъецировали антитело против B7H6 или конъюгат антитела против B7H6 с лекарственным средством, по сравнению с группой мышей, которым инъецировали контрольное вещество. Таким образом, эти результаты свидетельствуют об эффективности данных антагонистов для подавления роста опухоли.

Дизайн исследования: 8-10 недельным самкам мышей линии C.B-17 SCID (Charles River Laboratories) подкожно с правой стороны инъецировали 2×10^6 клеток B×PC3 в день 0. После достижения размера опухоли 150-200 мм³, группам мышей (n=10/группу) инъецировали интраперитонеально в дозировке от 1 до 30 мг/Кг контрольное вещество, антитело против B7H6, конъюгат антитела против B7H6. Инъекции проводили 1-3 раза в неделю в течение 3 недель. Размер опухоли оценивали 3 раза в неделю в течение 5 недель с помощью штангенциркуля. Размер опухоли рассчитывали по формуле: $\frac{1}{2} \cdot (B)^2 \cdot L (\text{мм}^3)$.

Пример 4. Подавление роста гепатоклеточной карциномы человека *in vivo* с помощью моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антител с лекарственным средством.

Для оценки противоопухолевой активности моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством по отношению к гепатоклеточной карциноме *in vivo*, нескольким группам мышей линии BALB/c nude были проведены инъекции клеток гепатоклеточной карциномы линий NuH7 или C3A в день 0 исследования. Разным группам мышей (n=10/группу) с опухолью, до 33 дня исследования, делали интраперитонеально или внутрь опухоли инъекции моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством через день, начиная с 5 дня исследования в дозировке 5-75 мкг. Размер опухоли определяли 3 раза в неделю в течение 6 недель. Подавление роста опухоли с помощью моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством показывает, что соответствующий белок обладает ингибирующим действием по отношению к гепатоклеточной карциноме *in vivo*.

Дизайн исследования: 8-10 недельным самкам мышей линии BALB/c nude (Charles River Laboratories) подкожно с правой стороны инъецировали 6×10^6 клеток линии NuH7 или C3A в день 0 исследования. Группам мышей (n=10/группу) интраперитонеально или внутрь опухоли инъецировали 5-75 мкг моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством, начиная с 5 и по 33 день исследования. Инъекции делались в общем объеме 200 мкл. Рост опухоли контролировали 3 раза в неделю в течение 6 недель с помощью штангенциркуля. Размер опухоли вычисляли по формуле: $\frac{1}{2} \cdot (B)^2 \cdot L (\text{мм}^3)$.

Пример 5. Подавление роста клеток карциномы простаты человека *in vivo* с помощью моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством.

Для оценки противоопухолевой активности моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством по отношению к клеткам карциномы простаты человека *in vivo*, нескольким группам мышей линии BALB/c nude инъецировали клетки карциномы простаты линий PC3 или DU-145 в день 0 исследования. Разным группам мышей (n=10/группу) с опухолью с 5 по 33 день исследования делали интраперитонеально или внутрь опухоли инъекции моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством через день в дозировке 5-75 мкг. Размер опухоли определяли 3 раза в неделю в течение 6 недель. Подавление роста опухоли (объем или вес) с помощью моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством демонстрирует, что соответствующий белок обладает ингибирующим действием по

отношению к карциноме простаты человека *in vivo*.

Дизайн исследования: 8-10 недельным самкам мышей линии BALB/c nude (Charles River Laboratories) подкожно с правой стороны или ортопически в простату инъецировали 10×10^6 клеток линии PC-3 или 6×10^6 клеток линии DU-145 в день 0 исследования. Группам мышей ($n=10$ /группу) интраперитонеально или внутрь опухоли (только для моделей с подкожным введением клеток опухоли) инъецировали 5-75 мкг моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством, начиная с 5 и по 33 день исследования. Инъекции делались в общем объеме 200 мкл. Для подкожных опухолей рост опухоли контролировали 3 раза в неделю в течение 6 недель с помощью штангенциркуля. Размер опухоли вычисляли по формуле: $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$ (мм³). Для ортопических опухолей мышей умерщвляли в конце исследования и взвешивали опухоли для оценки опухолевой нагрузки.

Пример 6. Подавление клеток карциномы толстой кишки человека *in vivo* с использованием моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством

Для оценки противоопухолевой активности моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством по отношению к клеткам карциномы толстой кишки человека *in vivo*, нескольким группам мышей линии BALB/c nude были проведены инъекции клеток карциномы толстой кишки линий DLD-1 или HCT-116 в день 0 исследования. Разным группам мышей ($n=10$ /группу) с опухолью с 5 по 33 день исследования делались интраперитонеально или внутрь опухоли инъекции моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством через день в дозировке 5-75 мкг. Размер опухоли определяли 3 раза в неделю в течение 6 недель. Подавление роста опухоли (объем или вес) с помощью моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством позволяет предполагать, что соответствующий белок обладает ингибирующим действием по отношению к карциноме толстой кишки человека *in vivo*.

Дизайн исследования: 8-10 недельным самкам мышей линии BALB/c nude (Charles River Laboratories) подкожно с правой стороны или ортопически в стенку толстой кишки инъецировали 6×10^6 клеток линии DLD-1 или HCT-116 в день 0 исследования. Группам мышей ($n=10$ /группу) интраперитонеально или внутрь опухоли (только для моделей с подкожным введением клеток опухоли) инъецировали 5-75 мкг моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством, начиная с 5 и по 33 день исследования. Инъекции делались в общем объеме 200 мкл. Для подкожных опухолей рост опухоли контролировали 3 раза в неделю в течение 6 недель с помощью штангенциркуля. Размер опухоли вычисляли по формуле: $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$ (мм³). Для ортопических опухолей мышей умерщвляли в конце исследования и взвешивали опухоли для оценки опухолевой нагрузки.

Пример 7. Подавление клеток карциномы поджелудочной железы *in vivo* с использованием моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством

Для оценки противоопухолевой активности моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством по отношению к клеткам карциномы поджелудочной железы человека *in vivo*, нескольким группам мышей линии BALB/c nude были проведены инъекции клеток карциномы поджелудочной железы линий BxPC-3 или HPAF-II в день 0 исследования. Разным группам мышей ($n=10$ /группу) с опухолью с 5 по 33 день исследования делались интраперитонеально или внутрь опухоли инъекции моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством через день в дозировке 5-75 мкг. Размер опухоли определяли 3 раза в неделю в течение 6 недель.

Подавление роста опухоли (объем или вес) с помощью моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством позволяет предполагать, что соответствующий белок обладает ингибирующим действием по отношению к карциноме поджелудочной железы человека *in vivo*.

Дизайн исследования: 8-10 недельным самкам мышей линии BALB/c nude (Charles River Laboratories) подкожно с правой стороны или ортопически в поджелудочную железу инъецировали 6×10^6 клеток линии BxPC-3 или HPAF-II в день 0 исследования. Группам мышей ($n=10$ /группу) интраперитонеально или внутрь опухоли (только для моделей с подкожным введением клеток опухоли) инъецировали 5-75 мкг моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством, начиная с 5 и по 33 день исследования. Инъекции делались в общем объеме 200 мкл. Для подкожных опухолей рост опухоли контролировали 3 раза в неделю в течение 6 недель с помощью штангенциркуля. Размер опухоли вычисляли по формуле: $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$ (мм). Для ортопических опухолей мышей умерщвляли в конце исследования и взвешивали опухоли для оценки опухолевой нагрузки.

Пример 8. Подавление В-клеточной лимфомы *in vivo* с помощью моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством.

Клеточная линия В-клеточной лимфомы человека поддерживается *in vitro* с помощью пассажей в ростовой среде. Для удаления компонентов среды клетки тщательно отмывают в PBS.

Мышам линии SCID инъецировали (обычно) 1×10^6 клеток лимфомы человека в хвостовую вену в объеме 100 мкл. Оптимальное число клеток для введения определяется эмпирически в пилотном исследовании.

довании, определяющем количество клеток для введения необходимое для получения кинетики развития опухоли близкой к желаемой. Лечение моноклональным антителом или конъюгатом моноклонального антитела с лекарственным средством начинают на следующий день после введения клеток опухоли либо с помощью подкожной имплантации осмотической мини-помпы ALZET® (ALZET, Cupertino, CA) либо ежедневной интраперитонеальной инъекции моноклональных антител против B7H6 или конъюгата антитела с лекарственным средством или носителя. Наблюдают выживаемость и значительное развитие заболевания у мышей в эксперименте. Особей, вес которых снизился более чем на 20% после начала эксперимента, забивают, также как и тех особей, у которых происходит значительный прогресс заболевания, например паралич задних конечностей. В зависимости от используемой линии клеток лимфомы, без терапевтического вмешательства мыши умирают в течение 3-6 недель. При В-клеточных лимфомах, секретирующих иммуноглобулины классов М или G, прогресс заболевания может быть отслежен с помощью анализа сывороточного уровня иммуноглобулинов человека с помощью ИФА на еженедельно отбираемых образцах крови.

Эффект дозы моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством/модель IM9

Мышам проводится инъекция 1×10^6 клеток линии IM9, после чего на следующий день имплантируются 28-дневные осмотические мини-помпы. Помпы загружаются для доставки следующих вариантов концентраций моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством: 0, 0,12, 1,2, и 12 мкг/день. На каждую дозу берется группа из 8 мышей. Повышение устойчивости к развитию опухолевых клеток по мере увеличения дозы антитела или конъюгата антитела с лекарственным средством демонстрирует, что данные эффекты моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством являются дозозависимыми. У мышей, которые выжили в течение эксперимента, не обнаруживаются признаки развития заболевания и не детектируются человеческие иммуноглобулины класса G сыворотке.

Полученные данные показывают, что эффективность моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством на моделях лимфом мышей линии SCID коррелируют со способностью подавлять рост клеток лимфомных линий *in vivo*.

Пример 9. Подавление В-клеточных опухолей *in vivo* с помощью моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством

Постоянное введение моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством с помощью осмотической минипомпы позволяет создать постоянную сывороточную концентрацию пропорциональную концентрации моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством в мини-помпе. 0,22 мл раствора моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством в фосфатном буферном растворе (pH 6.0) с концентрацией 2 или 0,2 мг/мл загружается в стерильных условиях в осмотическую мини-помпу Azlet (модель 2004; Alza corporation Palo Alto, CA). Помпа имплантируется подкожно в мышь через разрез на спине длиной 1 см, после чего кожа сшивается стерильным шовным материалом. Такие помпы разработаны таким образом, что высвобождение содержимого происходит со скоростью 0,25 мкл в час в течение 28 дней. Данный метод введения приводит к значительному росту выживаемости мышей после инъекции опухоли (ниже).

Эффект моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством по отношению к опухолям В-клеточного происхождения *in vivo*

Данные эффекты моноклональных антител против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством тестируются *in vivo* с использованием мышинной модели ксенотрансплантата, описанной в данной заявке. Тестируемая модель ксенотрансплантата представляет собой клеточную линию лимфобластомы человека IM-9. Мышей линии C.B17 SCID (самки C.B17/IcrHsd-scld; Harlan, Indianapolis, Indiana) разделяют на 4 группы. В день 0 исследования проводится инъекция в хвостовую вену предварительно собранных из культуры клеток линии IM-9 всем мышам (около 1 000 000 клеток на мышь). В день 1 исследования мышам подкожно имплантируют осмотические мини-помпы, содержащие либо тестируемое вещество, либо контрольное вещество. Мыши групп 1-3 (n=9 особей в группе) получают моноклональное антитело против B7H6 человека или конъюгат антитела с лекарственным средством: дозировка группы 1 составляет 12 мкг/день в концентрации 2 мг/мл раствора моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством; дозировка группы 2 составляет 1,2 мкг/день в концентрации 0,20 мг/мл раствора моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством; дозировка группы 3 составляет 0,12 мкг/день в концентрации 0,02 мг/мл раствора моноклонального антитела против B7H6 человека или конъюгата антитела с лекарственным средством. Группа 4 (n=9) является контрольной и получает буферный раствор (PBS pH6,0).

Повышенная выживаемость в группах мышей (например, получавших 12 мкг/день или 1,2 мкг/день антитела) по сравнению с группой, получавшей буферный раствор, показывает, что моноклональные антитела против B7H6 человека или конъюгат антитела с лекарственным средством ограничивает патологию.

ческий эффект В-клеточных опухолей in vivo.

Основываясь на вышеизложенном, следует принять во внимание, что специфические варианты исполнения данного изобретения описаны в иллюстративных целях и различные модификации исполнений могут быть сделаны без отклонения от духа и области настоящего изобретения. Соответственно настоящее изобретение является неограниченным, кроме как прилагаемыми пунктами формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в данной заявке включаются в настоящее изобретение во всей полноте посредством ссылки для любых целей.

Перечень последовательностей

| | | |
|-------|---|-----|
| <110> | Вивье, Эрик Баратен, Мириам Пьерр, Мишель | |
| <120> | МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ В7Н6, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ | |
| <130> | ZMOG-0169 | |
| <160> | 3 | |
| <170> | PatentIn version 3.5 | |
| <210> | 1 | |
| <211> | 1365 | |
| <212> | ДНК | |
| <213> | Homo Sapiens | |
| <400> | 1 | |
| | atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc gcggcgctcc tgattctgct gtgggcgctg | 60 |
| | acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacaccctg | 120 |
| | aatgacaatg tcaccatatt ctgcaatatt tttattccc aaccctcaa catcacgtct | 180 |
| | atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtctttgaa | 240 |
| | ttttttggag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg | 300 |
| | aagagtgggg acgcctcact gcggctgcct ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac | 360 |
| | cgatgtgagg tgggtgtcac ccctctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg | 420 |
| | gcttccccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaagagaa tgaagacaaa | 480 |
| | tatatgtgtg agtcaagtgg gttctacca gaggtatta atataacatg ggagaagcag | 540 |
| | accagaagt ttccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc | 600 |
| | aagaatatgg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa | 660 |
| | gacctggga ctgtctacca gtgtgtggtg cggcatgcgt ccttgcatc ccccttgagg | 720 |
| | agcaacttta ccctgactgc tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa gacagataat | 780 |

```

ttttccattc attggtggcc tatttcattc attggtgttg gactggtttt attaattgtt      840
ttgattcctt ggaaaaagat atgtaacaaa tcattctcag cctatactcc tctcaagtgc      900
attctgaaac actggaactc ctttgacact cagactctga agaaagagca cctcatattc      960
ttttgcactc gggcatggcc gtcttaccag ctgcaggatg gggaggcttg gcctcctgag     1020
ggaagtgtta atattaatac tattcaacaa ctagatgttt tctgcagaca ggagggcaaa     1080
tgggtccgagg ttctttatgt gcaagccttc ttgacctgc gagacaaccc agatctttgt     1140
cagtgttgta gaattgaccc tgctctccta acagttacat caggcaagtc catagatgat     1200
aattccacaa agtctgagaa acaaaccctt agggaacact cggatgcagt tccggatgcc     1260
ccaatccttc ctgtctcccc tatctgggaa cctcctccag ccacaacatc aacaactcca     1320
gttctatcct cccaaccccc aactttactg ttacccttac agtaa                       1365

```

```

<210> 2
<211> 454
<212> БЕЛОК
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 2

```

```

Met Thr Trp Arg Ala Ala Ala Ser Thr Cys Ala Ala Leu Leu Ile Leu
1           5           10           15

```

```

Leu Trp Ala Leu Thr Thr Glu Gly Asp Leu Lys Val Glu Met Met Ala
          20           25           30

```

```

Gly Gly Thr Gln Ile Thr Pro Leu Asn Asp Asn Val Thr Ile Phe Cys
          35           40           45

```

```

Asn Ile Phe Tyr Ser Gln Pro Leu Asn Ile Thr Ser Met Gly Ile Thr
          50           55           60

```

```

Trp Phe Trp Lys Ser Leu Thr Phe Asp Lys Glu Val Lys Val Phe Glu
65           70           75           80

```

Phe Phe Gly Asp His Gln Glu Ala Phe Arg Pro Gly Ala Ile Val Ser
85 90 95

Pro Trp Arg Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ser Leu Arg Leu Pro Gly Ile
100 105 110

Gln Leu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Cys Glu Val Val Val Thr Pro
115 120 125

Leu Lys Ala Gln Gly Thr Val Gln Leu Glu Val Val Ala Ser Pro Ala
130 135 140

Ser Arg Leu Leu Leu Asp Gln Val Gly Met Lys Glu Asn Glu Asp Lys
145 150 155 160

Tyr Met Cys Glu Ser Ser Gly Phe Tyr Pro Glu Ala Ile Asn Ile Thr
165 170 175

Trp Glu Lys Gln Thr Gln Lys Phe Pro His Pro Ile Glu Ile Ser Glu
180 185 190

Asp Val Ile Thr Gly Pro Thr Ile Lys Asn Met Asp Gly Thr Phe Asn
195 200 205

Val Thr Ser Cys Leu Lys Leu Asn Ser Ser Gln Glu Asp Pro Gly Thr
210 215 220

Val Tyr Gln Cys Val Val Arg His Ala Ser Leu His Thr Pro Leu Arg
225 230 235 240

Ser Asn Phe Thr Leu Thr Ala Ala Arg His Ser Leu Ser Glu Thr Glu
245 250 255

Lys Thr Asp Asn Phe Ser Ile His Trp Trp Pro Ile Ser Phe Ile Gly
 260 265 270

Val Gly Leu Val Leu Leu Ile Val Leu Ile Pro Trp Lys Lys Ile Cys
 275 280 285

Asn Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Thr Pro Leu Lys Cys Ile Leu Lys His
 290 295 300

Trp Asn Ser Phe Asp Thr Gln Thr Leu Lys Lys Glu His Leu Ile Phe
 305 310 315 320

Phe Cys Thr Arg Ala Trp Pro Ser Tyr Gln Leu Gln Asp Gly Glu Ala
 325 330 335

Trp Pro Pro Glu Gly Ser Val Asn Ile Asn Thr Ile Gln Gln Leu Asp
 340 345 350

Val Phe Cys Arg Gln Glu Gly Lys Trp Ser Glu Val Pro Tyr Val Gln
 355 360 365

Ala Phe Phe Ala Leu Arg Asp Asn Pro Asp Leu Cys Gln Cys Cys Arg
 370 375 380

Ile Asp Pro Ala Leu Leu Thr Val Thr Ser Gly Lys Ser Ile Asp Asp
 385 390 395 400

Asn Ser Thr Lys Ser Glu Lys Gln Thr Pro Arg Glu His Ser Asp Ala
 405 410 415

Val Pro Asp Ala Pro Ile Leu Pro Val Ser Pro Ile Trp Glu Pro Pro
 420 425 430

Pro Ala Thr Thr Ser Thr Thr Pro Val Leu Ser Ser Gln Pro Pro Thr
 435 440 445

Leu Leu Leu Pro Leu Gln
450

<210> 3
<211> 500
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 3

Met Thr Trp Arg Ala Ala Ala Ser Thr Cys Ala Ala Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Leu Trp Ala Leu Thr Thr Glu Gly Asp Leu Lys Val Glu Met Met Ala
20 25 30

Gly Gly Thr Gln Ile Thr Pro Leu Asn Asp Asn Val Thr Ile Phe Cys
35 40 45

Asn Ile Phe Tyr Ser Gln Pro Leu Asn Ile Thr Ser Met Gly Ile Thr
50 55 60

Trp Phe Trp Lys Ser Leu Thr Phe Asp Lys Glu Val Lys Val Phe Glu
65 70 75 80

Phe Phe Gly Asp His Gln Glu Ala Phe Arg Pro Gly Ala Ile Val Ser
85 90 95

Pro Trp Arg Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ser Leu Arg Leu Pro Gly Ile
100 105 110

Gln Leu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Cys Glu Val Val Val Thr Pro
115 120 125

Leu Lys Ala Gln Gly Thr Val Gln Leu Glu Val Val Ala Ser Pro Ala
 130 135 140

Ser Arg Leu Leu Leu Asp Gln Val Gly Met Lys Glu Asn Glu Asp Lys
 145 150 155 160

Tyr Met Cys Glu Ser Ser Gly Phe Tyr Pro Glu Ala Ile Asn Ile Thr
 165 170 175

Trp Glu Lys Gln Thr Gln Lys Phe Pro His Pro Ile Glu Ile Ser Glu
 180 185 190

Asp Val Ile Thr Gly Pro Thr Ile Lys Asn Met Asp Gly Thr Phe Asn
 195 200 205

Val Thr Ser Cys Leu Lys Leu Asn Ser Ser Gln Glu Asp Pro Gly Thr
 210 215 220

Val Tyr Gln Cys Val Val Arg His Ala Ser Leu His Thr Pro Leu Arg
 225 230 235 240

Ser Asn Phe Thr Leu Thr Ala Ala Arg His Ser Leu Ser Glu Thr Glu
 245 250 255

Lys Thr Asp Asn Phe Ser Ile His Trp Trp Pro Glu Pro Arg Ser Pro
 260 265 270

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
 290 295 300

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
305 310 315 320

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
325 330 335

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
340 345 350

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
355 360 365

Gly Lys Ala Phe Ala Cys Ala Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
370 375 380

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
385 390 395 400

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
405 410 415

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
420 425 430

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
450 455 460

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
465 470 475 480

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
485 490 495
Thr Pro Gly Lys
500

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, связывающиеся с внеклеточным доменом B7H6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2), включающие определяющие комплементарности участки (CDR) тяжелой и легкой цепей или последовательности тяжелой и легкой цепей антитела, продуцируемого:

а) гибридным клоном с маркировочным номером 4E5.5 (деPOSITный № CNCM I-4242) или

b) гибридным клоном с маркировочным номером 17B1.3 (депозитный № CNCM I-4245); где данное моноклональное антитело ингибирует взаимодействие В7Н6 человека с NKp30 человека, подавляя клеточное узнавание целевых клеток, экспрессирующих В7Н6.

2. Антитело по п.1, которое является мышинным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом или антителом человека, или его антигенсвязывающая часть.

3. Антитело по п.1, представляющее собой мышинное антитело, продуцируемое:

a) гибридным клоном с маркировочным номером 4E5.5 (депозитный № CNCM-4242) или антигенсвязывающая часть указанного антитела; или

b) гибридным клоном с маркировочным номером 17B1.3 (депозитный № CNCM-4245) или антигенсвязывающая часть указанного антитела.

4. Антитело по п.2, которое является гуманизированным антителом, или его антигенсвязывающая часть.

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое является одноцепочечным антителом, или его антигенсвязывающая часть.

6. Антитело по любому из пп.1-5, которое содержит Fc-домен, обладающий активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или активностью комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.6, в котором Fc-домен является одноцепочечным (scFc).

8. Диагностический набор для диагностики В7Н6-экспрессирующей опухоли, включающий антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-7 и реактивы для детекции связывания указанного антитела или его антигенсвязывающей части с внеклеточным доменом В7Н6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO: 2).

9. Конъюгат антитела по любому из пп.1-7 и цитотоксического агента.

10. Конъюгат по п.9, в котором цитотоксический агент выбран из антитубулинового агента, агента, связывающегося с малой бороздкой ДНК, вещества, алкилирующего малую бороздку ДНК, дуокармина и пурамицина.

11. Конъюгат по п.10, в котором антитубулиновый агент выбран из доластатина, винка-алкалоида, подофиллоатосина, таксана, производного баккатина, криптофизина, майтанзиноида и комбрестатина.

12. Конъюгат по п.9, в котором антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом посредством линкера.

13. Конъюгат по п.12, в котором линкер является расщепляемым под действием внутриклеточных условий.

14. Конъюгат по п.13, в котором расщепляемый линкер представляет собой пептидный линкер, расщепляемый под действием внутриклеточной протеазы.

15. Композиция для лечения отторжения аллотрансплантата клеток костного мозга (ВМС) у пациента, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Композиция для лечения В7Н6-экспрессирующей опухоли у пациента, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.6 и 7 или конъюгат по любому из пп.9-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ *in vitro* снижения активности натуральных киллеров (НК-клеток) человека по отношению к экспрессирующим В7Н6 клеткам человека, включающий контакт клеток, экспрессирующих В7Н6 человека, в присутствии человеческих НК-клеток с эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7.

18. Способ *in vitro* уничтожения или подавления роста В7Н6-экспрессирующих клеток внутри клеточной популяции, содержащей такие В7Н6-экспрессирующие клетки, включающий контакт упомянутых В7Н6-экспрессирующих клеток с эффективным количеством конъюгата антитела с лекарственным средством по любому из пп.9-14.

19. Применение конъюгата антитела с лекарственным средством по любому из пп.9-14 при лечении В7Н6-экспрессирующей опухоли у пациента.

20. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7 при лечении В7Н6-экспрессирующей опухоли у пациента.

21. Применение по п.19 или 20, в котором В7Н6-экспрессирующей опухолью является рак толстой кишки, печени, шейки матки, легкого, поджелудочной железы или простаты, или в котором В7Н6-экспрессирующая опухоль представляет собой прогемобластную лейкемию, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, моноцитарную лимфому, эритролейкемию, лимфому Беркитта, хронический миелолейкоз или острую лимфобластную лейкемию.

22. Способ *in vitro* детекции экспрессии В7Н6 клеткой, включающий:

(1) обработку биологического образца, содержащего анализируемые клетки человека, антителом или его антигенсвязывающей частью по любому из пп.1-7; и

(2) детекцию связывания данного антитела или его антигенсвязывающей части, в котором связыва-

ние указанного антитела или его антигенсвязывающей части с внеклеточным доменом B7H6 человека (аминокислотные остатки 25-266 последовательности SEQ ID NO:2) показывает присутствие B7H6 на исследуемых клетках, для определения таким способом экспрессии клеткой B7H6.

23. Способ *in vitro* по п.22, в котором исследуемый биологический образец содержит intactные клетки человека или мембранную фракцию тестируемых клеток.

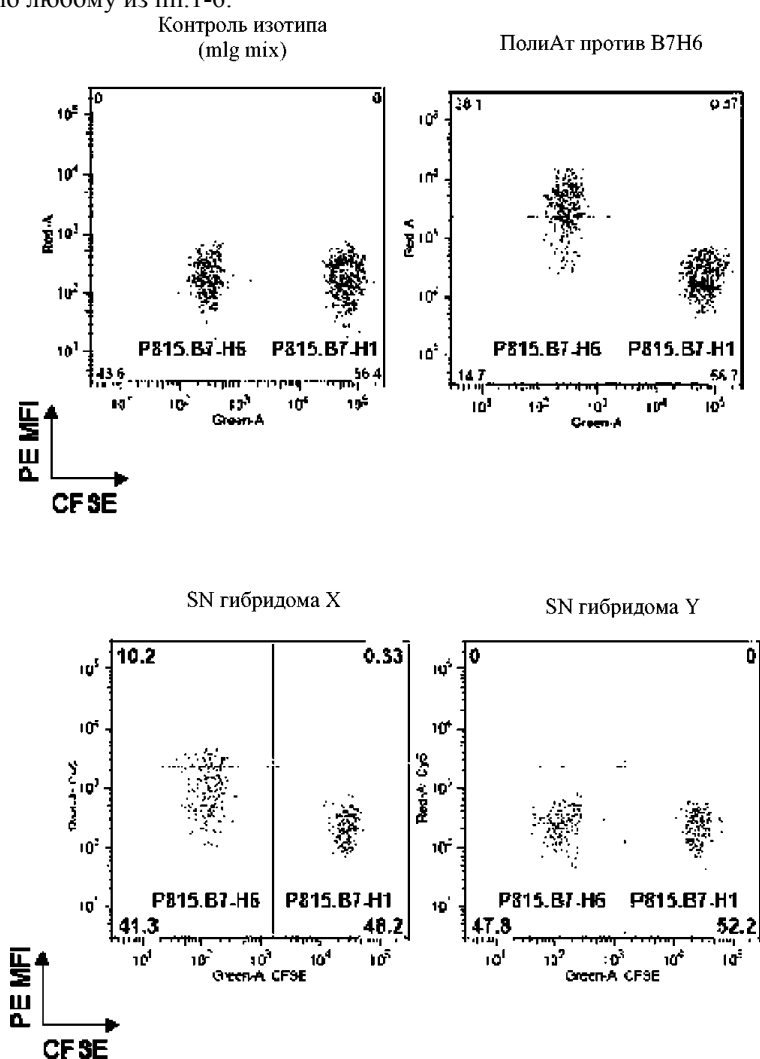
24. Способ *in vitro* по п.22 или 23, в котором используемое антитело или его антигенсвязывающая часть помечены детектируемой меткой, выбранной из радиоизотопа, флуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, ферментативной метки или биолюминесцентной метки.

25. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7 при диагностике B7H6-экспрессирующей опухоли у пациента, при этом используемое антитело или его антигенсвязывающая часть конъюгированы с детектируемой меткой.

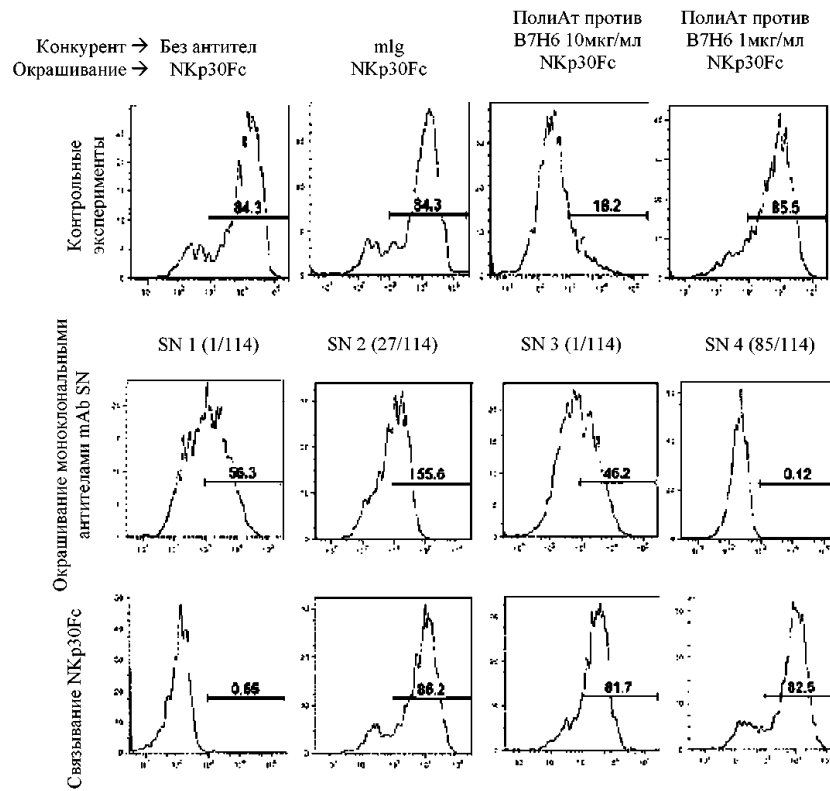
26. Применение по п.25, в котором опухолью является рак толстой кишки, печени, шейки матки, легкого, поджелудочной железы или простаты.

27. Гибридомный клон с маркировочным номером 4E5.5 (деPOSITный № CNCM I-4242), продуцирующий антитело по любому из пп.1-6.

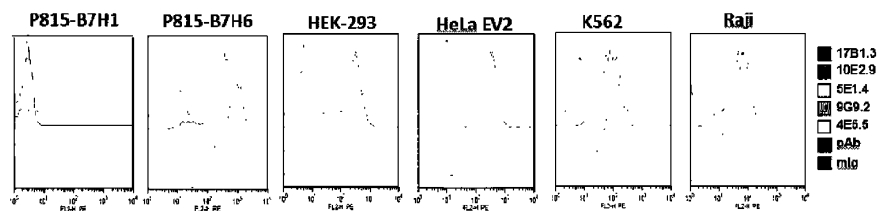
28. Гибридомный клон с маркировочным номером 17B1.3 (деPOSITный № CNCM I-4245), продуцирующий антитело по любому из пп.1-6.



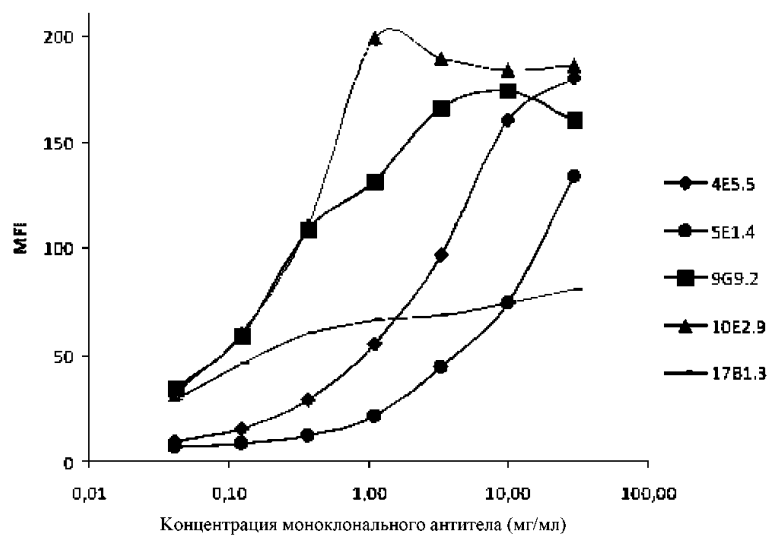
Фиг. 1 - первичный скрининг гибридомных клонов против B7H6



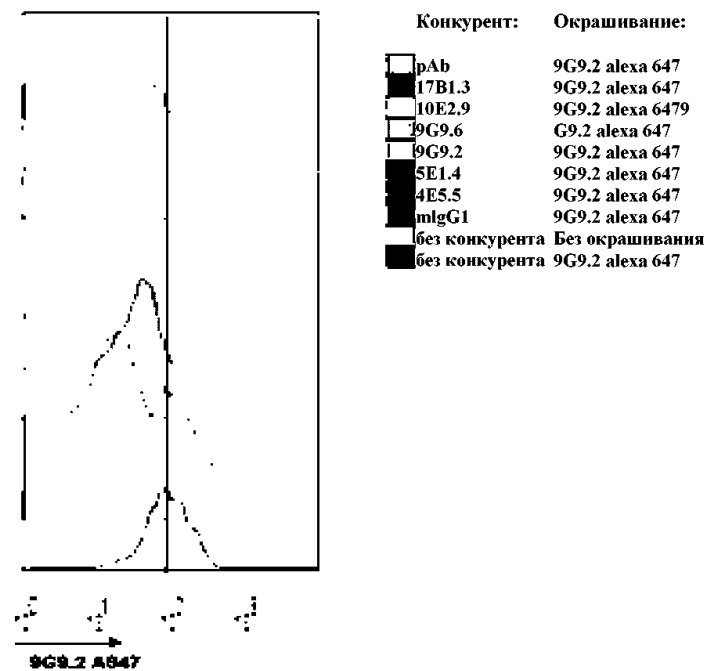
Фиг. 2 - второй скрининг поликлональных линий гибридом



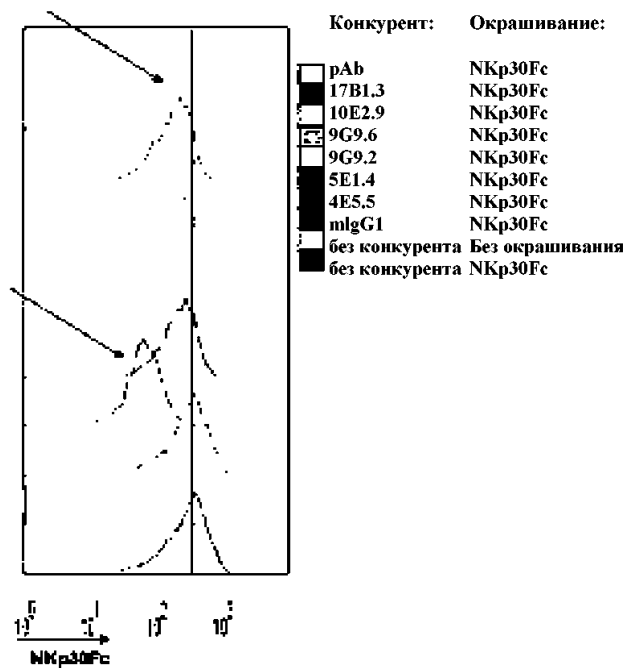
Фиг. 3 - окрашивание клеток различных опухолевых линий разными антителами против B7H6



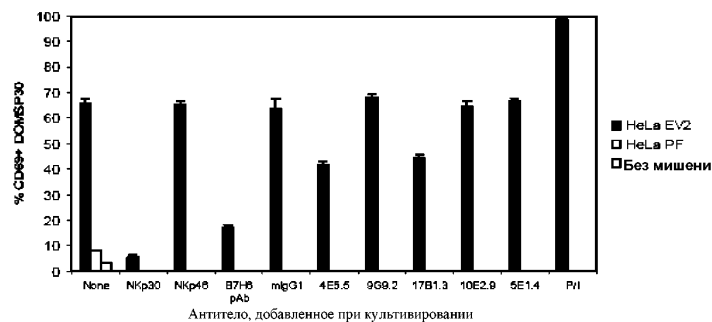
Фиг. 4 - титрование моноклональных антител против B7H6 на клетках линии HEK293



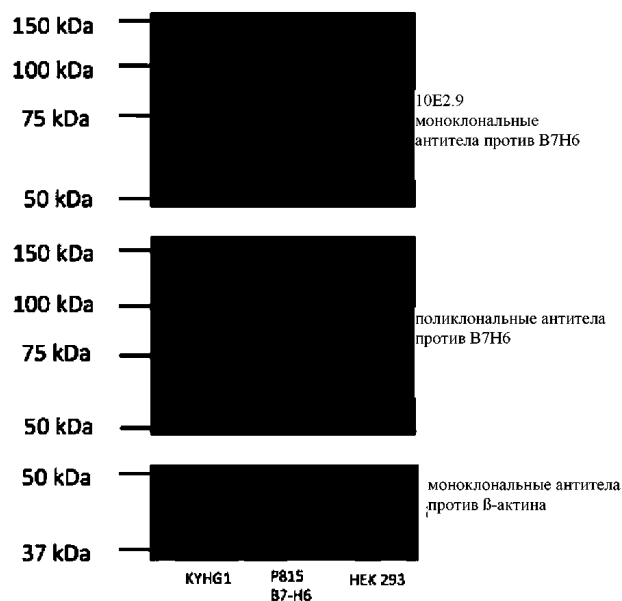
Фиг. 5 - конкурентный анализ связывания очищенных моноклональных антител против B7H6 в конкуренции с конъюгатом моноклонального антитела 9G9.2 с красителем Alexa 647



Фиг. 6 - конкурентный анализ связывания очищенных моноклональных антител против B7H6 в конкуренции с NKp30Fc



Фиг 7 - ингибирование активации DOMSP30 моноклональными антителами против NKp30 или B7H6



Фиг. 8 - результаты иммуноблоттинга образцов B7H6



Фиг. 9 - иммунопреципитаты B7H6, полученные с помощью антител гибридомных клонов 4E5.5, 9G9.2 и 10E2.9 из белковых экстрактов клеток линии P815.B7H6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2