



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013105769/10, 13.07.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.07.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.07.2010 GB 1011771.1

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2014 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 10.08.2016 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: VEITONMAKI N.E. et al., B599 Apoptosis-inducing ICAM-1 antibody BI-505 is a potent inhibitor of multiple myeloma, Clinical Lymphoma and Myeloma, февраль 2009, т.9, стр.S157. LACY MARTHA Q. et al., Phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the anti-insulinlike growth factor type 1 Receptor monoclonal antibody CP-751,871 in patients with (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 13.02.2013

(86) Заявка РСТ:
EP 2011/061983 (13.07.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/007516 (19.01.2012)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

ХАНССОН Маркус (SE),
ФРЕНДЕУС Бйорн (SE)

(73) Патентообладатель(и):

БИОИНВЕНТ ИНТЕРНЭШНЛ АБ (SE)

(54) БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Представлено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со специфичностью связывания с ICAM-1 для лечения рака у пациентов, которых ранее лечили по поводу рака, но они или не ответили на

указанное лечение или раньше отвечали на указанное лечение, а впоследствии перенесли рецидив. Изобретение может быть использовано для эффективного лечения рецидивирующих форм рака, в частности множественной миеломы. 3 н. и 42 з.п. ф-лы, 23 ил., 2 табл., 11 пр.

(56) (продолжение):

multiple myeloma, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2008, vol.26, no.19, pp.3196-3203. RICHARDSON P. et al, Thalidomide for patients with relapsed multiple myeloma after high-dose chemotherapy and stem cell transplantation: results of an open-label multicenter phase 2 study of efficacy, toxicity, and biological activity, Mayo Clinic Proceedings, 2004, vol.79, Issue 7, pp.875-882. WO 2007068485 A2, 21.06.2007. RU 2090615 C1, 20.09.1997.

R U 2 5 9 3 7 0 9 C 2

R U 2 5 9 3 7 0 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 593 709** (13) **C2**
(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013105769/10, 13.07.2011**

(24) Effective date for property rights:
13.07.2011

Priority:

(30) Convention priority:
13.07.2010 GB 1011771.1

(43) Application published: **20.08.2014** Bull. № 23

(45) Date of publication: **10.08.2016** Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: **13.02.2013**

(86) PCT application:
EP 2011/061983 (13.07.2011)

(87) PCT publication:
WO 2012/007516 (19.01.2012)

Mail address:

109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Sojuzpatent"

(72) Inventor(s):

**KHANSSON Markus (SE),
FRENDÉUS Björn (SE)**

(73) Proprietor(s):

BIOINVENT INTERNESHNL AB (SE)

(54) **BIOLOGICAL MATERIALS AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry.
Disclosed is use of antibodies or antigen-binding fragments thereof with binding specificity for ICAM-1, for use in treatment of cancer in patients who have previously been treated for cancer and either not

responded to said treatment or have previously responded to said treatment and subsequently relapsed.

EFFECT: invention can be used for efficient management of recurrent forms of cancer, particularly multiple myeloma.

45 cl, 23 dwg, 2 tbl, 11 ex

Настоящее изобретение имеет отношение к ICAM-1-антителам и их применению при лечении рака, такого как множественная миелома.

Известный уровень техники

Множественная миелома (также называемая ММ или миелома, миеломная болезнь) является результатом злокачественного развития В клеток и составляет от 10% до 20% всех гематологических злокачественных новообразований. В настоящее время она является неизлечимым заболеванием со средним возрастом при постанове диагноза 65-70 лет, в возрасте меньше 40 лет это заболевание обнаруживается в редких случаях. Множественная миелома является вторым по распространенности гематологическим злокачественным заболеванием в Соединенных Штатах Америки, при этом число случаев во всем мире составляет 4 на 100000 человек. В Соединенных Штатах в 2008 году ожидается 19920 новых случаев множественной миеломы и более чем 10000 случаев со смертельным исходом в результате миеломной болезни (American Cancer Society, 2008). Болезнь немного преобладает среди мужчин и чаще обнаруживается у афроамериканцев, а в меньшей степени - в азиатских популяциях (Kyle & Rajkumar, Blood. 2008 Mar 15; 111(6):2962-72. Review).

Диагноз миеломы несет мрачный прогноз со средней выживаемостью от 3 до 4 лет при применении доступных в настоящее время способов лечения, а у пациентов с тяжелыми формами болезни средняя выживаемость составляет только около 2 лет даже при оптимальном лечении (Kyle & Rajkumar, Blood. 2008 Mar 15; 111(6):2962-72. Review).

Типичной клинической картиной миеломы является пациент с сильной болью вследствие патологических переломов костей, в частности грудной клетки или позвоночника (Kyle & Rajkumar, 2004, N Engl J Med. 2004 Oct 28; 351(18):1860-73. Review). Другими общими признаками являются почечная недостаточность, гиперкальциемия, недостаточность костного мозга в сочетании с анемией и тромбоцитопенией, а также повышенный риск инфекции и тромбозомболических осложнений, таких как тромбоз вен и легочная эмболия. Органная недостаточность иногда вызывается патологическим отложением фибриллярных агрегатов (скоплений) легких цепей иммуноглобулинов, которое называется AL-амилоидоз. В тех случаях, когда происходит AL-амилоидоз, он обычно затрагивает сердце и почки, приводя к тяжелым сердечным аритмиям и/или нарушениям, почечным нарушениям и недостаточности, соответственно.

С множественной миеломой связана огромная нереализованная потребность современной медицины: доступные в настоящее время лекарственные средства для лечения множественной миеломы не являются излечивающими и вызывают значительную токсичность и развитие лекарственной резистентности. Плазматические клетки при множественной миеломе не экспрессируют CD20 или демонстрируют низкую и гетерогенную экспрессию CD20, при этом маловероятно, что CD20-таргетная терапия будет эффективной при этой болезни (Caro et al. Haematol, 2008, 141:135-248).

Разработан ряд подходов для лечения пациентов с множественной миеломой, включая применение мелфалана (и других алкилирующих препаратов, таких как циклофосфамид); других химиотерапевтических препаратов (таких как адриамицин, винкристин и цисплатин); высоких дозировок стероидных гормонов; интерферона; бисфосфонатов (таких как памидронат или золедронат). В дополнение к этому используется трансплантация аутологических и аллогенных стволовых клеток.

Несмотря на последние достижения в создании новых терапевтических средств для лечения или предотвращения множественной миеломы, реальный полезный результат этих лекарственных средств в отношении выживаемости и качества жизни пациента все еще является ограниченным (Kumar et al, Blood, 2008, 111(5):2516-20). Более того,

имеющиеся способы лечения связаны с тяжелыми побочными эффектами у значительной части пациентов. Например, химиотерапия приводит к повышенной чувствительности к инфекции, тошноте, потере волос и повреждению органов; лечение стероидами может приводить к увеличению веса, диабету, повышенной чувствительности к инфекции; 5 остеопорозу и психическим расстройствам; лечение интерфероном может приводить к утомляемости, лихорадке, мышечной боли и депрессии; а лечение бисфосфонатом редко, но иногда приводит к повреждению почек и некрозу костей. Способы лечения, использующие трансплантацию стволовых клеток, сопровождаются значительной долей рецидивов, заболеваемостью и смертностью, связанной с трансплантатом. Новые 10 лекарственные средства для лечения миеломы, включая талидомид, бортезомиб и леналидомид, также оказывают побочное действие, что ограничивает их применение у многих пациентов.

В последние годы был достигнут существенный прогресс в понимании патогенеза и молекулярных механизмов множественной миеломы. Генетические исследования 15 выявили наличие значительного числа различных хромосомных изменений, часто имеющих прогностическое значение, связанных с этой болезнью. Коротко, эти хромосомные транслокации во многих случаях затрагивают Н локус (14q32.3) иммуноглобулина (Ig), при этом рядом располагаются различные трансформирующие гены и сегменты, которые активизируются Ig-энхансером, вызывая разрегулированную 20 экспрессию и возможно злокачественную трансформацию (Hideshima et al. *Nat Rev Cancer*. 2007. 7(8): 585-598). Терапевтический эффект ингибирования протеасом с помощью бортезомиба при миеломе был сначала продемонстрирован на клетках миеломы *in vitro*, и вероятно является результатом прямой цитотоксичности и уменьшения экспрессии молекул адгезии и различных факторов роста, выживаемости 25 и ангиогенных факторов (Kyle & Rajkumar *N Engl J Med*. 2004 Oct 28;351(18):1860-73. Review). Фактор транскрипции NKκB обладает повышенной активностью при миеломе вследствие протеасомной деградации его нормального регуляторного белка IκB, а бортезомиб восстанавливает гомеостаз NFκB путем ингибирования протеасомной активности.

30 Микросреда костного мозга, состоящая из остеокластов, эндотелиальных клеток, стволовых клеток костного мозга, а также белки внеклеточного матрикса играют решающую роль в патогенезе множественной миеломы (Hideshima et al., *Nat Rev Cancer*. 2007. 7(8): 585-598), и обеспечивают факторы, опосредующие рост, выживаемость и лекарственную резистентность злокачественных плазмочитов. Различные молекулы 35 адгезии, экспрессированные клетками миеломы, являются важными для этого взаимодействия, например ICAM-1.

Молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) является высоко экспрессированной и участвует в патогенезе многих типов злокачественных новообразований человека, включая миелому (Huang, et al. *Hybridoma*. 1993. 12(6): 661-675; Huang et al. *Cancer Res*. 40 1995. 55(3): 610-616; Smallshaw et al. *Immunother* 1997. 2004. 27(6): 419-424; Schmidmaier, *Int J Biol Markers*. 2006. 21(4): 218-222), меланому (Wang et al. *Int J Cancer*. 2006. 118(4): 932-941; Johnson et al., *Immunobiology*. 1988. 178(3): 275-284), рак легкого (Grothey et al. *Br J Cancer*. 1998. 77(5): 801-807), рак желудка (Maruo et al. *Int J Cancer*. 2002. 100(4): 486-490), рак мочевого пузыря (Roche et al. *Thromb Haemost*. 2003. 89(6): 1089-1097), рак 45 молочной железы (Rosette C, et al. *Carcinogenesis*. 2005. 26(5): 943-950), рак предстательной железы (Aalinkel R et al. *Cancer Res* 2004. 64(15): 5311-21) и лимфому (Horst et al. *Leukemia*. 1991. 5(10): 848-853). Повышенная экспрессия ICAM-1 связана с развитием резистентности, индуцированной лекарственными препаратами (Schmidmaier et al. *Int*

J Biol Markers. 2006. 21(4): 218-222), агрессивностью опухолевых клеток (Miele et al., Exp Cell Res 214 (1), 231 1994) и плохим прогнозом Dowlati et al., Clin Cancer Res 14 (5), 1407 (2008).

Стандартное лечение миеломы у более молодых пациентов (т.е. в возрасте меньше 65 лет) заключается в улучшении состояния с помощью комбинации винкристин-адриамицин- дексаметазона с последующим лечением высокими дозами мелфалана при применении поддержки в виде аутологичных стволовых клеток. В течение предыдущего десятилетия было показано, что этот режим, несмотря на достижение полной ремиссии в костном мозге, увеличивал медиану выживаемости приблизительно на 1 год, но только у небольшой части пациентов (Harousseau JL. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005;2008:306-12). В связи с рисками, связанными с лечением высокими дозами, пациентов старческого возраста лечили низкими дозами мелфалана в сочетании с преднизолоном.

В последние годы для лечения рецидивирующей миеломы были приняты другие методы лечения. Эти новые лекарственные средства включают ингибитор протеасом бортезомиб (Велкейд®) и "иммуномодулирующие" лекарственные средства, талидомид и леналидомид, (Ревлимид®) и представляют собой значительный прогресс в методах лечения. Суммарная эффективность терапии для пациентов с рецидивирующей миеломой при применении этих лекарственных средств составляет обычно около 30%, но, как правило, является более высокой, когда лекарственное средство комбинируют с периодическим применением дексаметазона. По результатам этих исследований новые лекарственные средства в комбинации с дексаметазоном и/или химиотерапией в настоящее время проходят клинические испытания в качестве первой линии лечения миеломы (<http://clinicaltrials.gov/ct2/search>) с обнадеживающими предварительными результатами (American Society of Hematology, December 6-9, 2008).

Хотя бортезомиб, леналидомид и талидомид показали преимущество в выживаемости по сравнению с традиционным лечением у пациентов с рецидивом миеломы (Rajkumar Blood. 2005. 106(13): 4050-4053; Richardson et al. Blood. 2006. 108(10): 3458-3464; Richardson et al. N Engl J Med. 2005. 352(24): 2487-2498; Singhal et al. N Engl J Med. 1999. 341(21): 1565-1571), цель - увеличить длительное выживание или вылечить - до сих пор не достигнута. Кроме того, новые лекарственные средства имеют серьезные побочные эффекты, например, повышенный риск тромбоэмболии, нейропатии, подавления иммунитета и костного мозга, что ограничивает их применение у значительного количества пациентов.

Несмотря на последние достижения в разработке новых способов лечения, реальная польза этих лекарственных препаратов в отношении выживаемости и качества жизни пациентов является небольшой, при этом многие пациенты или не реагируют на лечение или у них развивается лекарственная резистентность и впоследствии рецидив, что требует разработки новых, более эффективных и дополнительных терапевтических средств для борьбы с множественной миеломой. В соответствии с этим, требуются новые потенциальные мишени и лекарственные средства для лечения миеломы, в частности, для применения у пациентов, не отвечающих на современные лекарственные средства, или сначала отвечавших на лечение, а потом заболевших вторично.

Развитие таргетной иммунотерапии и лекарственных средств на основе антител в течение двух последних десятилетий значительно улучшило «вооружение» врачей для борьбы с раком и гематологическими злокачественными заболеваниями (1). CD20-специфическое химерное (мышь-человек) моноклональное антитело ритуксимаб представляет собой показательный пример терапевтического антитела, которое может применяться в режиме монотерапии при гематологических злокачественных

заболеваниях (2, 3), а в сочетании с общепринятыми химиотерапевтическими препаратами (4-6) оно способно значительно улучшить выживаемость пациентов с неходжкинской лимфомой (7, 8). Однако, существенная доля пациентов с гематологическими заболеваниями не подходит для анти-CD20-лечения по причине

5 отсутствия экспрессии CD20 в опухолевой клетке или вследствие врожденной или приобретенной устойчивости к CD20-терапии (9). Следовательно, разработка новых поколений антител, обладающих активностью в отношении определенных, в настоящее время неизлечимых видов рака является в высокой степени обоснованной для улучшения клинического исхода.

10 Заявители в этом документе описывают новое человеческое антитело ICAM-1, нацеленное на эпитоп B11, которое обладает широкой и высокой эффективностью и сильной противоопухолевой активностью по сравнению с доступным в настоящее время лечением против различных трансплантируемых CD20-экспрессирующих и CD20-негативных В-клеточных опухолей человека *in vivo*. Антитело ICAM-1 B11 было выбрано

15 из наивной библиотеки антител n-CoDeR® (BioInvent) с помощью метода дифференциального биопэннинга и скрининга программируемой клеточной смерти (PCD), основанного на его нацеливании на активированный поверхностный рецептор опухолевых В-клеток и его способности индуцировать программируемую клеточную смерть. Насколько нам известно, впервые методология функционального скрининга

20 была успешно применена для того чтобы, с одной стороны, установить новые функции ранее хорошо охарактеризованного рецептора (ICAM-1) и в то же самое время создать антитела к той же мишени, обладающие значительным терапевтическим потенциалом. Такой подход - "сначала функция" - к обнаружению терапевтических антител представляет собой важную и дополнительную стратегию к более традиционным

25 подходам, использующим пэннинг в отношении рекомбинантного таргетного белка или трансфицированных клеток-мишеней, поскольку найденный пул антител является специфическим исключительно по отношению к заранее определенному таргетному рецептору(ам).

Наше открытие, что IgG B11 обладает конкурентоспособной противоопухолевой

30 активностью *in vivo* по сравнению с ритуксимабом против CD20-экспрессирующих опухолей одновременно с наблюдаемой обычной экспрессией ICAM-1 в разных подтипах лимфомы, показывает, что его можно применять для лечения лимфом, экспрессирующих CD20. В то время как ритуксимаб значительно улучшает выживаемость пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL) при применении отдельно или в комбинации с

35 химиотерапией (8), существенная часть пациентов с рецидивной или устойчивой CD20+ фолликулярной лимфомой не отвечает на первоначальное лечение ритуксимабом (2) и более половины первоначально реагирующих на лечение ритуксимабом пациентов приобретает резистентность и более не получает пользы от лечения (63). Поэтому, дополнительные предклинические исследования противоопухолевой активности IgG

40 B11 против опухолей, экспрессирующих CD20, являются обоснованными и покажут его применимость для лечения релевантной с клинической точки зрения и растущей группы пациентов, резистентных к ритуксимабу, или пациентов с резистентной NHL.

Важным является то, что IgG B11 обладает широкой и сильной антимиеломной активностью *in vivo*. В то время как CD20 широко экспрессируется во время развития

45 В-клетки из ранней стадии В-клетки-предшественника только после воздействия антигена на В-клетку, секретирующие антитела плазмочиты и раки, происходящие из этой стадии, включая множественную миелому, как правило, не экспрессируют или показывают низкую и гетерогенную экспрессию CD20. По этой причине маловероятно, что

множественную миелому можно эффективно лечить с помощью CD20-таргетной терапии, подобной ритуксимабу (23).

В противоположность этому, некоторые исследования указывают на то, что ICAM-1 может быть подходящей мишенью для лечения миеломы, и в частности для таргетной терапии с помощью антител, подобных IgG BН. Прежде всего, последние сообщения описывают, что ICAM-1 сильно экспрессируется плазматическими клетками первичной множественной миеломы, и что ICAM-1 дополнительно повышается у пациентов в ответ на лечение химиотерапевтическими препаратами и особенно у пациентов с развитой резистентностью к химиотерапии (14, 22) - на сегодняшний день эта стадия является неизбежно терминальной стадией множественной миеломы (64).

В соответствии с этими наблюдениями в описании показано, что по сравнению с немиеломатозными лимфоцитами пациента абсолютное большинство миеломных клеток в повышенных количествах экспрессировало эпитоп, на который нацеливается B11.

Высокая и однородная экспрессия мишени на злокачественных клетках, которая повышается при прогрессировании болезни и развитии резистентности к доступным в настоящее время способам лечения, считается главным признаком мишеней, подходящих для терапии, основанной на антителах, и в частности, антителах, обладающих прямой цитотоксичностью в отношении раковых клеток.

В соответствии с прямой цитотоксичностью, являющейся важным механизмом для IgG B11 противоопухолевой активности, показано, что IgG B11 противоопухолевая активность коррелировала с IgG связыванием и насыщением ICAM-1-рецепторов, экспрессированных опухолевой клеткой. Более того, в соответствии с наиболее важным механизмом действия - прямой цитотоксичностью, направленной на опухолевые клетки, IgG B11 в дополнение к его подтвержденной способности вызывать программируемую клеточную смерть (10) обеспечивал Fc:FcγR-зависимую противоопухолевую активность и *in vivo* и *in vitro*. Накопленный опыт показывает, что взаимодействие между константным доменом (Fc) антитела и Fc-гамма рецепторами хозяина (FcγR) способствуют клинической активности ритуксимаба и других противоопухолевых антител, по меньшей мере, в различных группах пациентов (52, 53, 65-67).

Таким образом, в независимых исследованиях NHL пациенты, гомозиготные по FcγRIIIa аллелю с самой высокой аффинностью к константному Fc-домену антитела, показывают улучшенную выживаемость в ответ на лечение ритуксимабом по сравнению с пациентами, несущими, по меньшей мере, один FcγRIIIa аллель с более низкой аффинностью, причем противоопухолевая активность ритуксимаба *in vivo* критически зависит от взаимодействий антитело Fc: FcγR-хозяина (54).

Несмотря на то, что в настоящее время не существует антитела, одобренного для лечения множественной миеломы, терапевтические антитела, включающие Fc:FcγR, преобразовали способ лечения гематологических и солидных раковых заболеваний (1). Доклинические результаты показывают, что ImiDs, используемые в настоящее время и разработанные для лечения миеломы, увеличивают Fc:FcR-зависимую противоопухолевую активность (Wu et al (2008) Clin Cancer Res, 14 pp 4650-7. IMiDs являются структурными и функциональными аналогами талидомида, которые представляют собой новый перспективный класс иммуномодуляторов для лечения воспаления, аутоиммунных и неопластических заболеваний.

Эти наблюдения означают, что в том случае, когда соответствующие рецепторы, связанные с миеломой, и антитела, включающие Fc:FcγR, нацеленные на эти структуры, будут идентифицированы, такие мишень-специфические антитела могут улучшить

лечение миеломы и исход заболевания (1). Следовательно, на основе доступной литературы и представленных здесь данных, показано, что ICAM-1: IgG B11 может обеспечить приемлемую базу для лечения миеломы.

В качестве дополнительной поддержки в отношении ICAM-1-нацеленного вмешательства в лечение миеломы можно сказать, что ICAM-1 замешан в патогенезе множественной миеломы и развитии лекарственной резистентности на различных уровнях (12, 14, 22). Множественная миелома характеризуется инфильтрацией и распространением злокачественных плазматических клеток в костный мозг, а пролиферация и выживаемость клеток миеломы зависит от взаимодействий со стромальными клетками. ICAM-1, посредством связывания с его лигандами (интегрином $\alpha\text{L}\beta 2$, интегрином $\alpha\text{M}\beta 2$ и тис-1) принимает участие в явлениях клеточной адгезии, инициирующих множество клеточных сигнальных путей, способствующих повышенной пролиферации клеток множественной миеломы, миграции, резистентности к РСД и развитию молекул клеточной адгезии, индуцированных лекарственной резистентностью (12, 68, 69). Плановые исследования направлены на изучение эффекта IgG B11 на ICAM-1-зависимые взаимодействия клеток миеломы человека и клеток стромы человека на примере scid-hu экспериментальной модели *in vivo* (70) и совместного культивирования *in vitro* миеломных клеток с остеобластами или остеокластами (71).

Улучшенная противоопухолевая активность IgG B11 по сравнению с ритуксимабом и бортезомибом является привлекательной с точки зрения механизма действия. Улучшенная противоопухолевая активность не является результатом большего количества ICAM-1 эпитопов, экспрессированных опухолевыми клетками, по сравнению с эпитопами к ритуксимабу, указывая, что IgG B11 или доставлял более сильные сигналы смерти или вызывал клеточную смерть с помощью разных сигнальных или эффекторных путей по сравнению с ритуксимабом. Способность инициировать гибель клетки с помощью путей, отличных от путей ритуксимаба и бортезомиба, может быть важна, в частности, при попытке лечить опухоли, которые имеют приобретенную резистентность к этим лекарственным средствам.

Терапевтическое противоопухолевое антитело в дополнение к проявляемой значительной противоопухолевой активности должно быть безопасным и переносимым для пациентов. ICAM-1 показывает ограниченную экспрессию и распределение в тканях при нормальных физиологических обстоятельствах, но активируется в некоторых типах клеток в ответ на повреждение ткани или воспалительный стресс, при этом увеличивая проблемы, связанные с безопасностью лечения анти-ICAM-1 антителами. Предыдущие исследования, проведенные независимыми исследователями, показали, однако, что анти-ICAM-1 антитело хорошо переносилось разными группами пациентов (75-79). Наши доклинические испытания на безопасность B11 показывают, что оно будет безопасным и хорошо переносимым, и не существует данных, что B11 будет усиливать или вмешиваться в работу иммунной клетки.

Исходя из фармакологической перспективы и в силу его полностью человеческой природы, предполагается, что B11 должно быть низко иммуногенным или неиммуногенным по сравнению с разработанными ранее мышинными или химерными ICAM-1 антителами (80), и должно иметь время полужизни, типичное для человеческих IgGs (2-3 недели). Таким образом, исходя из его значительной доклинической противомиеломной активности и ожидаемого профиля безопасности, в настоящее время в США начинаются клинические испытания с применением IgG B11 при множественной миеломе.

Итак, заявители установили новую клеточную смерть, которую вызывает ICAM-1

антитело (IgG B11), обладающее повышенной противомиеломной активностью по сравнению с применяемыми в настоящее время способами лечения, включая бортезомиб (Велкейд), дексаметазон, ревлимид и алкеран, в доклинических моделях множественной миеломы. Заявители продемонстрировали, что большинство клеток множественной миеломы, собранных после лечения *in vivo* используемыми в настоящее время средствами, сохраняло или увеличивало экспрессию ICAM-1 (включая B11 эпитоп) наводя на мысль, что такие ICAM-1 антитела будут полезны, в частности, для пациентов, не реагирующих на лечение или вторично заболевших после предшествующего лечения другими средствами.

Следовательно, в первом аспекте изобретения предоставляется:

Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со специфичностью связывания с ICAM-1, или варианта, «слитые белки» или производного указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента или «слитые белки» указанного варианта или его производного со специфичностью связывания с ICAM-1 в производстве медикамента для лечения рака у пациента, при этом пациента ранее лечили по поводу рака, но он или не отвечал на указанное лечение, или он раньше отвечал на указанное лечение, а впоследствии вторично заболел (перенес рецидив).

Рецидив определяется как прогрессирование болезни с клиническими проявлениями после достигнутого ранее терапевтического ответа (т.е. улучшения состояния болезни).

Отсутствие реакции определяется как прогрессирование болезни во время лечения или отсутствие терапевтического ответа.

Существует целый ряд критериев, которые должны рассматриваться клиницистом с целью определения, наблюдается ли рецидив у пациента, или пациент не реагирует на определенное лечение. Эти факторы включают (но не ограничиваются этим) новые переломы костей в сочетании с болью в костях, усталость вследствие пониженного гемоглобина или повышенной почечной недостаточности, инфекцию, анализ крови, размер опухоли или возобновление роста опухоли, развитие новых злокачественных образований (метастазов).

Лабораторные испытания любых из этих факторов проводятся с применением стандартных клинических и лабораторных методов и оборудования.

В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой тот же самый рак, от которого пациента лечили ранее.

В дополнительном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой рак, отличный от рака, по поводу которого пациента лечили ранее.

Во втором аспекте изобретения предоставляется:

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент со специфичностью связывания с ICAM-1 или вариант, «слитый белок» или производное указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или «слитый белок» указанного варианта или его производного со специфичностью связывания с ICAM-1 для применения при лечении рака у пациента, при этом пациента ранее лечили по поводу рака, но он или не отвечал на указанное лечение, или он раньше отвечал на указанное лечение, а впоследствии вторично заболел (перенес рецидив).

В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой тот же самый рак, от которого пациента лечили ранее.

В следующем варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой рак, отличный от рака, по поводу которого пациента лечили ранее.

В третьем аспекте изобретения предоставляется:

Способ лечения рака у пациента, которого лечили ранее по поводу рака, но он или

не отвечал на лечение или он раньше отвечал на лечение, а впоследствии перенес рецидив, способ, включающий стадию введения пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со специфичностью связывания с ICAM-1 или варианта, «слитые белки» или производного указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или «слитые белки» указанного варианта или его производного со специфичностью связывания с ICAM-1.

В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой тот же самый рак, от которого пациента лечили ранее.

В следующем варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой рак, отличный от рака, по поводу которого пациента лечили ранее.

Противоопухолевая терапия способствует регрессии опухоли посредством ингибирования пролиферации опухолевых клеток, ингибирования ангиогенеза (роста новых кровеносных сосудов, необходимых для поддержки роста опухоли) и/или подавления метастазирования путем уменьшения подвижности опухолевых клеток или инвазивности.

Антитела изобретения могут быть эффективными при лечении онкологических заболеваний у детей и взрослых, включая солидные опухоли/злокачественные новообразования, местнораспространенные опухоли, саркомы мягких тканей человека, метастатический рак, включая лимфатические метастазы, злокачественные заболевания клеток крови, включая множественную миелому, острый и хронический лейкоз и лимфому, раки головы и шеи, включая рак ротовой полости, рак глотки и рак щитовидной железы, рак легкого, включая мелкоклеточную карциному и немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, включая мелкоклеточную карциному и дуктальную карциному, раки желудочно-кишечного тракта, включая рак пищевода, рак желудка, рак толстой кишки, колоректальный рак и полипы, связанные с колоректальной неоплазией, рак поджелудочной железы, рак печени, урологические раки и рак простаты, злокачественные образования женских половых путей, включая карциному яичника, рак матки (включая рак эндометрия) и солидную опухоль в овариальном фолликуле, рак почки, включая почечноклеточную карциному, рак мозга, включая врожденные опухоли мозга, нейробластому, астроцитарные опухоли мозга, глиому, метастатическую инвазию опухолевых клеток в центральную нервную систему, рак костей, включая остеому, раки кожи, включая злокачественную меланому, опухолевую прогрессию кератиноцитов кожи человека, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, гемангиоперицитому и саркому Капоши.

Терапевтические композиции могут быть введены в терапевтически эффективных дозировках отдельно или в комбинации с адъювантной терапией рака, такой как, хирургическое вмешательство, химиотерапия, радиотерапия, термотерапия и лазерная терапия, и могут обеспечивать благоприятное воздействие, например, уменьшение размера опухоли, уменьшение скорости роста опухоли, ингибирование метастазирования или иным образом улучшать клиническое состояние, без обязательного уничтожения опухоли.

Кроме того, терапевтические композиции изобретения могут применяться для профилактического лечения рака. Существуют наследственные состояния и/или ситуации, связанные с экологической обстановкой (например, воздействием канцерогенов), которые, как известно в данной области, предрасполагают индивидуума к развитию раковых заболеваний. При таких обстоятельствах может быть полезным лечение этих индивидуумов терапевтически эффективными дозами антител или антигенсвязывающих фрагментов изобретения для уменьшения риска развития рака.

Модели *in vitro* могут использоваться для определения эффективных доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изобретения как потенциальной противоопухолевой терапии. Такие модели *in vitro* включают методы анализа пролиферации культивируемых опухолевых клеток, выращивание культивируемых
 5 опухолевых клеток в мягком агаре (см. Freshney, (1987) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Wiley-Liss, New York, NY Ch 18 and Ch 21), опухолевые системы на безтимусных мышах, как описано в Giovanella et al, *J. Natl. Can. Inst.*, 52: 921-30 (1974), метод анализа подвижности и инвазивного потенциала опухолевых клеток в камере Бойдена, как описано в Pilkington et al., *Anticancer Res.*, 17: 4107-9 (1997), и исследование
 10 ангиогенеза, например, методом индукции васкуляризации хориоаллантоисной оболочки цыпленка или индукции миграции эндотелиальных клеток сосудов, как описано в Ribatta et al, *Intl. J. Dev. Biol*, 40: 1189-97 (1999) и Li et al, *Clin. Exp. Metastasis*, 17:423-9 (1999), соответственно. Подходящие линии опухолевых клеток доступны, например, из каталога Американской коллекции культур.

15 В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой гематологическую опухоль.

Гематологические опухоли затрагивают кровь, костный мозг и лимфатические узлы. Поскольку кровь, костный мозг и лимфатические узлы неразрывно связаны благодаря иммунной системе, болезнь, затрагивающая что-то одно из трех, во многих случаях
 20 будет затрагивать остальные: несмотря на то, что лимфома в принципе является болезнью лимфатических узлов, она часто распространяется на костный мозг, затрагивая кровь и в некоторых случаях продуцируя парапротеин.

Гематологические злокачественные новообразования могут происходить от любой из двух основных линий дифференцировки клеток крови: клеток миелоидной и
 25 лимфоидной линий. Линия миелоидных клеток обычно продуцирует гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки; лимфоидная линия клеток продуцирует В, Т, NK и плазматические клетки. Лимфома, лимфоцитарный лейкоз и миелома происходят от лимфоидной линии, тогда как острый и хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластические синдромы и миелопролиферативные
 30 заболевания имеют миелоидное происхождение.

В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой лимфопролиферативное заболевание (LPD).

Лимфопролиферативные заболевания (LPDs) относятся к состояниям, при которых лимфоциты вырабатываются в избыточных количествах. Как правило, они возникают
 35 у пациентов с нарушенной иммунной системой.

Примеры LPD включают

- Фолликулярную лимфому
- Хронический лимфоцитарный лейкоз
- Острый лимфобластный лейкоз
- 40 - Лейкоз ворсистых клеток
- Лимфому
- Множественную миелому
- Макроглобулинемию Вальденстрема
- Синдром Вискотта-Олдрича
- 45 - Посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство
- Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (SLE)

В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, представляет собой лимфому или неходжкинскую лимфому (NHL).

Лимфома - это раковое заболевание, начинающееся в лимфатических клетках иммунной системы и являющееся солидной опухолью лимфоидных клеток. Эти злокачественные клетки часто возникают в лимфатических узлах, приводя к увеличению лимфатического узла (образованию опухоли). Лимфомы тесно связаны с лимфоидным лейкозом, который также возникает в лимфоцитах, но, как правило, затрагивает только циркулирующую кровь и костный мозг (когда клетки крови вырабатываются в процессе гематопоза) и обычно не образует статических опухолей. Существует много типов лимфом, и в свою очередь, лимфомы являются обширной группой болезней, называемых гематологическими опухолями.

В одном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, является болезнью плазматических клеток (также известной, как плазмноклеточная дискразия).

- Раки могут принимать вид нарушений (плазмноклеточная дискразия).

Плазмноклеточная дискразия является результатом злокачественной пролиферации моноклональной популяции плазматических клеток, которые могут секретировать или не секретировать обнаружимые уровни моноклонального иммуноглобулина или парапротеина, обычно называемого М протеином. Обычная плазмноклеточная дискразия включает моноклональную гаммапатию неопределенного значения (MGUS), множественную миелому, солитарную плазмоцитому кости, экстрамедуллярную плазмоцитому, макроглобулинемию Вальденстрема (WM), первичный амилоидоз и болезнь тяжелых цепей.

В дополнительном варианте осуществления рак, который необходимо лечить, является множественной миеломой.

В одном варианте осуществления способ лечения рака включает дополнительное противораковое средство, обычно служащее для лечения множественной миеломы.

С помощью термина 'лечение' мы включаем и терапевтическое и профилактическое лечение субъекта/пациента. Термин 'профилактическое' используется, чтобы охватить применение полипептида или композиции, описанных здесь, которое предотвращает или уменьшает вероятность появления или развития рака (такого как множественная миелома) у пациента или субъекта.

Терапевтически эффективное количество' или 'эффективное количество' или 'терапевтически эффективный' при применении в описании относится к количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект в отношении данного состояния и режима введения. Оно представляет собой заранее определенное количество активного вещества, рассчитанное с целью получения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым для введения вспомогательным веществом и разбавителем, т.е. носителем или наполнителем. Кроме того, оно означает количество, достаточное для уменьшения или предотвращения имеющей клиническое значение недостаточности активности, функции и ответа у хозяина. Альтернативно, терапевтически эффективное количество является достаточным для того, чтобы вызвать улучшение имеющего клиническое значение состояния у хозяина.

В предпочтительном варианте осуществления применение первого и второго аспекта изобретения и способа согласно третьему аспекту изобретения включает стадию введения пациенту, нуждающемуся в этом, количества в промежутке примерно от 0,02 мг/кг до 20 мг/кг антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного.

В особенно предпочтительном варианте осуществления количество антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или производного, введенное пациенту находится в промежутке приблизительно от 0,02 мг/кг до 0,10 мг/

кг; или от 0,10 мг до 0,20 мг/кг; или от 0,20 мг до 0,30 мг/кг; или от 0,30 мг до 0,40 мг/кг; или от 0,40 мг до 0,50 мг/кг; или от 0,50 мг до 0,60 мг/кг; или от 0,60 мг до 0,70 мг/кг; или от 0,70 мг до 0,80 мг/кг; или от 0,80 мг до 0,90 мг/кг; или от 0,90 мг до 1,00 мг/кг; или от 1,00 мг до 1,10 мг/кг; или от 1,10 мг до 1,20 мг/кг; или от 1,20 мг до 1,30 мг/кг; или от 1,30 мг до 1,40 мг/кг; или от 1,40 мг до 1,50 мг/кг; или от 1,50 мг до 1,60 мг/кг; или от 1,60 мг до 1,70 мг/кг; или от 1,70 мг до 1,80 мг/кг; или от 1,80 мг до 1,90 мг/кг; или от 1,90 мг до 2,00 мг/кг; или от 2,00 мг/кг до 2,10 мг/кг; или от 2,10 мг до 2,20 мг/кг; или от 2,20 мг до 2,30 мг/кг; или от 2,30 мг до 2,40 мг/кг; или от 2,40 мг до 2,50 мг/кг; или от 2,50 мг до 2,60 мг/кг; или от 2,60 мг до 2,70 мг/кг; или от 2,70 мг до 2,80 мг/кг; или от 2,80 мг до 2,90 мг/кг; или от 2,90 мг до 3,00 мг/кг; или от 3,00 мг до 3,10 мг/кг; или от 3,10 мг до 3,20 мг/кг; или от 3,20 мг до 3,30 мг/кг; или от 3,30 мг до 3,40 мг/кг; или от 3,40 мг до 3,50 мг/кг; или от 3,50 мг до 3,60 мг/кг; или от 3,60 мг до 3,70 мг/кг; или от 3,70 мг до 3,80 мг/кг; или от 3,80 мг до 3,90 мг/кг; или от 3,90 мг до 4,00 мг/кг; или от 4,00 мг до 4,10 мг/кг; или от 4,10 мг до 4,20 мг/кг; или от 4,20 мг до 4,30 мг/кг; или от 4,30 мг до 4,40 мг/кг; или от 4,40 мг до 4,50 мг/кг; или от 4,50 мг до 4,60 мг/кг; или от 4,60 мг до 4,70 мг/кг; или от 4,70 мг до 4,80 мг/кг; или от 4,80 мг до 4,90 мг/кг; или от 4,90 мг до 5,00 мг/кг; или от 5,00 мг/кг до 6,00 мг/кг; или от 6,00 мг до 7,00 мг/кг; или от 7,00 мг до 8,00 мг/кг; или от 8,00 мг до 9,00 мг/кг; или от 9,00 мг до 10,00 мг/кг; или от 10,00 мг до 11,00 мг/кг; или от 11,00 мг до 12,00 мг/кг; или от 12,00 мг до 13,00 мг/кг; или от 13,00 мг до 14,00 мг/кг; или от 14,00 мг до 15,00 мг/кг; или от 15,00 мг до 16,00 мг/кг; или от 16,00 мг до 17,00 мг/кг; или от 17,00 мг до 18,00 мг/кг; или от 18,00 мг до 19,00 мг/кг; или от 19,00 мг до 20,00 мг/кг.

В альтернативном варианте осуществления количество антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или производного, введенное пациенту, составляет приблизительно 0,02 мг/кг; или 0,03 мг/кг; или 0,04 мг/кг; или 0,05 мг/кг; или 0,06 мг/кг; или 0,07 мг/кг; или 0,08 мг/кг; или 0,09 мг/кг; или 0,10 мг/кг; или 0,15 мг/кг; или 0,20 мг/кг; или 0,25 мг/кг; или 0,30 мг/кг; или 0,35 мг/кг; или 0,40 мг/кг; или 0,45 мг/кг; или 0,50 мг/кг; или 0,60 мг/кг; или 0,70 мг/кг; или 0,80 мг/кг; или 0,90 мг/кг; или 1,00 мг/кг; или 1,10 мг/кг; или 1,20 мг/кг; или 1,30 мг/кг; или 1,40 мг/кг; или 1,50 мг/кг; или 1,60 мг/кг; или 1,70 мг/кг; или 1,80 мг/кг; или 1,90 мг/кг; или 2,00 мг/кг; или 2,10 мг/кг; или 2,20 мг/кг; или 2,30 мг/кг; или 2,40 мг/кг; или 2,50 мг/кг; или 2,60 мг/кг; или 2,70 мг/кг; или 2,80 мг/кг; или 2,90 мг/кг; или 3,00 мг/кг; или 3,10 мг/кг; или 3,20 мг/кг; или 3,30 мг/кг; или 3,40 мг/кг; или 3,50 мг/кг; или 3,60 мг/кг; или 3,70 мг/кг; или 3,80 мг/кг; или 3,90 мг/кг; или 4,00 мг/кг; или 4,10 мг/кг; или 4,20 мг/кг; или 4,30 мг/кг; или 4,40 мг/кг; или 4,50 мг/кг; или 4,60 мг/кг; или 4,70 мг/кг; или 4,80 мг/кг; или 4,90 мг/кг; или 5,00 мг/кг; или 6,00 мг/кг; или 7,00 мг/кг; или 8,00 мг/кг; или 9,00 мг/кг; или 10,00 мг/кг; или 11,00 мг/кг; или 12,00 мг/кг; или 13,00 мг/кг; или 14,00 мг/кг; или 15,00 мг/кг; или 16,00 мг/кг; или 17,00 мг/кг; или 18,00 мг/кг; или 19,00 мг/кг; или 20,00 мг/кг.

Специалистам ясно, что лечение антителами может обеспечивать терапевтические преимущества в отношении низкой токсичности при их способности нацеливаться на раковые клетки и щадить окружающие ткани. Переносимость может отражать динамическое действие иммуноглобулинов, использующих физиологические механизмы, такие как смерть клетки, опосредованную натуральными киллерами (NK), или непосредственную индукцию апоптоза, а не некроза опухолевых клеток.

Как понятно специалистам в данной области техники, точное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может варьировать в зависимости от его специфической активности. Подходящий размер дозировки может содержать заранее

установленное количество активной композиции, подсчитанное для получения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым разбавителем. В методах и вариантах применения для производства композиций изобретения обеспечивается терапевтически эффективное количество активного компонента.

- 5 Терапевтически эффективное количество может быть определено средним медицинским специалистом или ветеринаром на основе характеристик пациента, таких как возраст, вес, пол, состояние, осложнения, наличие других болезней и т.д., как хорошо известно в данной области техники.

В дополнительном варианте осуществления применение, антитело или способ изобретения включает ICAM-1 расположенный на поверхности плазмацита.

В дополнительном варианте осуществления применение, антитело или способ изобретения содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное, способное специфически связывать ICAM-1, расположенный на поверхности клетки, и вызывать программируемую смерть клетки

15 или апоптоз этой клетки.

В дополнительном варианте осуществления, применение, антитело или способ изобретения содержит эффективное количество антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного, которое составляет в пределах примерно от 0,1 мкг до 5 г антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного.

20

В особенно предпочтительном варианте осуществления эффективное количество антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного составляет приблизительно:

0,10 мкг; или 0,15 мкг; или 0,20 мкг; или 0,25 мкг; или 0,30 мкг; или 0,35 мкг; или 0,40 мкг; или 0,45 мкг; или 0,50 мкг; или 0,60 мкг; или 0,70 мкг; или 0,80 мкг; или 0,90 мкг; или 1,00 мкг; или 1,10 мкг; или 1,20 мкг; или 1,30 мкг; или 1,40 мкг; или 1,50 мкг; или 1,60 мкг; или 1,70 мкг; или 1,80 мкг; или 1,90 мкг; или 2,00 мкг; или 2,10 мкг; или 2,20 мкг; или 2,30 мкг; или 2,40 мкг; или 2,50 мкг; или 2,60 мкг; или 2,70 мкг; или 2,80 мкг; или 2,90 мкг; или 3,00 мкг; или 3,10 мкг; или 3,20 мкг; или 3,30 мкг; или 3,40 мкг; или 3,50 мкг; или 3,60 мкг; или 3,70 мкг; или 3,80 мкг; или 3,90 мкг; или 4,00 мкг; или 4,10 мкг; или 4,20 мкг; или 4,30 мкг; или 4,40 мкг; или 4,50 мкг; или 4,60 мкг; или 4,70 мкг; или 4,80 мкг; или 4,90 мкг; или 5,00 мкг; или 6,00 мкг; или 7,00 мкг; или 8,00 мкг; или 9,00 мкг; или 10,00 мкг; или 11,00 мкг; или 12,00 мкг; или 13,00 мкг; или 14,00 мкг; или 15,00 мкг; или 16,00 мкг; или 17,00 мкг; или 18,00 мкг; или 19,00 мкг; или 20,00 мкг; или 21,00 мкг; или 22,00 мкг; или 23,00 мкг; или 24,00 мкг; или 25,00 мкг; или 26,00 мкг; или 27,00 мкг; или 28,00 мкг; или 29,00 мкг; или 30,00 мкг; или 31,00 мкг; или 32,00 мкг; или 33,00 мкг; или 34,00 мкг; или 35,00 мкг; или 36,00 мкг; или 37,00 мкг; или 38,00 мкг; или 39,00 мкг; или 40,00 мкг; или 41,00 мкг; или 42,00 мкг; или 43,00 мкг; или 44,00 мкг; или 45,00 мкг; или 46,00 мкг; или 47,00 мкг; или 48,00 мкг; или 49,00 мкг; или 50,00 мкг; или 51,00 мкг; или 52,00 мкг; или 53,00 мкг; или 54,00 мкг; или 55,00 мкг; или 56,00 мкг; или 57,00 мкг; или 58,00 мкг; или 59,00 мкг; или 60,00 мкг; или 61,00 мкг; или 62,00 мкг; или 63,00 мкг; или 64,00 мкг; или 65,00 мкг; или 66,00 мкг; или 67,00 мкг; или 68,00 мкг; или 69,00 мкг; или 70,00 мкг; или 71,00 мкг; или 72,00 мкг; или 73,00 мкг; или 74,00 мкг; или 75,00 мкг; или 76,00 мкг; или 77,00 мкг; или 78,00 мкг; или 79,00 мкг; или 80,00 мкг; или 81,00 мкг; или 82,00 мкг; или 83,00 мкг; или 84,00 мкг; или 85,00 мкг; или 86,00 мкг; или 87,00 мкг; или 88,00 мкг; или 89,00 мкг; или 90,00 мкг; или 91,00 мкг; или 92,00 мкг; или 93,00 мкг; или 94,00 мкг; или 95,00 мкг; или 96,00 мкг; или 97,00 мкг; или 98,00 мкг; или 99,00 мкг; или 100,00 мкг (0,10 мг); или 0,15 мг; или 0,20 мг; или 0,25 мг; или 0,30 мг; или

45

0,35 мг; или 0,40 мг; или 0,45 мг; или 0,50 мг; или 0,60 мг; или 0,70 мг; или 0,80 мг; или 0,90 мг; или 1,00 мг; или 1,10 мг; или 1,20 мг; или 1,30 мг; или 1,40 мг; или 1,50 мг; или 1,60 мг; или 1,70 мг; или 1,80 мг; или 1,90 мг; или 2,00 мг; или 2,10 мг; или 2,20 мг; или 2,30 мг; или 2,40 мг; или 2,50 мг; или 2,60 мг; или 2,70 мг; или 2,80 мг; или 2,90 мг; или 3,00 мг; или 3,10 мг; или 3,20 мг; или 3,30 мг; или 3,40 мг; или 3,50 мг; или 3,60 мг; или 3,70 мг; или 3,80 мг; или 3,90 мг; или 4,00 мг; или 4,10 мг; или 4,20 мг; или 4,30 мг; или 4,40 мг; или 4,50 мг; или 4,60 мг; или 4,70 мг; или 4,80 мг; или 4,90 мг; или 5,00 мг; или 6,00 мг; или 7,00 мг; или 8,00 мг; или 9,00 мг; или 10,00 мг; или 11,00 мг; или 12,00 мг; или 13,00 мг; или 14,00 мг; или 15,00 мг; или 16,00 мг; или 17,00 мг; или 18,00 мг; или 19,00 мг; или 20,00 мг; или 21,00 мг; или 22,00 мг; или 23,00 мг; или 24,00 мг; или 25,00 мг; или 26,00 мг; или 27,00 мг; или 28,00 мг; или 29,00 мг; или 30,00 мг; или 31,00 мг; или 32,00 мг; или 33,00 мг; или 34,00 мг; или 35,00 мг; или 36,00 мг; или 37,00 мг; или 38,00 мг; или 39,00 мг; или 40,00 мг; или 41,00 мг; или 42,00 мг; или 43,00 мг; или 44,00 мг; или 45,00 мг; или 46,00 мг; или 47,00 мг; или 48,00 мг; или 49,00 мг; или 50,00 мг; или 51,00 мг; или 52,00 мг; или 53,00 мг; или 54,00 мг; или 55,00 мг; или 56,00 мг; или 57,00 мг; или 58,00 мг; или 59,00 мг; или 60,00 мг; или 61,00 мг; или 62,00 мг; или 63,00 мг; или 64,00 мг; или 65,00 мг; или 66,00 мг; или 67,00 мг; или 68,00 мг; или 69,00 мг; или 70,00 мг; или 71,00 мг; или 72,00 мг; или 73,00 мг; или 74,00 мг; или 75,00 мг; или 76,00 мг; или 77,00 мг; или 78,00 мг; или 79,00 мг; или 80,00 мг; или 81,00 мг; или 82,00 мг; или 83,00 мг; или 84,00 мг; или 85,00 мг; или 86,00 мг; или 87,00 мг; или 88,00 мг; или 89,00 мг; или 90,00 мг; или 91,00 мг; или 92,00 мг; или 93,00 мг; или 94,00 мг; или 95,00 мг; или 96,00 мг; или 97,00 мг; или 98,00 мг; или 99,00 мг; или 100,00 мг (0,10 г); или 0,15 г; или 0,20 г; или 0,25 г; или 0,30 г; или 0,35 г; или 0,40 г; или 0,45 г; или 0,50 г; или 0,60 г; или 0,70 г; или 0,80 г; или 0,90 г; или 1,00 г; или 1,10 г; или 1,20 г; или 1,30 г; или 1,40 г; или 1,50 г; или 1,60 г; или 1,70 г; или 1,80 г; или 1,90 г; или 2,00 г; или 2,10 г; или 2,20 г; или 2,30 г; или 2,40 г; или 2,50 г; или 2,60 г; или 2,70 г; или 2,80 г; или 2,90 г; или 3,00 г; или 3,10 г; или 3,20 г; или 3,30 г; или 3,40 г; или 3,50 г; или 3,60 г; или 3,70 г; или 3,80 г; или 3,90 г; или 4,00 г; или 4,10 г; или 4,20 г; или 4,30 г; или 4,40 г; или 4,50 г; или 4,60 г; или 4,70 г; или 4,80 г; или 4,90 г; или 5,00 г.

В особенно предпочтительном варианте осуществления эффективное количество антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного находится приблизительно в пределах:

от 0,10 мкг до 0,20 мкг; или от 0,20 мкг до 0,30 мкг; или от 0,30 мкг до 0,40 мкг; или от 0,40 мкг до 0,50 мкг; или от 0,50 мкг до 0,60 мкг; или от 0,60 мкг до 0,70 мкг; или от 0,70 мкг до 0,80 мкг; или от 0,80 мкг до 0,90 мкг; или от 0,90 мкг до 1,00 мкг; или от 1,00 мкг до 1,10 мкг; или от 1,10 мкг до 1,20 мкг; или от 1,20 мкг до 1,30 мкг; или от 1,30 мкг до 1,40 мкг; или от 1,40 мкг до 1,50 мкг; или от 1,50 мкг до 1,60 мкг; или от 1,60 мкг до 1,70 мкг; или от 1,70 мкг до 1,80 мкг; или от 1,80 мкг до 1,90 мкг; или от 1,90 мкг до 2,00 мкг; или от 2,00 мкг до 2,10 мкг; или от 2,10 мкг до 2,20 мкг; или от 2,20 мкг до 2,30 мкг; или от 2,30 мкг до 2,40 мкг; или от 2,40 мкг до 2,50 мкг; или от 2,50 мкг до 2,60 мкг; или от 2,60 мкг до 2,70 мкг; или от 2,70 мкг до 2,80 мкг; или от 2,80 мкг до 2,90 мкг; или от 2,90 мкг до 3,00 мкг; или от 3,00 мкг до 3,10 мкг; или от 3,10 мкг до 3,20 мкг; или от 3,20 мкг до 3,30 мкг; или от 3,30 мкг до 3,40 мкг; или от 3,40 мкг до 3,50 мкг; или от 3,50 мкг до 3,60 мкг; или от 3,60 мкг до 3,70 мкг; или от 3,70 мкг до 3,80 мкг; или от 3,80 мкг до 3,90 мкг; или от 3,90 мкг до 4,00 мкг; или от 4,00 мкг до 4,10 мкг; или от 4,10 мкг до 4,20 мкг; или от 4,20 мкг до 4,30 мкг; или от 4,30 мкг до 4,40 мкг; или от 4,40 мкг до 4,50 мкг; или от 4,50 мкг до 4,60 мкг; или от 4,60 мкг до 4,70 мкг; или от 4,70 мкг до 4,80 мкг; или от 4,80 мкг до 4,90 мкг; или от 4,90 мкг до 5,00 мкг; или от 5,00 мкг до 6,00 мкг; или от

[illegible]

мг до 8,00 мг; или от 8,00 мг до 9,00 мг; или от 9,00 мг до 10,00 мг; или от 10,00 мг до 11,00 мг; или от 11,00 мг до 12,00 мг; или от 12,00 мг до 13,00 мг; или от 13,00 мг до 14,00 мг; или от 14,00 мг до 15,00 мг; или от 15,00 мг до 16,00 мг; или от 16,00 мг до 17,00 мг; или от 17,00 мг до 18,00 мг; или от 18,00 мг до 19,00 мг; или от 19,00 мг до 20,00 мг; или
 5 от 20,00 мг до 21,00 мг; или от 21,00 мг до 22,00 мг; или от 22,00 мг до 23,00 мг; или от 23,00 мг до 24,00 мг; или от 24,00 мг до 25,00 мг; или от 25,00 мг до 26,00 мг; или от 26,00 мг до 27,00 мг; или от 27,00 мг до 28,00 мг; или от 28,00 мг до 29,00 мг; или от 29,00 мг до 30,00 мг; или от 30,00 мг до 31,00 мг; или от 31,00 мг до 32,00 мг; или от 32,00 мг до 33,00 мг; или от 33,00 мг до 34,00 мг; или от 34,00 мг до 35,00 мг; или от 35,00 мг до 36,00
 10 мг; или от 36,00 мг до 37,00 мг; или от 37,00 мг до 38,00 мг; или от 38,00 мг до 39,00 мг; или от 39,00 мг до 40,00 мг; или от 40,00 мг до 41,00 мг; или от 41,00 мг до 42,00 мг; или от 42,00 мг до 43,00 мг; или от 43,00 мг до 44,00 мг; или от 44,00 мг до 45,00 мг; или от 45,00 мг до 46,00 мг; или от 46,00 мг до 47,00 мг; или от 47,00 мг до 48,00 мг; или от 48,00 мг до 49,00 мг; или от 49,00 мг до 50,00 мг; или от 50,00 мг до 51,00 мг; или от 51,00 мг
 15 до 52,00 мг; или от 52,00 мг до 53,00 мг; или от 53,00 мг до 54,00 мг; или от 54,00 мг до 55,00 мг; или от 55,00 мг до 56,00 мг; или от 56,00 мг до 57,00 мг; или от 57,00 мг до 58,00 мг; или от 58,00 мг до 59,00 мг; или от 59,00 мг до 60,00 мг; или от 60,00 мг до 61,00 мг; или от 61,00 мг до 62,00 мг; или от 62,00 мг до 63,00 мг; или от 63,00 мг до 64,00 мг; или от 64,00 мг до 65,00 мг; или от 65,00 мг до 66,00 мг; или от 66,00 мг до 67,00 мг; или от
 20 67,00 мг до 68,00 мг; или от 68,00 мг до 69,00 мг; или от 69,00 мг до 70,00 мг; или от 70,00 мг до 71,00 мг; или от 71,00 мг до 72,00 мг; или от 72,00 мг до 73,00 мг; или от 73,00 мг до 74,00 мг; или от 74,00 мг до 75,00 мг; или от 75,00 мг до 76,00 мг; или от 76,00 мг до 77,00 мг; или от 77,00 мг до 78,00 мг; или от 78,00 мг до 79,00 мг; или от 79,00 мг до 80,00 мг; или от 80,00 мг до 81,00 мг; или от 81,00 мг до 82,00 мг; или от 82,00 мг до 83,00 мг;
 25 или от 83,00 мг до 84,00 мг; или от 84,00 мг до 85,00 мг; или от 85,00 мг до 86,00 мг; или от 86,00 мг до 87,00 мг; или от 87,00 мг до 88,00 мг; или от 88,00 мг до 89,00 мг; или от 89,00 мг до 90,00 мг; или от 90,00 мг до 91,00 мг; или от 91,00 мг до 92,00 мг; или от 92,00 мг до 93,00 мг; или от 93,00 мг до 94,00 мг; или от 94,00 мг до 95,00 мг; или от 95,00 мг до 96,00 мг; или от 96,00 мг до 97,00 мг; или от 97,00 мг до 98,00 мг; или от 98,00 мг до
 30 99,00 мг; или от 99,00 мг до 100,00 мг; или от 100,00 мг (0,10 г) до 0,20 г; или от 0,20 г до 0,30 г; или от 0,30 г до 0,40 г; или от 0,40 г до 0,50 г; или от 0,50 г до 0,60 г; или от 0,60 г до 0,70 г; или от 0,70 г до 0,80 г; или от 0,80 г до 0,90 г; или от 0,90 г до 1,00 г; или от 1,00 г до 1,10 г; или от 1,10 г до 1,20 г; или от 1,20 г до 1,30 г; или от 1,30 г до 1,40 г; или от 1,40 г до 1,50 г; или от 1,50 г до 1,60 г; или от 1,60 г до 1,70 г; или от 1,70 г до 1,80
 35 г; или от 1,80 г до 1,90 г; или от 1,90 г до 2,00 г; или от 2,00 г до 2,10 г; или от 2,10 г до 2,20 г; или от 2,20 г до 2,30 г; или от 2,30 г до 2,40 г; или от 2,40 г до 2,50 г; или от 2,50 г до 2,60 г; или от 2,60 г до 2,70 г; или от 2,70 г до 2,80 г; или от 2,80 г до 2,90 г; или от 2,90 г до 3,00 г; или от 3,00 г до 3,10 г; или от 3,10 г до 3,20 г; или от 3,20 г до 3,30 г; или от 3,30 г до 3,40 г; или от 3,40 г до 3,50 г; или от 3,50 г до 3,60 г; или от 3,60 г до 3,70 г;
 40 или от 3,70 г до 3,80 г; или от 3,80 г до 3,90 г; или от 3,90 г до 4,00 г; или от 4,00 г до 4,10 г; или от 4,20 г до 4,20 г; или от 4,20 г до 4,30 г; или от 4,30 г до 4,40 г; или от 4,40 г до 4,50 г; или от 4,50 г до 4,60 г; или от 4,60 г до 4,70 г; или от 4,70 г до 4,80 г; или от 4,80 г до 4,90 г; или от 4,90 г до 5,00 г.

В дополнительном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий
 45 фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное изобретение содержит или состоит из интактного антитела.

Термин "антитело" включает практически интактные молекулы антител, а также химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела (в которых

по меньшей мере одна аминокислота является видоизмененной относительно природных человеческих антител), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антител, легкие цепи антител, гомодимеры и гетеродимеры тяжелой и/или легкой цепей антител и антигенсвязывающие фрагменты и производные того же самого.

Термин 'антитело' также включает все классы антител, включая IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Таким образом, антитело может быть молекулой IgG, такой как молекула IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно, антитело изобретения является молекулой IgG или его антигенсвязывающим фрагментом или вариантом, «слитым белком» или производным.

В одном варианте осуществления способов применения, антител или способов изобретения антитело содержит или состоит из интактного антитела. Альтернативно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное, может в основном состоять из интактного антитела. Под выражением "в основном состоит из" мы имеем в виду, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант, «слитый белок» или его производное состоит из части интактного антитела, достаточной для того, чтобы проявить специфичность связывания в отношении ICAM-1.

В одном варианте осуществления способов применения, антител или способов изобретения антитело является антителом неприродного происхождения. Разумеется, когда антитело является антителом природного происхождения, оно предоставляется в изолированной форме (т.е. в форме, отличной от той, в которой оно встречается в природе).

В распознавании антигена участвуют переменные домены тяжелых (V_H) и легких (V_L) цепей антитела, этот факт был впервые признан в ранних экспериментах по расщеплению протеазами. Дальнейшее подтверждение было обнаружено при «гуманизации» антител грызунов. Переменные домены антител грызунов могут быть слиты с константными доменами антител человека так, что полученное в результате антитело сохраняет антигенную специфичность родительского антитела грызуна (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Из экспериментов по экспрессии в бактериях фрагментов антител, содержащих один или более переменных доменов, известно, что антигенная специфичность определяется переменными доменами и не зависит от константных доменов. Данные молекулы включают Fab-подобные молекулы (Better et al (1988) Science 240, 1041); молекулы Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); одноцепочечные молекулы Fv (ScFv), где V_H и V_L домены-партнеры соединены гибким олигопептидом (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) и антитела с одним доменом (dAbs), включающие изолированные V-домены (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Общий обзор методов, применяемых для синтеза фрагментов антител, которые включают их специфические участки связывания, можно найти в работе Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.1.

Таким образом, под "антигенсвязывающим фрагментом" мы имеем в виду функциональный фрагмент антитела, способный связываться с ICAM-1.

Примеры антигенсвязывающих фрагментов можно выбрать из группы, состоящей из Fv фрагментов (например, одноцепочечного Fv и дисульфид-связанного Fv), и Fab-подобных фрагментов (например, Fab фрагментов, Fab' фрагментов и F(ab)₂ фрагментов).

В одном варианте осуществления способов применения, антител или способов изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный Fv

(scFv) или дисульфид-связанный Fv.

Удобно, когда антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab' фрагмент или a F(ab)₂

Применение фрагментов антител, а не целых антител, имеет многократное преимущество. Меньший размер фрагментов может приводить к улучшенным фармакологическим свойствам, таким как лучшее проникновение в твердые ткани. Более того, антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, Fv, ScFv и dAb фрагменты антитела могут экспрессироваться в *E. coli* и секретируются бактериями, что дает возможность легко производить большие количества данных фрагментов.

Также в рамки изобретения включаются модифицированные варианты антител и их антигенсвязывающие фрагменты, например, модифицированные путем ковалентного присоединения полиэтиленгликоля или другого подходящего полимера.

Методы получения антител и фрагментов антител хорошо известны в данной области техники. Например, антитела можно получить с помощью любого из нескольких методов, использующих индукцию выработки молекул антител *in vivo* с проведением скрининга библиотек иммуноглобулинов (Orlandi. et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299), или путем производства молекул моноклональных антител линиями клеток в культуре. Это включает, без ограничения, метод гибридом, метод человеческой B-клеточной гибридомы и метод гибридомы с применением вируса Эпштейна-Барра (EBV) (Kohler et al., 1975. Nature 256:4950497; Kozbor et al., 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et al, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984. Mol. Cell. Biol 62:109-120).

Удобно, изобретение предоставляет антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное, при этом антитело представляет собой рекомбинантное антитело (т.е. антитело, полученное рекомбинантными способами).

В предпочтительном варианте осуществления применений, антител или способов изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело.

Подходящие моноклональные антитела к выбранным антигенам можно получить с помощью известных методов, например раскрытых в "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) и в "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982), которые включены в описание путем отсылки.

Фрагменты антител также можно получить с помощью методов, хорошо известных в данной области техники (см., например, Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, включенные в описание путем отсылки). Например, фрагменты антител для применения в методах и способах применения настоящего изобретения можно получить с помощью протеолитического гидролиза антитела или с помощью экспрессии в *E. coli* или клетках млекопитающих (например, в культуре овариальных клеток китайского хомячка или других системах, экспрессирующих белки) ДНК, кодирующей данный фрагмент. Альтернативно, фрагменты антител можно получить путем расщепления пепсином или папаином целых антител с помощью обычных методов.

Предпочтительно, изобретение предоставляет применение, способ, композицию или систему, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим антителом или гуманизированным антителом.

Специалистам в данной области техники ясно, что гуманизированные антитела могут применяться при лечении человека или при постановке диагноза. Гуманизированные

формы нечеловеческих (например, мышинных) антител являются генно-инженерными химерными антителами или фрагментами антител, имеющими минимальные участки, полученные от нечеловеческих антител. Гуманизированные антитела включают антитела, в которых гипервариабельные участки человеческого антитела (реципиентное антитело) заменяются остатками гипервариабельных участков видов, не являющихся человеком (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, имеющими желательную функциональность. В некоторых случаях Fv каркасные остатки человеческого антитела заменяются соответствующими нечеловеческими остатками. Гуманизированные антитела также могут содержать остатки, не обнаруженные ни в антителе реципиента, ни в импортированном гипервариабельном участке или каркасных последовательностях. В общем, гуманизированное антитело будет содержать практически все, по меньшей мере, один, а как правило два, вариабельных домена, в которых все или в основном все из гипервариабельных участков, соответствуют участкам нечеловеческого антитела и все, или в основном все, из каркасных участков, соответствуют участкам соответствующей человеческой консенсусной последовательности. Гуманизированные антитела оптимально также включают, по меньшей мере, часть константной области антитела, такой как Fc-участок, как правило, полученной из человеческого антитела (см., например, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op.Struct. Biol. 2:593-596, включенные в описание путем отсылки).

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны в данной области техники. Обычно гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеческим. Эти не являющиеся человеческими аминокислотные остатки, часто называемые заимствованными (импортированными) остатками, как правило, берут из заимствованного вариабельного домена. Гуманизация в основном может осуществляться, как описано (см., например, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536; US 4,816,567, включенные в описание путем отсылки), путем замены человеческих гипервариабельных участков соответствующими гипервариабельными участками грызунов. Соответственно, такие гуманизированные антитела являются химерными антителами, в которых значительно меньше, чем интактный человеческий вариабельный домен, заменяется соответствующей последовательностью из видов, не являющихся человеком. На практике гуманизированные антитела часто могут быть человеческими антителами, в которых некоторые остатки гипервариабельных участков и возможно некоторые каркасные участки заменяются остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

Человеческие антитела также могут быть идентифицированы при помощи разных методов, известных в данной области техники, включая библиотеки фаговых дисплеев (см., например, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al, 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al, 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp.77; Boerner et al, 1991, J. Immunol 147:86-95, Soderlind et al., 2000, Nat Biotechnol 18:852-6 и WO 98/32845, которые включены в описание путем отсылки).

После того, как подходящие антитела получены, их можно проверить на активность, например, специфичность связывания, или биологическую активность, например методом ELISA, методом иммуногистохимии, проточной цитометрии, иммунопреципитации, вестерн-блоттинга и т.д. Биологическую активность можно проверить, используя разные способы анализа, для получения данных, касающихся конкретного свойства.

Удобно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения содержит одну или более из следующих аминокислотных последовательностей (CDR участков):

FSNAWMSWVRQAPG	и/или
AFIWYDGSNKYYADSVKGR	и/или
ARYSGWYFDY	и/или
CTGSSSNIGAGYDVH	и/или
DNNNRPS	и/или
CQSYDSSLSAWL	

5

Альтернативно, антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один или более варибельных участков, показанных на фиг.15.

10

Термин 'аминокислота' при применении в описании включает двадцать стандартных генетически закодированных аминокислот и их соответствующие стереоизомеры в 'D' форме (по сравнению с природной 'L' формой), омега-аминокислоты, отличные от природных аминокислот, нестандартные аминокислоты (например, α,α -двузамещенные аминокислоты, N-алкил-аминокислоты и т.д.) и химически дериватизированные аминокислоты (смотри ниже).

15

В том случае, когда аминокислота специально перечисляется, например, 'аланин' или 'Ala' или 'A', термин относится и к L-аланину и к D-аланину, если точно не указано иначе. Другие нестандартные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидов настоящего изобретения, при условии, что полипептид сохраняет желательное функциональное свойство. В случае пептидов каждый кодированный аминокислотный остаток, если необходимо, предоставляется в виде однобуквенного обозначения, соответствующего обычному названию обычной аминокислоты.

20

В одном варианте осуществления полипептиды, как определено в описании, содержат или состоят из L-аминокислот.

25

Специалистам ясно, что способы и применения изобретения включают варианты, «слитые белки» и производные определенных полипептидов, а также «слитые белки» указанных вариантов или производных, такие предоставленные варианты, «слитые белки» и производные обладают специфичностью связывания с ICAM-1.

30

Варианты можно получить при помощи методов инженерии белков и сайт-направленного мутагенеза, хорошо известных в данной области техники, с применением рекомбинантных полинуклеотидов (см., например, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, которая включена в описание путем отсылки).

35

С помощью термина «слитый белок (слитая форма)» указанного полипептида мы включаем полипептид, сплавленный (соединенный, слитый) с любым другим полипептидом. Например, указанный полипептид может быть слитым с полипептидом, таким как глутатион-S-трансфераза (GST) или белок A, для того, чтобы способствовать очистке указанного полипептида. Примеры таких «слитых белков» хорошо известны специалистам в данной области техники. Аналогично, указанный полипептид может быть слитым с олиго-гистидиновым тагом, таким как His6, или с эпитопом, который распознается антителом, таким как хорошо известный эпитоп Мус-tag. «Слитые белки» с любым вариантом или производным указанного полипептида также включаются в рамки изобретения. Следует понимать, что предпочтительными являются «влитые белки» (или варианты или их производные), сохраняющие желательные свойства, такие как специфичность связывания с ICAM-1.

40

45

«Слитый белок» может содержать дополнительную часть, которая придает

желательное свойство указанному полипептиду изобретения; например, часть может быть полезна при обнаружении или изолировании полипептида, или оказывать содействие поглощению полипептида клеткой. Данная часть может представлять собой, например, фрагмент биотина, радиоактивную частицу, флуоресцентную частицу, например, небольшой флуорофор или флуорофор зеленого флуоресцентного белка (GFP), как хорошо известно специалистам в данной области техники. Это фрагмент (частица) может быть иммуногенной меткой (tag), например, Мус-tag, или может быть липофильной молекулой или полипептидным доменом, который способен оказывать содействие поглощению полипептида клеткой, как известно специалистам в данной области техники.

С помощью термина 'варианты' полипептида мы включаем вставки, делеции и замены, консервативные или неконсервативные. В частности, мы включаем варианты полипептида, в которых такие изменения не изменяют существенно активность указанного полипептида. В частности, мы включаем варианты полипептида, в которых такие изменения не изменяют существенно специфичность связывания для ICAM-1.

Вариант полипептида может иметь аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 75% идентичность с одной или более из аминокислотных последовательностей, приведенных выше, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с одной или более из аминокислотных последовательностей, указанных выше.

Процент идентичности последовательности между двумя полипептидами можно определить с помощью подходящих компьютерных программ, например, программы GAP группы генетических счетно-решающих вычислений Висконсинского университета, при этом следует принимать во внимание, что процент идентичности вычисляется в отношении полипептидов, последовательности которых оптимально выравнены.

Альтернативно, выравнивание может быть выполнено с помощью программы Clustal W (как описано в Thompson et al, 1994, Nuc. Acid Res. 22:4673-4680, включенной в описание путем отсылки).

Используемые параметры могут быть следующими:

- Параметры быстрого парного выравнивания: размер идентичного участка (К-кратный(слово) размер); 1, длина сегмента, включающего «наилучший выровненный сегмент» (размер окна); 5, штраф за открытие нового гэпа; 3, число непрерывно совпадающих к-плетов (top diagonals); 5. метод подсчета очков: x процент.

- Параметры множественного выравнивания: штраф за открытие делеции; 10, штраф за продолжение делеции; 0,05.

- Матрица: BLOSUM.

Альтернативно, для определения локальных линейных последовательностей можно использовать программу BESTFIT.

Полипептид, вариант, «слитый белок» или производное, использованное в способах или вариантах применения изобретения, может содержать одну или более аминокислот, которые модифицированы или дериватизированы.

Химические производные одной или более аминокислот можно получить при помощи реакции с боковыми функциональными группами. Такие дериватизированные молекулы включают, например, молекулы, в которых свободные аминогруппы дериватизированы с образованием амингидрохлоридов, р-толуол-сульфанильных групп, карбокси-бензоксигрупп, t-бутилоксикарбонильных групп, хлорацетильных групп или формильных групп. Свободные карбоксильные группы могут быть дериватизированы с образованием

солей, сложных метиловых и этиловых эфиров или других типов сложных эфиров и гидразидов. Свободные гидроксильные группы могут быть дериватизированы с образованием О-ацильных или О-алкильных производных. Также как химические производные включаются пептиды, содержащие природные аминокислотные производные двадцати стандартных аминокислот. Например: 4-гидроксипролин может заменить пролин; 5-гидроксилизин может заменить лизин; 3-метилгистидин может использоваться вместо гистидина; гомесерин может использоваться вместо серина, а орнитин вместо лизина. Производные также включают пептиды, содержащие одну или более «вставок» или делеций, при условии, что необходимая активность сохраняется.

Другими включенными модификациями являются амидирование, аминоконцевое ацилирование {например, ацетилирование или амидирование меркаптоуксусной кислоты}, карбоксиконцевое амидирование {например, с помощью аммиака или метиламина) и тому подобные концевые модификации.

Специалистам понятно, что также могут использоваться пептидомиметические соединения. Таким образом, с помощью термина 'полипептид' мы включаем пептидомиметические соединения, способные связываться с ICAM-1. Термин 'пептидомиметическое' относится к соединению, которое имитирует конформацию и желательные свойства отдельного пептида как терапевтического средства.

Например, полипептиды изобретения включают не только молекулы, в которых аминокислотные остатки соединяются пептидными (-CO-NH-) связями, но также молекулы, в которых пептидная связь является обращенной. Такие копирующие пептиды молекулы с обращенной связью (ретроэнантиомеры) могут быть созданы с помощью методов, известных в этой области техники, например методов, описанных в Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, которая включена в описание путем отсылки.

Данный подход включает создание псевдопептидов, содержащих изменения, затрагивающие остов, но не ориентацию боковых цепей. Пептиды-ретроэнантиомеры, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, являются намного более устойчивыми к протеолизу. Альтернативно, полипептид изобретения может быть пептидомиметическим соединением, в котором один или более аминокислотных остатков соединены связью - γ -(CH₂NH)- вместо обычной амидной связи.

В еще одном варианте пептидная связь может совсем отсутствовать при условии, что используется соответствующий линкерный участок, который фиксирует пространство между атомами углерода аминокислотных остатков; особенно предпочтительно, если линкерный участок обладает в основном тем же распределением заряда и в основном такой же планарностью, как и пептидная связь.

Понятно, что полипептид может быть блокирован на N- или C-конце, чтобы уменьшить чувствительность к экзопротеолитическому расщеплению.

Для модификации пептидов млекопитающих также используется целый ряд некодированных или модифицированных аминокислот, таких как D-аминокислоты и N-метил-аминокислоты. Кроме того, предполагаемую биоактивную конформацию можно стабилизировать с помощью ковалентной модификации, такой как циклизация, или путем введения лактама или других типов мостиков, например, см. Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 и Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 166, включенные в описание путем отсылки.

Общим вопросом стратегий синтеза является введение некоторых циклических фрагментов в каркас на основе пептида. Циклический фрагмент ограничивает конформационное пространство пептидной структуры, и это часто приводит к повышенной специфичности пептида по отношению к отдельному биологическому

рецептору. Дополнительным преимуществом этой стратегии является то, что введение циклического фрагмента в пептид также может давать в результате пептид, имеющий пониженную чувствительность к клеточным пептидазам.

Таким образом, типичные полипептиды, пригодные для методов и применения изобретения, содержат в качестве концевых аминокислот цистеин. Такой полипептид может существовать в гетеродетной циклической форме путем образования дисульфидной связи меркаптидных групп в концевых цистеинах или в гомодетной форме путем образования амидной пептидной связи между концевыми аминокислотами. Как указано выше, циклизируя небольшие пептиды через дисульфидные и амидные связи между N- и C-концами цистеинов, можно обойти проблемы, связанные со специфичностью и периодом полужизни, иногда наблюдаемые при применении линейных пептидов, путем уменьшения протеолиза, а также увеличения жесткости структуры, что может давать соединения с более высокой специфичностью. Полипептиды, циклизированные дисульфидными связями имеют свободные amino- и карбоксиконцы, которые все еще могут быть чувствительны к протеолитической деградации, тогда как пептиды, циклизированные образованием амидной связи между N-концевым амином и C-концевым карбоксилем, больше не содержат свободные amino- или карбоксиконцы. Таким образом, пептиды настоящего изобретения могут быть связаны или C-N связью или дисульфидной связью.

Настоящее изобретение не ограничивается каким-либо методом циклизации пептидов, однако рассматривает пептиды, циклическая структура которых может быть получена с помощью любых подходящих методов синтеза. Таким образом, гетеродетные связи могут включать, но не ограничиваются этим, образование через дисульфидные, алкиленовые или сульфидные мостики. Методы синтеза циклических гомодетных пептидов и циклических гетеродетных пептидов, включая дисульфидные, сульфидные и алкиленовые мостики, описаны в США 5,643,872, включенном в описание путем отсылки. Другие примеры методов циклизации обсуждаются и раскрываются в США 6,008,058, включенном в описание путем отсылки.

Дополнительным подходом к синтезу циклических устойчивых пептидомиметических соединений является замыкающий кольцо метатезис (RCM). Этот метод включает стадию синтеза пептидного предшественника и стадию контактирования его с катализатором RCM с получением конформационно ограниченного пептида. Подходящие предшественники пептида могут содержать две или более ненасыщенных C-C связи. Данный способ осуществляется с помощью твердофазного пептидного синтеза. В этом варианте осуществления предшественник, который закрепляется на твердой подложке, контактирует с катализатором RCM, а позже продукт отщепляется от твердой подложки с получением конформационно ограниченного пептида.

Другим подходом, раскрытым D. H. Rich в *Protease Inhibitors*, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986), включенной в описание путем отсылки, является создание пептидов-имитаторов путем применения переходного состояния аналогично принципу создания ингибиторов ферментов. Например, известно, что вторичный спирт of staline имитирует тетраэдрическое переходное состояние неустойчивой амидной связи субстрата пепсина.

Итак, концевые модификации используются, как хорошо известно, чтобы уменьшить чувствительность к расщеплению протеазами и, следовательно, удлинить период полужизни пептидов в растворах, в частности, в биологических жидкостях, где могут присутствовать протеазы. Циклизация полипептидов также является подходящей модификацией, благодаря устойчивым структурам, образованным циклизацией, и с точки зрения биологической активности, наблюдаемой у циклических пептидов.

Таким образом, в одном варианте осуществления полипептид, используемый в вариантах применения, методах, композициях и системах изобретения, является циклическим. Однако, в альтернативном варианте осуществления полипептид является линейным.

5 В предпочтительном варианте осуществления вариантов применения, антител или способов изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное способно специфически связываться с ICAM-1, расположенным на поверхности клетки и ингибировать и/или предотвращать пролиферацию этой клетки.

10 В альтернативном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное способно специфически связываться с ICAM-1, расположенным на поверхности клетки, и вызывать апоптоз этой клетки.

15 В альтернативном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное способно специфически связываться с ICAM-1, расположенным на поверхности клетки, и вызывать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность по отношению к этой клетке.

20 Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут доставляться с помощью инъекционной системы доставки лекарства с замедленным высвобождением. Эти системы специально разработаны для уменьшения частоты инъекций. Примером такой системы является Nutropin Depot, в которой рекомбинантный гормон роста человека (rhGH) инкапсулирован в биodeградируемые микросферы, медленно высвобождающие rhGH

25 после введения в течение продолжительного периода. Предпочтительно, доставка осуществляется внутримышечно (i.m.) и/или подкожно (s.c.) и/или внутривенно (i.v.).

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут вводиться с помощью имплантированного хирургическим путем устройства, которое высвобождает

30 лекарственное средство непосредственно в нужное место. Например, Vitrasert высвобождает ганцикловир прямо в глаз для лечения ретинита, вызванного цитомегаловирусом (CMV). При прямом применении этого токсичного агента в месте патологического процесса достигается эффективное лечение без значительных системных побочных эффектов лекарства.

35 Терапевтические системы с применением электропорации (ЕРТ) также могут использоваться для введения антитела, антигенсвязывающего фрагмента, и/или «слитые белки», производного или его вариантов, медикаментов и фармацевтических композиций изобретения. Данное устройство, доставляя импульсное электрическое поле к клеткам, увеличивает проницаемость клеточных мембран для лекарственного средства, что

40 приводит к значительному усилению внутриклеточной доставки лекарственного средства.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения также могут доставляться при помощи электро-вхождения (EI). EI происходит, когда небольшие частицы (до 30 микрон в

45 диаметре) на поверхности кожи испытывают действие электрических импульсов, идентичных или похожих на импульсы, использованные при электропорации. При EI эти частицы двигаются через роговой слой и в более глубокие слои кожи. Частицы могут быть нагружены или покрыты лекарственными средствами или генами или могут

просто действовать как "пули", которые делают поры в коже, через которые могут войти лекарственные средства.

Альтернативным способом доставки антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или «слитые белки», производного или его вариантов, и медикаментов изобретения является инъекционная термочувствительная система ReGel®. Ниже температуры тела ReGel представляет собой инжецируемую жидкость, тогда как при температуре тела она немедленно образует резервуар с гелем, который медленно разрушается и разлагается на известные, безопасные, биodeградируемые полимеры. Активное вещество доставляется в течение некоторого времени по мере того, как биополимеры разлагаются.

Кроме того, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут вводиться перорально. При этом используется естественный процесс перорального потребления витамина B₁₂ и/или витамина D организмом для совместной доставки белков и пептидов. При помощи (букв, въезжая верхом) системы поглощения витамина B₁₂ и/или витамина D антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут двигаться через кишечную стенку. Синтезированы комплексные соединения между аналогами витамина B₁₂ и/или аналогами витамина D и лекарственным средством, которые сохраняют значительную аффинность к внутреннему фактору (IF) у частей комплекса, имеющих отношение к витамину B₁₂/витамину D, а также значительную биоактивность активного вещества комплекса.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут быть введены в клетки с помощью "тройных пептидов". Это класс полипептидов, называемых пенетратинами, которые способны перемещаться и переносить гидрофильные соединения через плазматическую мембрану. Эта система предоставляет возможность прямого нацеливания олигопептидов на цитоплазму и ядро, причем может не иметь специфичности к типу клеток, но является высокоэффективной. См. Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87.

Предпочтительно, медикамент настоящего изобретения представляет собой стандартную лекарственную форму (единицу дозирования), содержащую суточную дозу или суточную субдозу или соответствующую долю активного ингредиента.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты и/или медикаменты изобретения в большинстве случаев вводятся перорально или любым парентеральным путем в виде фармацевтической композиции, содержащей активный ингредиент, необязательно в виде нетоксичной соли присоединения органической или неорганической кислоты или основания, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. В зависимости от заболевания и пациента, которого нужно лечить, а также способа введения, композиция может быть введена в разных дозах.

При лечении человека антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут вводиться отдельно, но в основном вводятся в смеси с подходящим фармацевтическим эксципиентом, разбавителем и носителем, выбранным с учетом предполагаемого способа введения и стандартной фармацевтической практики.

Например, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут быть введены перорально, заочно или подъязычно в виде таблеток, капсул, вагинальных суппозиториях, эликсиров, растворов или суспензий, которые могут содержать вкусовые

или красящие вещества, с целью немедленного, отсроченного или контролируемого высвобождения лекарства. Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения также могут вводиться с помощью интракавернозной инъекции.

5 Таблетки могут содержать такие эксципиенты, как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновной фосфат кальция и глицин, разрыхлители, такие как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный или маниоковый крахмал), натрия крахмалгликолят, кроскармеллоза натрия и некоторые комплексные силикаты, и гранулирующие и связующие вещества, такие как
10 поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), сахароза, желатин и гуммиарабик. Кроме того, могут включаться смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерил бегенат и тальк.

Твердые композиции подобного типа также могут использоваться в качестве
15 наполнителей в желатиновые капсулы. Предпочтительные, в этом отношении, эксципиенты включают лактозу, крахмал, целлюлозу, лактозу или полиэтиленгликоли с высоким молекулярным весом. Для получения водных суспензий и/или эликсиров, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, медикаменты и фармацевтические композиции изобретения могут
20 объединяться с различными подсластителями или вкусовыми добавками, красящими веществами или красителями, эмульгирующими и/или суспендирующими веществами и разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин, и их комбинациями.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или
25 его варианты и медикаменты изобретения также могут вводиться парентерально, например, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратекально (в полость позвоночного канала), интравентрикулярно (внутри желудочка головного мозга), внутригрудным, внутричерепным, внутримышечным и подкожным путем, или они могут быть введены методами вливания. Лучше всего их использовать в форме
30 стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество соли или глюкозы, для получения раствора изотонического по отношению к крови. Водные растворы должны быть забуференными (предпочтительно до значения pH от 3 до 9), по необходимости. Приготовление подходящих парентеральных композиций в стерильных условиях легко осуществляется
35 с помощью стандартных фармацевтических методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Медикаменты и фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, включают водные и безводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворы, приводящие композиции в изотоническое состояние по отношению
40 к крови назначенного реципиента; и водные и безводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие вещества и загустители. Медикаменты и фармацевтические композиции могут предоставляться в однократных и многократных контейнерах, например запаянных ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, которое требует только добавления
45 стерильного жидкого носителя, например воды для инъекции, непосредственно перед применением. Экстемпоральные (для немедленного применения) инъекционные растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения также могут применяться интраназально или с помощью ингаляции и могут быть удобно предоставлены в виде ингалятора с сухим порошком или аэрозольного спрея, представленного в виде контейнера под давлением, насоса, спрея или распылителя с применением подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, гидрофторалкана, такого как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134A3 или 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан (HFA 227EA3), углекислого газа или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением единица дозирования может определяться клапаном, предназначенным для доставки отмеренного количества. Контейнер под давлением, насос, спрей или распылитель могут содержать раствор или суспензию активного вещества, например, с применением смеси этанола и пропеллента в качестве растворителя, дополнительно включающий смазывающее вещество, например, сорбитан триолеат. Капсулы и картриджи (изготовленные, например, из желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе (аппарате для вдухания) могут быть созданы так, чтобы содержать порошкообразную смесь антитела, антигенсвязывающего фрагмента, и/или «слитые белки», производного или его вариантов изобретения, и подходящей порошковой основы, такой как лактоза и крахмал.

Составы в виде аэрозоля или сухого порошка предпочтительно составляются так, что каждая отмеряемая доза или "впрыскивание" доставляет пациенту эффективное количество средства или полинуклеотида изобретения. Понятно, что суммарная ежедневная доза аэрозоля будет варьировать от пациента к пациенту и может быть введена в виде одной дозы, или, более обычно, в виде нескольких доз в течение дня.

Альтернативно, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут вводиться в виде суппозиториев или пессариев, или их можно применять местно в виде лосьона, раствора, крема, геля, мази или присыпки. Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения также могут быть введены чрескожно, например, с помощью кожного пластыря. Они также могут вводиться окулярным путем, в частности при лечении глазных болезней.

Для офтальмологического применения антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут быть заключены в состав в виде микронизированных суспензий в изотоническом, с отрегулированным pH, стерильном солевом растворе, или, предпочтительно, в виде растворов в изотоническом, с отрегулированным pH, стерильном солевом растворе, необязательно в комбинации с консервантом, таким как хлорид бензалкония. Альтернативно, они могут быть составлены в виде мази, такой как вазелин.

Для местного применения на коже антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения могут быть заключены в состав в виде мази, включающей активное вещество, суспендированное или растворенное, например, в смеси одного или более следующих веществ: минерального масла, жидкого петролатума, белого (медицинского) вазелина, пропиленгликоля, полиоксиэтилен-полиоксипропиленового соединения, эмульгирующего воска и воды. Альтернативно, они могут быть составлены в виде подходящего лосьона или крема, суспендированного или растворенного, например, в смеси одного или более следующих веществ: минерального масла, сорбитан-моностеарата, полиэтиленгликоля, жидкого парафина, полисорбата 60, воска цетилового эфира, цетеарилового спирта, 2-октилдодеканола, бензилового спирта и воды.

Композиции, подходящие для местного применения в ротовой полости, включают таблетки для рассасывания, содержащие активный ингредиент на ароматизированной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагакантовой камеди; пастилки, содержащие активный ингредиент на инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

В целом, у человека пероральное или парентеральное введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента, и/или «слитые белки», производного или его вариантов, медикаментов и фармацевтических композиций изобретения является предпочтительным способом, будучи наиболее удобным.

При применении в ветеринарии антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и/или «слитый белок», производное или его варианты, и медикаменты изобретения вводятся в виде подходящих композиций в соответствии с обычной ветеринарной практикой, и ветеринарный врач будет определять режим дозирования и способ введения, наиболее подходящие для конкретного животного.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или его производное, как описано здесь, могут заключаться в состав, как описано в прилагаемых примерах.

Как обсуждалось выше, при введении согласно способам и вариантам применения изобретения, антитело и/или антигенсвязывающий фрагмент и/или вариант, «слитый белок», или производное, как определено в описании, способно вызывать апоптоз и/или направлять антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) против раковых и/или опухолевых клеток (таких как CD20-положительные и CD20 отрицательные раковые клетки множественной миеломы). В дополнение к этому, антитело и/или антигенсвязывающий фрагмент и/или вариант, «слитый белок» или производное способно связывать растворимую молекулу межклеточной адгезии 1 (sICAM-1), тем самым ингибируя ангиогенез, опосредованную адгезией клеток лекарственную резистентность и ускользание опухолевой клетки от иммунного надзора.

Приведенные примеры показывают, что определенное в описании антитело (названное антитело "B11", а также известное как BI-505) обладает значительной *in vivo* и *in vitro* противоопухолевой (противораковой) активностью при введении согласно способам и вариантам применения изобретения. В дополнение к его прямой активности в отношении миеломы, B11 также может ингибировать рост опухоли, побуждаемый ангиогенезом, и препятствовать ускользанию опухоли от иммунного надзора.

При применении в описании формы единственного числа ("a", "and" и "the") включают формы множественного числа, если контекст явно не диктует иначе. Таким образом, например, ссылка на "антитело" включает множество таких антител, а ссылка на "дозировку" включает ссылку на одну или более дозировок и их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники и так далее.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры демонстрируют различные аспекты изобретения. Следует понимать, что специфические антитела, использованные в примерах, служат для иллюстрации принципов изобретения и не ограничивают его рамки.

Приведенные далее примеры описаны со ссылкой на следующие фигуры:

Фигура 1 показывает, как новое ICAM-1-антитело, обладающее значительной противоопухолевой активностью против CD20-экспрессирующих опухолей *in vivo* определяют с помощью сочетания методов дифференциального биопэннинга и скрининга по способности вызывать программируемую клеточную смерть. (I)

Дифференциальный биоэссей антител, специфических к рецепторам, ассоциированным с опухолью. (II) Скрининг по способности вызывать программируемую клеточную смерть (PCD). (III) Идентификация мишени. (IV) Противоопухолевая активность *in vivo*.

Фигура 1 (I) показывает, как антитела со специфичностью к клеткам-мишеням В-лимфомы были извлечены с помощью метода конкурентного дифференциального биоэссея, при котором антигены клеток-мишеней в форме цельных клеток и избыток вычтенного клеточного антигена в форме мембранных везикул одновременно подвергаются взаимодействию с фаговой библиотекой наивных антител n-CoDeR®.

Фигура 1 (II) показывает, как высокопроизводительный скрининг программируемой клеточной смерти был использован для изолирования антител, индуцирующих PCD клеток множественной В-лимфомы. Клетки В-лимфомы культивировали в присутствии титрованных концентраций антител-кандидатов и при условиях сверхперекрестного сшивания в течение ночи, а апоптоз определяли после совместного окрашивания аннексином V-AF488 и пропидий йодидом при помощи проточной цитометрии. Фигура 1 (II) (i) показывает блеббинг мембран и проницаемость клеточной мембраны для макромолекул, типичные для клеток на стадии раннего и позднего апоптоза, соответственно, индуцированные функционально изолированными BI-505 антителами. Графики на фигуре 1 (II) (ii) показывают процент мертвых клеток, определенных как аннексин V-488-положительные.

Фигура 1 (III) показывает, как идентификация мишени проводилась на клетках В-лимфомы Raji или Ramos, клетки лизировали и осаждали иммунопреципитацией с полным человеческим IgG's, с последующей перекрестной сшивкой с протеин-А-сефарозой. Антитело-специфические полосы вырезали, подвергали расщеплению трипсином и анализировали с помощью MALDI-TOF. Отдельная полоса, осажденная иммунопреципитацией BI-505, была идентифицирована как ICAM-1. Установленную идентичность ICAM-1 подтверждали с помощью исследований по блокированию с молярным избытком вплоть до 50-кратного растворимого рекомбинантного ICAM-1 или VCAM. MFI (среднекратный прирост) BI-505 относительно PC-3 клеток был определен с помощью проточной цитометрии. Пунктирная линия показывает отрицательное контрольное антитело, а серая сплошная гистограмма представляет MFI BI-505 без предварительного блокирования. BI-505 был предварительно блокирован рекомбинантными VCAM или ICAM-1. Фигура 1 (III) (iii) показывает, что ELISA-чашки были покрыты рекомбинантными человеческими ICAM-1, ICAM-2 или ICAM-3, при этом связывание BI-505 с ICAM-1 было определено с помощью протокола люминисценции. Анти-ICAM-2 и α -ICAM-3 антитела использовали в качестве положительных контролей для обнаружения ICAM-2 и ICAM-3 соответственно. Фигура 1 (IV) показывает, что для дополнительного исследования терапевтического потенциала PCD-индуцирующих ICAM-1-антител, была оценена противоопухолевая активность BI-505 на *in vivo* моделях опухолей, при этом иммунодефицитным scid мышам прививали одну из двух хорошо охарактеризованных CD20-экспрессирующих опухолевых В-клеточных линий ARH-77 или Daudi.

Фигура 2: BI-505 показывает значительную эффективность против миеломы *in vivo* и активность на моделях ксенотрансплантатов миеломы SCID/ARH-77 и клеточной линии В-лимфомы Daudi.

Опухолевые клетки вводили подкожно в левый бок мышей линии SCID. Два раза в неделю мыши получали внутрибрюшинные инъекции BI-505, контрольных антител или ритуксимаба в дозах 20, 2 и/или 0,2 мг/кг, начиная с первого дня после перевивки опухолевых клеток. В одной группе было от 8 до 10 животных. (A) Объем опухоли в

зависимости от дозы антитела. (В) График кривой выживаемости, полученной по методу Каплана-Мейера, в зависимости от дозы антитела. (С) Экспрессия эпитопа, исследованная с помощью проточной цитометрии. Статистическая значимость была вычислена относительно лечения контрольным антителом с применением критерия

5 Крускала-Уоллиса (непараметрический ANOVA) вместе с критерием множественного сравнения Данна (объем опухоли) или логарифмическим ранговым критерием (выживаемость мышей) с помощью программного обеспечения Graphpad Instat или Prism, соответственно. Значения считались статистически значимыми при $*p<0,05$, $**p<0,01$ и $***p<0,001$.

10 Фигура 3: BI-505 показывает значительную *in vivo* эффективность против миеломы и активность на модели ксенотрансплантата миеломы SCID/ARH-77.

Опухолевые клетки вводили подкожно в левый бок мышей линии SCID. Два раза в неделю мыши получали внутривенные инъекции BI-505 в дозах 0,02-20 мг/кг, начиная с первого дня после перевивки опухолевых клеток. В одной группе было от 8

15 до 10 животных. (А) Объем опухоли в зависимости от дозы антитела. (В) График кривой выживаемости, полученной по методу Каплана-Мейера, в зависимости от дозы антитела. Статистическая значимость была вычислена относительно лечения контрольным антителом с применением критерия Крускала-Уоллиса (непараметрический ANOVA) вместе с критерием множественного сравнения Данна (объем опухоли) или

20 логарифмическим ранговым критерием (выживаемость мышей) с помощью программного обеспечения Graphpad Instat или Prism, соответственно. Значения считались статистически значимыми при $*p<0,05$, $**p<0,01$ и $***p<0,001$. Графики иллюстрируют репрезентативные эксперименты из нескольких выполненных. (С) Насыщение эпитопа BI-505 на клетках опухолевых линий в зависимости от концентрации BI-505. (D) Клетки

25 Daudi В-лимфомы инкубировали с BI-505 или контрольными антителами в присутствии перекрестно-сшивающих вторичных Fab'2 козьих античеловеческих Fc антител в течение 16 часов, и определяли индукцию гибели клеток после окрашивания клеток аннексии V/пропидий йодидом. Индукцию гибели клеток BI-505 наносили на график в зависимости от концентрации. Эксперименты выполняли в трех повторах, а каждый эксперимент

30 повторяли, по меньшей мере, пять раз. График представляет нормированные обобщенные данные, полученные из отдельных экспериментов ($n=5\times 3$). (Е) Образцы крови собирали в разные моменты времени во время эксперимента с ксенотрансплантатом *in vivo* и анализировали с помощью ELISA для определения минимальных уровней BI-505. Противоопухолевую активность *in vivo* наносили на

35 график в зависимости от минимальных концентраций BI-505 в сыворотке и подгоняли, используя log-log кривую с пятью параметрами и программное обеспечение XLfit. (F) Корреляция между противоопухолевой активностью *in vitro* и насыщением эпитопа BI-505. (G) Корреляция между противоопухолевой активностью *in vivo* и насыщением эпитопа BI-505.

40 Фигура 4 показывает, что у пациентов с множественной миеломой наблюдается значительная экспрессия эпитопа BI-505. (А) Характеристика пациентов с множественной миеломой и экспрессия эпитопа BI-505. (В) Эпитоп BI-505 на клетках миеломы в сравнении с нормальными В-клетками.

Фигура 5 показывает, что BI-505 обладает широкой и ICAM-1-зависимой

45 противомиеломной активностью *in vivo*.

Клетки миеломы NCI-H929, EJM, RPMI-8226 или OPM-2 вводили подкожно в левый бок мышей SCID в день 0. Лечение антителами 2 мг/кг BI-505 или контрольным IgG1 начинали в день 1 и продолжали с режимом введения два раза в неделю,

внутрибрюшинно. Мышей забивали, когда размер опухоли достигал предела по этическим соображениям. IgG B11 не оказывал влияния на рост опухоли у животных с привитой ICAM-1-негативной линией клеток OPM-2, показывая, что активность в отношении миеломы зависела от ICAM-1. (А) показывает данные одного из двух выполненных экспериментов (закрашенные круги показывают лечение BI-505, незакрашенные круги показывают контрольное лечение IgG1). (В) показывает объединенные и нормированные данные двух независимых экспериментов (n=8-10 животных на лечебную группу; закрашенные столбики показывают лечение BI-505, а незакрашенные столбики показывают контрольное лечение IgG1). Статистическая значимость была вычислена относительно лечения контрольным антителом с применением непараметрического анализа Манна-Уитни и программы Graph Pad Instat. Значения считались статистически значимыми при *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фигура 6: BI-505 оказывает защитное действие против запущенной экспериментальной множественной миеломы.

Клетки ARH-77 или RPMI-8226 внутривенно вводили мышам SCID. (А) Модель ARH-77. Животные получали внутривенные инъекции антител в дозе 2 мг/кг или бортезомиба (Велкейд) в дозе 0,5 мг/кг в Дни 7, 10, 13 и 16 (на графике показано стрелками). (В) Модель RPMI-8226. BI-505 или контрольные mAb вводили i.v. в дозе 2 мг/кг два раза в неделю в течение 8 недель, бортезомид - в дозе 1 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель, леналидомид - р.о. в дозе 2 мг/кг в течение 2 циклов, состоящих из 5 дней лечения и 2 дней «вымывания», мелфалан - i.v. в дозе 3 мг/кг один раз в неделю в течение 8 недель, и дексаметазон (DXH) в дозе 6 мг/кг/инъекцию 3 раза/неделю в течение 2 последовательных недель. В каждой лечебной группе было 6-10 мышей. Статистическая значимость была вычислена с применением программного обеспечения Log-rank Graphpad Prism и определена при ***p<0,001. (С) Для исследования уровня ICAM-1 на человеческих клетках были окрашены клетки из разных органов и пропущены (gated for) CD38+/mCD45-/BI-505+. Левая панель показывает процент BI-505 положительных клеток в популяции CD38+/mCD45, а правая панель среднее значение интенсивности флуоресценции положительных клеток.

Фигура 7 показывает, что BI-505 FcγR-связывающая способность коррелирует с in vitro и in vivo противоопухолевой активностью.

(А) Клетки ARH-77 вводили подкожно в левый бок мышам SCID (n=8 на группу). Мышей лечили разными изотипами BI-505 два раза в неделю. (В) Связывание изотипов BI-505 с разными рекомбинантными FcγRs определяли с помощью Biacore. BI-505 IgG1, но не IgG4 или N297Q-MyTaHT, показывал значительное связывание с мышинными FcγRIV, а ключевой Fc-рецептор вызывал Fc-опосредованную активность у мыши. (С) ADCC исследовали, используя натуральные клетки-киллеры в разных соотношениях в качестве эффекторных клеток, а клеточную линию В-лимфомы (CL-01) в качестве клеток-мишеней. Как и предполагалось, только BI-505 опосредовали FcγRIIIA-зависимую ADCC опухолевых клеток. (D) Наблюдалась корреляция между ADCC-активностью и противоопухолевой эффективностью, поскольку изотипы BI-505 связывали человеческий FcγRIIIA, ключевой человеческий ADCC-опосредующий рецептор, с разной аффинностью. (Е) Ткани ксенографта ARH-77 от леченых мышам окрашивали и проводили количественное определение F4/80-положительной площади, которая показывала, что инфильтрация макрофагами опухолевой ткани у мышам, леченых BI-505, была значительно выше, чем у мышам, леченых ритуксимабом, и леченых контрольным IgG мышам. Bar=40 мкм. Диаграмма показывает процент F4/80-положительной площади в проанализированных тканях. Статистическая значимость

была вычислена относительно лечения контрольным антителом с применением критерия Крускала-Уоллиса (непараметрический ANOVA) вместе с критерием множественного сравнения Данна. Значения считались статистически значимыми при $*p<0,05$, $**p<0,01$ и $***p<0,001$.

5 Фигура 8 показывает высокую эффективность и активность BI-505/IgG B11 по сравнению с ритуксимабом на моделях ксенотрансплантатов (A) ARH-77 и (B) Daudi.

Фигура 9 - иммуногистохимический анализ показывает, что и в опухолях, леченых BI-505 или ритуксимабом, и в контролях наблюдается экспрессия сходных и значительных количеств CD20 и эпитопов-мишеней ICAM-1-антитела.

10 Фигура 10 показывает (A) панели иммунофенотипического окрашивания клеток костного мозга при MM. (B) показывает результаты исследования с помощью проточной цитометрии, применяемой для отбора высокой экспрессии CD38, CD 138 и CD56 и потери CD45, подтверждающего моноклональную экспрессию. Экспрессия эпитопа B11 впоследствии была определена для пациентов #7 (+), #8 (++) и #10 (+++). (C) показывает
15 экспрессию эпитопа B11 в клетках миеломы пациента (1), после рецидива (2) и после последующего лечения рецидива (3).

Фигура 11 показывает почти идентичные значения EC_{50} для связывающей способности белка-мишени полученных BI-505-вариантов переключения изотипа.

20 Фигура 12 показывает, что апоптоз В-клеток, пролиферация Т-клеток, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и высвобождение цитокинов (в частности, TNF- α и IL-8) не были значительно затронуты лечением B11.

Фигура 13 показывает, что BI-505 значительно увеличивает выживаемость мышей с привитой диссеминированной MM по сравнению с контрольными мышами ($p<0,001$)
25 и по сравнению с четырьмя разными SOC видами терапии ($p<0,05$ по сравнению с ревлимидом или Велкейдом, $p<0,001$ по сравнению с дексаметазоном или алкераном). $N=6-10$ /в группе.

Фигура 14 показывает, что лечение мышей, привитых клетками диссеминированной MM, с помощью стандартов лечения не влияет ни на число клеток MM, экспрессирующих
30 ICAM-1 (A), ни на уровни экспрессии ICAM-1 (B).

Фигура 15 показывает последовательность нуклеотидов и аминокислотную последовательность вариабельной тяжелой (B11-VH) и вариабельной легкой (V11-VL) цепей антитела B11.

35 Пример 1. Материалы и методы, использованные в изобретении
Реактивы, клетки и животные

Несколько партий IgG₁ B11 или устойчиво экспрессировались из клеток CHO или транзигентно в клетках HEK293. IgG₄ B11 и 297Q B11 транзигентно экспрессировались в клетках HEK293. Контрольные антитела IgG₁CT17 или IgG₁FITC-8GA транзигентно
40 экспрессировались в клетках HEK293. Было обнаружено, что эндотоксин-уровни (endotoxin-levels) антител составляют $<0,1$ IU/мл, как было определено с помощью LAL-теста (теста с применением лизата амебоцитов). Ритуксимаб (Roche), бортезомиб (Janssen-Cilag), леналидомид (Celgene), мелфалан (GlaxoSmithKline) и дексаметазон (Mylan) были куплены у частных фармацевтических компаний (Lund, Швеция и Dijon, Франция).
45 Линии клеток ARH-77, RPMI-8226 и Daudi были получены от American Type Culture Collection (ATCC, Швеция), клеточные линии NCI-H929, EJ и OPM-2 были получены от Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Германия). Все клетки содержались в культуральной среде, рекомендованной поставщиком.

Ксенотрансплантацию клеток проводили, когда клетки достигали фазы логарифмического роста. Самки мышей линии scid на основе СТ. 17 были получены от Taconic, Дания, и использовались в исследованиях в возрасте 7-8 недель.

Эксперименты на животных проводились в соответствии с этическими нормами проведения экспериментов на животных и все процедуры с животными были проверены и утверждены местной комиссией по этике Lund/Malmö.

Исследование экспрессии ICAM-1 клетками множественной миеломы у пациента Пунктаты костного мозга от восемнадцати пациентов с множественной миеломой или родственными заболеваниями (плазмоцитомы, плазмноклеточный лейкоз, амилоидоз с образованием амилоида из легких цепей), обследованных в Отделении гематологии Университетского госпиталя Skånes в Лунде были исследованы с помощью проточной цитометрии с применением четырех панелей антител, распознающих плазматические клетки (см. пример 2), после получения информированного согласия и одобрения местного комитета по этике. Клинические данные были получены из медицинских карт пациентов (фиг.4А).

Исследование программируемой клеточной смерти (PCD)

Клетки-мишени высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 2×10^6 клеток/мл культуральной среды. Титрованные концентрации IgG₁ B11 или различных отрицательных и положительных контрольных антител были добавлены к клеткам, в отсутствие или в присутствии античеловеческого Fab фрагмента (Jackson ImmunoResearch) для перекрестного сшивания. Затем клетки инкубировали в течение 16 часов при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Клетки собирали и окрашивали аннексином V-488/ пропидий иодидом (Invitrogen, Швеция) и исследовали с помощью проточной цитометрии (FACS Calibur, BD Bioscience).

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) Лейкоцитную пленку от людей-доноров (заказанную через Blodcentralen, Лунд) использовали для выделения мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMCs), а потом NK-клеток. Коротко, компоненты периферической крови отделяли с помощью Ficoll Raque PLUS (Amersham Biosciences, Швеция) в пробирках LeucoSep (Greiner Bio-One). Фракцию PBMC удаляли и тщательно промывали в ледяном DPBS (Invitrogen) перед магнитным мечением и отделением популяции NK-клеток, используя наборы для изолирования положительных или отрицательных NK-клеток и колонки MACS LS (Milenyi Biotec). Чистоту полученных фракций NK-клеток исследовали с помощью проточной цитометрии после окрашивания α-CD56 антителами (BD Biosciences). Клетки-мишени собирали и инкубировали в среде с или без соответствующих антител (2 мкг/мл) в течение 60 мин на льду. После этого клетки промывали и ресуспендировали в холодной среде до разливания в FACS пробирки. Потом изолированные NK-клетки разводили в среде ADCC и разливали вместе с соответствующими покрытыми антителами клетками-мишенями при разных соотношениях эффектор/клетка-мишень (40:1, 20:1, 5:1 и 1:1). Все эксперименты были проведены по три раза. После завершения инкубации добавили краситель ToPo-Pro-3 и зерна для подсчета (Invitrogen), а клетки исследовали на проницаемость мембран, используя проточную цитометрию.

Комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC)

Клетки-мишени собирали и инкубировали в среде RPMI с антителами при 5 мкг/мл или при титрованных концентрациях в пределах 0,01-100 мкг/мл в течение 60 мин на льду. После этого клетки промыли и ресуспендировали в холодной среде до разливания в пробирки для проточной цитометрии. Обработку проводили в трех повторах. В

пробирки добавляли человеческую сыворотку, нормальную или инактивированную нагреванием (Sigma, Швеция), и инкубировали образцы в течение 2 час при 37°C. После завершения инкубации добавили краситель ToPo-Pro-3 до окончательной концентрации 0,3 мкМ, а клетки исследовали на проницаемость мембран, используя проточную

цитометрию.

Связывание изотипного варианта BI-505 с FcγR

His-меченые человеческие FcγRIIIa или мышиные FcγRIV были транзиентно экспрессированы в прикрепленных клетках HEK293E, очищены с помощью Ni-NTA хроматографии и охарактеризованы с помощью SDS-PAGE и/или Biacore. Измерение

поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили на приборе Biacore 3000. Козий α-человеческий-F(ab)'₂ F(ab)'₂ фрагмент (Jackson laboratories) был иммобилизован на чипе CM-5 с применением стандартного протокола присоединения амина. IgG₁ B11, IgG₄ B 11 или 297Q B 11 разбавили до 15 и 60 мкг/мл, соответственно, и добавляли на

поверхность при 10 мкл/мин в течение 3 минут. His-меченые человеческие FcγRIIIa или

мышиные FcγRIV предварительно инкубировали с α-HIS антителом (R&D Systems) при молярном отношении 2:1 перед добавлением на поверхность чипа, 30 мкл/мин, 1 минуту. После каждого цикла поверхность восстанавливали дважды с помощью глицинового буфера pH 1,7.

Рост опухоли

Подкожная прививка:

Мышей обезболивали смесью севофлурана и кислорода перед инокуляцией клеток миеломы, а затем и $1-5 \times 10^6$ клеток миеломы вводили подкожно в левый бок в объеме 100 мкл. Лечение внутрибрюшинными (i.p.) инъекциями антител начинали или на

следующий день после инокуляции (профилактическая модель) или когда опухоли

достигали размера приблизительно 100 мм^3 (модель лечения развитой болезни). Антитела вводили в PBS в общем объеме 200 мкл. В качестве контроля применяли лечение PBS или изотипическим контролем. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля и объемы опухолей вычисляли по формуле: ширина × длина × 0,52.

Животных забивали, когда размер опухоли достигал этического предела 1,5 см. Выживших мышей забивали максимум через 5 месяцев. Образцы крови, собранные из

полной вены, центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин, чтобы получить сыворотку, затем образцы хранили при -20°C. С целью иммуногистохимического исследования опухоли извлекали, кусочек замораживали и хранили при -85°C.

Диссеминированная модель множественной миеломы:

Антимиеломный эффект BI-505 проверили на диссеминированной модели множественной миеломы. Ранняя и развитая диссеминированная модель множественной миеломы была получена в Oncodesign, Dijon, Франция. Коротко: 1×10^6 (ранняя) или

5×10^6 (развитая) ARH-77 опухолевых клеток в 200 мкл RPMI 1640 вводили внутривенно (i.v.) в хвостовую вену самок мышей линии scid (день 0). Инъекции опухолевых клеток осуществляли в пределах от двадцати четырех до сорока восьми часов после облучения

всего тела мышей (1,8 Гр, ⁶⁰Co, INRA, BRETENNIERES). Лечение начинали на день 5 (RPMI-8226 модель) или день 7 (ARG-77 модель), за исключением алкерана, который

вводили на день 10. B11 или контрольные mAb вводили i.v. в дозе 2 мг/кг два раза в

неделю в течение 8 недель, бортезомиб - в дозе 1 мг/кг, один раз в неделю в течение 8 недель, леналидомид - р.о. в дозе 2 мг/кг в течение 2 циклов, состоящих из 5 дней лечения и 2 дней «вымывания», мелфалан - i.v. в дозе 3 мг/кг, один раз в неделю в течение 8

недель и дексаметазон - в дозе 6 мг/кг вводили в течение 2 последовательных недель.

Статистический анализ

Статистический анализ ингибирования роста опухоли вычисляли относительно лечения контрольными антителами с применением критерия Крускала-Уоллиса (непараметрический ANOVA) вместе с критерием множественного сравнения Данна или с применением непараметрического анализа Манна-Уитни, как изложено в подписях к фигурам. Статистический анализ выживаемости мышей, опосредованной антителом, проводили с помощью Log-rank теста и программного обеспечения Graphpad Prism. Значения считались статистически значимыми при $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ $***=p<0,001$.

Пример 2. Новое антитело к ICAM-1, изолированное в результате сочетания методов дифференциального биоэссенинга и скрининга по способности индуцировать программируемую клеточную смерть, обладает конкурентной противоопухолевой активностью в отношении опухолей, экспрессирующих CD20, *in vivo*

Мы применили дифференциальный биоэссенинг и высокопроизводительный скрининг программируемой клеточной смерти (смотри пример 1), чтобы изолировать антитела, индуцирующие программируемую клеточную смерть (PCD) клеток множественной В-лимфомы, нацеленные на различные опухолевые клетки, связанные с поверхностными рецепторами, из *in vitro* CDR-«перетасованной» наивной библиотеки антител человека n-CoDeR (Bioinvent), как суммировано на фигуре 1. Среди изолированных антител мы установили специфичные к ICAM-1 - рецептору, который раньше не связывали с антитело-индуцированной PCD опухолевых клеток. Анти-ICAM-1 антитела индуцировали PCD и в CD20-экспрессирующих и в CD20-негативных линиях опухолевых клеток, указывая на широкую терапевтическую применимость. Высокая специфичность IgG B11 по отношению к ICAM-1 и дозозависимая индукция PCD в Daudi клетках лимфомы, экспрессирующих ICAM-1, показана на фиг.1.

Для того чтобы дополнительно исследовать терапевтический потенциал PCD-индуцирующих антител к ICAM-1, мы оценили противоопухолевую активность *in vivo* IgG B11 на моделях опухолей, включая иммунодефицитных мышей линии scid, которым была привита одна из двух хорошо охарактеризованных CD20-экспрессирующих злокачественных линий В-клеток; ARH-77 или Daudi (фиг.1, панель IV). Эти линии клеток широко используются для изучения и характеристики эффективности и активности лекарственных средств на разных моделях множественной миеломы (24-48) и неходжкинской лимфомы (49, 50), соответственно. Обе линии клеток экспрессируют антиген CD20, что делает возможным сравнение противоопухолевой эффективности и активности с клинически утвержденным CD20-специфичным антителом, ритуксимабом.

Подкожное введение клеток ARH-77 приводило к быстрой приживаемости и росту опухолевых клеток у мышей линии scid, при этом опухоли становились легко пальпируемыми между двенадцатым и четырнадцатым днями после инъекции опухолевых клеток. Было показано, что инъекции IgG B11 два раза в неделю в дозе 20 мг/кг, начиная с первого дня после инокуляции опухолевых клеток, полностью предотвращают рост опухоли у мышей с ксенотрансплантатом (фиг.2А, левая панель). CD20-специфическое положительное контрольное mAb ритуксимаб также обладает значительной противоопухолевой активностью, хотя и является менее эффективным по сравнению с IgG B11. Более того, IgG B11 обеспечивает полную выживаемость, даже при введении в 10-кратно меньшей дозе (2 мг/кг) по сравнению с ритуксимабом (фиг.2А и В, левая панель). Следовательно, на этой агрессивной злокачественной модели CD20-положительной В-клеточной опухоли IgG B11 обладал более эффективной и более сильной противоопухолевой активностью и обеспечивал лучшую выживаемость по

сравнению с ритуксимабом.

Далее мы исследовали противоопухолевую активность IgG B11 *in vivo* против ксенотрансплантатов неходжкинской лимфомы на клетках Daudi. На этой модели IgG B11 значительно и с равной эффективностью по сравнению с ритуксимабом

5 предотвращал рост опухоли и продлевал выживаемость мышей-опухоленосителей (фиг.2А и В, правая панель). Повышенная противоопухолевая активность IgG B11 не была результатом того, что опухолевые клетки экспрессировали большее количество

10 эпитопов для B11 по сравнению с ритуксимабом. Наоборот, исследование с помощью проточной цитометрии подтвердило, что клетки и ARH-77 и Daudi экспрессировали значительно меньше эпитопов ICAM-1 по сравнению с ритуксимабом. (фиг.2С левая и правая панели) Эти результаты показали, что IgG B11 обладает значительной

противоопухолевой активностью *in vivo* против двух хорошо охарактеризованных CD20-экспрессирующих линий опухолевых клеток.

Далее был проведен эксперимент по титрованию дозы с целью установления *in vivo*

15 активности IgG B11 и минимальной дозы, при которой достигается максимальная противоопухолевая активность на модельной системе scid/ARH-77. IgG B11 показало титруемую противоопухолевую активность, которая имела вид сигмоидальной кривой и пик при дозе 2 мг/кг и сохранялась почти максимальной при дозе 0,2 мг/кг (фиг.3А). Минимальные концентрации мышинных сывороточных антител были определены

20 методом ELISA в конце проведения экспериментов. Затем минимальные концентрации антител наносили на график против процента максимальной противоопухолевой активности *in vivo* и против процента максимального связывания с ICAM-1 рецепторами и PCD опухолевых клеток при соответствующих концентрациях антител *in vitro* (фиг.3С, 3D, 3Е, 3F и 3G). Удивительно, что наблюдалась почти линейная корреляция между

25 концентрацией антител и связыванием рецепторов на опухолевой клетке *in vitro*, PCD опухолевых клеток *in vitro* и противоопухолевой активностью *in vivo*, что согласуется с ICAM-1 - зависимой прямой клеточной цитотоксичностью, лежащей в основе противоопухолевой активности *in vivo*.

Высокая эффективность и активность IgG B11 была подтверждена на аналогичной,

30 но более развитой модели ксенотрансплантата scid/ARH-77 (фиг.8А). Мышей линии Scid с пальпируемыми опухолями ARH-77 лечили разными дозами IgG B11, ритуксимаба или контрольных антител. На этой модели ритуксимаб был неспособен уменьшить рост опухоли или увеличить выживаемость животных ($p > 0,05$). В противоположность

35 этому, IgG B11 существенно предотвращал рост опухоли и продлевал выживаемость животных (фиг.8А) по сравнению с лечением ритуксимабом, даже при введении в 100 раз меньшей дозы (0,2 мг/кг). Отсутствие противоопухолевого эффекта ритуксимаба на модели развитой опухоли не было результатом «ускользания» опухоли или подавления экспрессии антигена. Иммуногистохимический анализ опухолевой ткани

40 от мышей, леченых антителом, и контрольных мышей при завершении проведения экспериментов показал, что опухоли экспрессировали сходные и значительные количества CD20 и ICAM-1 эпитопов-мишеней для антител на всем протяжении проведения экспериментов (фиг.9).

Пример 3. ICAM-1 и эпитоп B11 широко экспрессируются при лимфопролиферативных заболеваниях, включая множественную миелому

45 Высокая эффективность и сильная противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo* ICAM-1 B11 IgG побудила нас дать оценку в полном объеме ICAM-1-экспрессии при различных лимфопролиферативных заболеваниях. Во-первых, была определена экспрессия ICAM-1 при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL), фолликулярно-

клеточной лимфоме (FCL), лимфоме из клеток мантии (MCL) и В-крупноклеточной диффузной лимфоме (DLBCL) с помощью микронабора для проведения иммуногистохимических анализов тканей (таблица 1).

Экспрессия ICAM-1 в лимфоме МТА (материал, переданный на изучение)

Таблица 1.				
Экспрессия ICAM-1 в лимфоме				
	CLL	FCL	MCL	DLCL
Ткань, экспрессирующая ICAM-1	27% (9/33)	95% (40/42)	89% (8/9)	98% (47/48)
% положительных клеток в положительной ткани	23	56	23	81
Относит. интенсивность Шкала 0-3	0,8	1,4	1,0	1,3

ICAM-1 был экспрессирован в 27% клеток при CLL, 95% при FCL, 89% при MCL и 98% при DLBCL с интенсивностью от средней до сильной по сравнению с положительной контрольной тканью небной миндалины (таблица 1).

Предыдущие сообщения описывали сильную связь ICAM-1 с прогрессированием множественной миеломы, при этом ICAM-1 высоко экспрессировался при миеломе как таковой, а также наблюдалось повышение его экспрессии при прогрессирующей болезни и у пациентов с множественной миеломой (ММ), устойчивой к химиотерапии (14, 22, 51).

С учетом этих наблюдений, мы оценили экспрессию эпитопа ICAM-1 B11 на клетках костного мозга у пациентов с множественной миеломой и родственными заболеваниями (плазмочитомой, плазмоклеточным лейкозом, амилоидозом с образованием амилоида из легких цепей) с помощью проточной цитометрии (фиг.4). Миеломные клетки идентифицировали, исходя из экспрессии CD38/CD138/CD45 и CD56, в соответствии с руководством European Network по многопараметрической проточной цитометрии при множественной миеломе (Rawstron et al Haematologica (2008), 93, pp431-8).

Панели окрашивания при проведении проточной цитометрии

Пунктаты костного мозга приблизительно 5-7 мл брали из подвздошного гребня при местном обезболивании (10 мл ксилокаина) методом, принятым в отделении гематологии университетской клиники Skanes. Эритроциты отделяли от клеток мозга с помощью FACSlysis (Becton Dickinson, Stockholm, Швеция) в соответствии с инструкциями производителей, а потом окрашивали с помощью четырех панелей антител, как показано в таблице А (фиг.10). На панели 4 окрашивание поверхности сопровождалось пермеабиллизацией с Perm Fix, BD и внутренним окрашиванием против каппа и лямбда легкой цепи, чтобы подтвердить моноклональность клеток множественной миеломы.

Исследование миеломных клеток в костном мозге пациентов с множественной миеломой

Окрашенные клетки костного мозга исследовали с помощью проточной цитометрии с применением FACS Canto II (фиг.10B). Миеломные клетки отбирали, исходя из высокой экспрессии CD 138 и CD38, и дополнительно подтверждали по высокой CD56 экспрессии и отсутствию CD45. Кроме того, внутриклеточное окрашивание использовали для подтверждения моноклональной экспрессии с помощью каппа и лямбда окрашивания. Экспрессию эпитопа B11 распределили, как показано на гистограмме (справа), с помощью (+), (++) и (+++), в соответствии с пациентами #8, #7 и #10. ВП -негативные клетки (-) - это клетки от пациента #8 (фиг.10B).

Экспрессия эпитопа ВП на миеломных клетках во время прогрессирования болезни у пациента с множественной миеломой

Плазматические клетки костного мозга были взяты при установлении диагноза (костный мозг №1) у мужчины 79 лет с множественной миеломой. Лечение начали с назначения мелфалана перорально и дексаметазона в прерывистом режиме (шесть циклов) в сочетании с талидомидом (непрерывно) с хорошим ответом. Однако через два месяца после окончания лечения у пациента наблюдался рецидив (костный мозг №2). На этот раз пациент получил два цикла циклофосфида и дексаметазон в прерывистом режиме с последующей новой оценкой костного мозга (костный мозг №3). Среднее значение экспрессии BI-505 на миеломных клетках повысилось в два раза после первого рецидива (правая гистограмма) (фиг.10).

У всех пациентов с миеломой наблюдалась экспрессия эпитопа ICAM-1 B11 на миеломных клетках. В основном, уровень экспрессии ICAM-1 B11 был очень высоким на миеломных клетках, со средними уровнями экспрессии в 17 раз выше по сравнению с нормальными В-клетками (фиг.4). Кроме того, эпитоп ICAM-1 B11, по-видимому, также был высоко экспрессирован на миеломных клетках у пациентов с рецидивом, которые получали несколько отличное лечение.

Мы сделали заключение, что ICAM-1 сильно экспрессируется при некоторых лимфопролиферативных заболеваниях, включая FCL и DLBCL, и что эпитоп ICAM-1 B11 сильно экспрессируется плазматическими клетками при множественной миеломе.

Пример 4. IgG B11 обладает широкой антимиеломной активностью *in vivo* Исходя из наблюдаемой высокой экспрессии эпитопа B11 при множественной миеломе, ранее сообщенной связи ICAM-1 с множественной миеломой и резистентностью к доступному в настоящее время лечению и бесспорно значительной *in vivo* противоопухолевой активности B11 против CD20-экспрессирующих злокачественных В-клеточных опухолей, мы приступили к оценке антимиеломной активности IgG B11 *in vivo* на моделях scid/ксенотрансплантатов, включая четыре разные хорошо охарактеризованные линии клеток множественной миеломы. Эти линии клеток экспрессировали маркеры миеломы CD38 и CD 13 8, но не экспрессировали CD20. Введение два раза в неделю IgG B11 в дозе 2 мг/кг уменьшало рост миеломы у мышей с ксенотрансплантатом ICAM-1-экспрессирующих клеточных линий EJM, RPMI-8226 и NCI-H929 на 98%, 96% и 99%, соответственно (фиг.5A и B, $p_{EJM} < 0,000009$, $p_{RPMI-8226} < 0,0037$, $p_{NCI-H929} < 0,0002$). В противоположность этому, IgG B11 не влиял на рост опухоли у мышей с привитой ICAM-1 -негативной линией клеток OPM-2 (фиг.5A и B, $p_{OPM-2} > 0,05$). Взятые в совокупности, эти исследования показали высоко эффективную широкую и ICAM-1-зависимую антимиеломную активность IgG B11 *in vivo*.

Пример 5. Применение IgG B11 ведет к повышению выживаемости по сравнению с используемым в настоящее время лечением на диссеминированных экспериментальных моделях развитой множественной миеломы

Диссеминированная модель scid/ARH-77 является общепринятой экспериментальной моделью, которая имеет сходство с человеческой прогрессирующей множественной миеломой и ее проявлением во многих отношениях (33). Мы использовали эту модель, чтобы дополнительно охарактеризовать антимиеломную активность IgG B 11 (фиг.6A).

Как было показано ранее, внутривенное введение мышам линии scid 1×10^6 клеток ARH-77 приводит к их распространению и «укоренению» в костном мозге мышей, давая в результате остеолитические повреждения костей и гиперкальциемию, и в конечном итоге, паралич животного или затрудненность дыхания (при этом животных немедленно забивают).

Начиная с семи дней после *i.v.* инъекции клеток миеломы, животных четыре раза

последовательно обработали ингибитором протеосом бортезомибом ("Велкейд"), IgG B11, контрольным IgG или физраствором. Через 22 дня после инъекции опухолевых клеток у животных, которых лечили контролем, наблюдалась или значительная потеря веса (>15% в течение трех дней) или паралич, таких животных забивали (фиг.6А). У животных, леченых контролем, постепенно развивались симптомы множественной миеломы, и они не выживали дольше 39 дней после введения опухолевых клеток. Лечение ингибитором протеосом бортезомибом (Велкейд) незначительно задерживало начало болезни и не увеличивало значительно выживаемость животных по сравнению с лечением контролем (p_{VZB} против физраствора <0,554, p_{VZB} против контроля IgG <0,2509). В противоположность этому, лечение IgG B11 показало значительный противоопухолевый эффект и удвоение времени до проявляющегося клинически начала болезни и увеличенное среднее время выживаемости по сравнению с лечением контролем или Велкейдом (p_{VZB} против физраствора <0,0001, p_{VZB} против контроля IgG <0,0001). Эти значения p показывают статистически значимые различия в выживаемости животных между вариантами лечения.

Антимиеломную активность IgG B11 по сравнению с используемым в настоящее время лечением дополнительно исследовали на аналогичной модели развитой диссеминированной множественной миеломы с миеломными клетками RPMI-8226 (фиг.6В). На этой модели лечение IgG B11 значительно увеличивало выживаемость и задерживало начало болезни по сравнению с лечением бортезомибом и по сравнению с лечением дексаметазоном, оба лекарства вводили в клинически релевантных дозах, показывающих максимальную *in vivo* терапевтическую эффективность еще без видимой токсичности. Кроме того, наблюдалась тенденция к улучшенной выживаемости у мышей, леченых IgG B 11, по сравнению с мышами, которых лечили иммуномодулирующим препаратом ревлимидом.

Для изучения уровня ICAM-1 на клетках человека клетки из различных органов окрасили и пропустили в области (gated for) CD38+/mCD45-/BI-505+. Фигура 6С показывает процен BI-505-положительных клеток в популяции CD38+/mCD45 и среднюю интенсивность флуоресценции положительных клеток.

Обнаружение экспрессии ICAM-1 на клетках миеломы

При умерщвлении животных брали органы для FACS-анализа, а клетки из тканей готовили механическим разделением и ферментативным расщеплением дипазой/коллагеназой (Gibco, Франция). Клетки окрашивали античеловеческими CD38 антителами (PerCP-Cy5, Becton Dickinson), антимышиными CD45 (PE, Becton Dickinson) и человеческим ICAM-1 (BI-505 IgC1 AF647, BioInvent) и инкубировали в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре. После инкубирования клетки дважды промыли и анализировали флуоресценцию поверхности клеток с помощью проточного цитометра (LSRII) в центре исследований университета Бургундии.

Пример 6. Противоопухолевая активность IgG B11 *in vivo* и *in vitro* является Fc-зависимой и коррелирует со связыванием с мышиными и человеческими Fc-гамма-рецепторами

Предыдущие исследования продемонстрировали свойство IgG B11 вызывать PCD на широкой панели злокачественных В-клеточных линий (10). Однако, их способность вовлекать эффекторные клеточные механизмы не была ранее исследована. Принимая во внимание сильную и эффективную противоопухолевую активность B11 IgG *in vivo* и особую важность FcγR-опосредованных противоопухолевых механизмов для клинической и терапевтической *in vivo* активности клинически проверенных противоопухолевых mAbs, включая ритуксимаб (52) (53) (54), мы далее рассмотрели

вклад антитело-Fc: хозяин FcγR-зависимых механизмов для терапевтической активности IgG B 11.

С этой целью мы получили варианты переключения изотипа человеческого IgG1, IgG4 и FcγR-связанного дефицитного мутантного IgG1 (N297Q IgG1) с подтвержденным дифференциальным сродством к человеческому FcγRs (55) и характерным свойством осуществлять противоопухолевую активность, зависимую от человеческого FcγR (56), и исследовали их терапевтическую эффективность *in vivo* в зависимости от их FcγR-свойств связывания. Сохраненная аффинность к антигенам-мишеням полученных вариантов переключения изотипа была продемонстрирована их почти идентичными значениями EC₅₀ для связывания с рекомбинантным или экспрессированным на поверхности клетки белком-мишенью (фиг.11).

Удивительно, что противоопухолевая активность вариантов переключения изотипа IgG B11 полностью коррелировала со связыванием с m FcγRIV- структурный и функциональный гомолог человеческого FcγRIIIa и основное мышиное FcγR-предоставляющее (*conferring*) антитело опосредовали клеточную цитотоксичность *in vivo*, которая увеличивалась в порядке IgG1_{N297Q}<IgG4<IgG1 (фиг.7А и В верхняя панель). Важно отметить, что мыши, которых лечили IgG₁, IgG₄, или IgG_{1N297Q} вариантом антител B 11 имели одинаковые титры сывороточных антител в конце проведения экспериментов (таблица 2), показывая, что различные варианты антител имели сходное время полужизни *in vivo*, и что разная противоопухолевая активность не является результатом различий в фармакокинетике.

Таблица 2.

Титр сывороточных антител у мышей, леченых IgG1, IgG4 или N297Q-мутантом.

In vivo IgG уровни (мкг/мл)			
Доза (мг/кг)	IgG1	IgG4	N297Q-мутант
2	20±2,9	13±3,1	9,6±3.
0,2	1,2±0,4	NDA	NDA
0,02	0,06±0,02	NDA	NDA

NDA=нет данных

Более того, иммуногистохимические исследования опухолевой ткани продемонстрировали массивный приток F4/80⁺ эффекторных клеток хозяина у мышей, леченых IgG B11, по сравнению с мышами, которых лечили контрольным IgG, и нелечеными мышами, и что интересно, по сравнению с мышами, которых лечили ритуксимабом (фиг.7Е). Эти результаты показывают, что Fc:FcγR-зависимые, опосредованные эффекторными клетками хозяина механизмы значительно способствуют IgG B11 противоопухолевой активности *in vivo*.

Для подтверждения роли Fc:FcγR-зависимых механизмов в противоопухолевой активности IgG B11 мы проверили их способность опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) человеческих опухолевых клеток-мишеней. Как и предполагалось, IgG B11 IgG₁ связывался с человеческим FcγRIIIa и опосредовал ADCC опухолевых клеток-мишеней в присутствии человеческих эффекторных клеток - натуральных киллеров (фиг.7С.) В противоположность этому, B11 IgG₄ и IgG1_{N297Q} варианты не связывались с человеческим FcγRIIIa и не опосредовали ADCC опухолевых клеток-мишеней. Аналогично ситуации *in vivo*, IgG B11 опосредовал ADCC *in vitro*, был Fc-зависимым и коррелировал со связыванием с основным человеческим ADCC-опосредующим рецептором FcγRIIIa (фиг.7D). Противоопухолевая Fc-зависимая активность mAb может, кроме Fc:FcγR-зависимых противоопухолевых

механизмов, быть результатом активации каскада реакций комплемента с помощью так называемой комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Следовательно, мы проверили способность IgG B11 индуцировать CDC на панели ICAM-1-экспрессирующих линий опухолевых клеток. IgG B11 не индуцирует CDC ни в одной из проверенных

5 линий опухолевых клеток. В противоположность этому и как описано ранее, лечение положительным контролем (ритуксимабом) эффективно вызывало CDC (57-59).

Пример 7. IgG B11 не является цитотоксичным в отношении нормальных клеток, экспрессирующих ICAM-1 *in vitro*

При нормальных физиологических условиях ICAM-1 конститутивно экспрессируется

10 на низких уровнях на эндотелии сосудов, эпителиальных клетках, фибробластах, кератиноцитах, лейкоцитах, а также на обычных антигенпрезентирующих клетках (APC) (60). Однако экспрессия ICAM-1 стимулируется некоторыми цитокинами и провоспалительными агентами, включая IFN- γ , TNF- α , липополисахарид (LPS), кислородными радикалами и гипоксией, вызванной травмой или воспалительными

15 ответами (60, 61), что вызывает проблемы безопасности, связанные с лечением анти-ICAM-1 антителом подобным IgG B11.

Основываясь на подтвержденной способности IgG B11 вызывать программируемую клеточную смерть и ADCC злокачественных В-клеток и предполагаемой общей негативной роли в отношении активации комплемента с учетом переносимости антитела

20 Lim et al (2010 Haematologica 95, ppl35-143), мы проверили индукцию программируемой клеточной смерти, ADCC или CDC эффектов IgG B11 в ICAM-1-экспрессирующих нормальных (нетрансформированных) В-клетках периферической крови человека и эндотелиальных клетках (фиг.12). В то время как В-клетки периферической крови и наивные В-клетки показали низкую эндогенную экспрессию ICAM-1, эндотелиальные

25 клетки пупочной вены человека (HUVES) и эндотелиальные клетки микрососудов кожи человека (HMVEC) показали значительную экспрессию ICAM-1, которая дополнительно повышалась в ответ на стимуляцию IFN- γ , как определено с помощью проточной цитометрии.

Однако IgG B11 не индуцировал PCD ни в одном из проверенных покоящихся или

30 активированных нормальных ICAM-1-экспрессирующих типов клеток (фиг.12). В противоположность этому и как ожидалось, обработка эндотелиальных клеток паклитакселом и обработка В-клеток положительными контрольными анти-HLA-DR или анти-CD20 антителами индуцировала программируемую клеточную смерть эндотелиальных клеток и В-клеток, соответственно. Подобным образом, IgG B11 не

35 вызывал ADCC или CDC клеток HUVES, HMVEC или В-клеток периферической крови (фиг.12).

Пример 8. IgG B11 не модулирует высвобождение цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови человека (PBMC) или пролиферацию Т-клеток *in vitro*

Затем мы оценили эффекты IgG B11 на высвобождение цитокинов PBMC и

40 пролиферацию клеток. Для того, чтобы увеличить до предела возможность установления каких-либо PBMC агонистических свойств IgG B11, мы использовали два разных протокола покрытия антитела, когда антитело является сверхперекрестно-сшитым, как описано ранее (62). Имобилизованный с помощью любого протокола IgG B11 вызывал программируемую клеточную смерть клеток лимфомы Daudi, показывая, что

45 биологическая активность сохранялась после иммобилизации IgG B11, однако не вызывала высвобождения цитокинов PBMC и не вызывала пролиферацию клеток с помощью любого протокола или при добавлении в раствор в присутствии или в отсутствие перекрестносвязывающего реагента (фиг.12).

В противоположность этому и как ожидалось, инкубация PBMCs с иммобилизованным положительным контрольным анти-CD3 антителом приводила к значительному высвобождению PBMC IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и iFN- γ (фиг.12). Аналогичные эксперименты показали, что добавленный в раствор IgG B11 не вызывает или усиливает высвобождение цитокинов из находящихся в покое или предварительно стимулированных липополисахаридом PBMCs, и не вызывает пролиферацию клеток (фиг.12).

Пример 9. Анти-ICAM-1 антитело показывает превосходный эффект на диссеминированной множественной миеломе *in vivo* по сравнению со стандартным лечением, причем сама экспрессия ICAM-1 не затрагивается такими стандартными вариантами лечения

Линии клеток

RPMI 8226 были получены от Pharmacell (Франция), а ARH-77 - от компании ATCC. Опухолевые клетки росли в суспензии при 37°C в увлажненной атмосфере (5% CO₂, 95% воздух). Для обеих клеточных линий использовали культуральную среду RPMI 1640, содержащую 2 mM L-глутамин с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Для ARH-77 в среду добавляли 25 mM HEPES, 1 mM пирувата натрия и глюкозу до окончательной концентрации 4,5 г/л. Для исследования опухолей *in vivo* клетки собирали на стадии пролиферации, а жизнеспособность проверяли методом вытеснения трипанового синего 0,25%.

Животные

Самки мышей CB-17 SCID scid/scid 6-8 недельного возраста были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles, Франция) или Taconic (Дания) и размещены в SPF-условиях со свободным доступом к воде и пище (*ad libitum*). Все эксперименты с животными были проведены в соответствии с этическими рекомендациями. За мышами наблюдали в течение минимум 7 дней до начала эксперимента.

Диссеминированная модель RPMI-8226 *in vivo*

10 \times 10⁶ опухолевых клеток RPMI 8226 (200 мкл) вводили внутривенно в хвостовую вену самок мышей линии SCID. Мышей облучали (тело целиком) (1,8 Гр; ⁶⁰Co, BioMER) за 24-72 часа до введения клеток. В день 1 мышей с привитой опухолью рандомизировали в соответствии с их индивидуальным весом тела. Все виды лечения начинали на 5 день после введения, за исключением АЛКЕРАН®, лечение которым начинали на 10 день. Все виды лечения вводили в объеме дозы 10 мл/кг/инъекцию. Мыши получали один из следующих вариантов лечения:

Моноклональные анти-ICAM mAb или контрольные mAb вводили *i.v.* в растворе PBS в дозе 2 мг/кг 2 раза в неделю в течение 8 последовательных недель.

ВЕЛКЕЙД® (Бортезомиб; 3,5 мг, Janssen-Cilag) солибилизировали в NaCl 0,9%, затем разделили на аликвоты и хранили при -20°C. Один флакон размораживали непосредственно перед инъекцией, а после этого выбрасывали. Мыши получали *i.v.* инъекции 0,5; 1 или 2 мг/кг, 1 раз в неделю в течение 8 последовательных недель.

Ревлимид® (Леналидомид, 5 мг/капсулу, Celgene) капсулы сначала солибилизировали в DMSO, а затем разбавляли до окончательной концентрации 5% DMSO, 0,2% HCl 1N (Sigma), 5% Твин 80 (Sigma) и 89,8% NaCl 0,9%. Каждый день введения готовили свежий раствор. Мышей лечили *p.o.* дозами 1, 2 или 3 мг/кг в течение 2 циклов, состоящих из 5 дней лечения и 2 дней «вымывания».

АЛКЕРАН® (Мелфалан, 50 мг, GlaxoSmithKline) приготавливали, смешивая 50 мг АЛКЕРАН®, содержащегося во флаконе, с прилагаемым наполнителем и после этого

делили на аликвоты и хранили при -20°C. Перед каждым введением одну аликвоту размораживали и разводили в NaCl 0,9% и вводили i.v. в дозе 3, 6 или 12 мг/кг, 1 раз в неделю в течение 8 последовательных недель.

Дексаметазон® (4 мг/мл, Mylan) разводили в NaCl 0,9%. Свежий рабочий раствор готовили каждый день, когда он использовался. Мыши получали 2, 4 и 6 мг/кг/инъекцию 3 раза в неделю на протяжении 2 последовательных недель.

Экспрессия ICAM-1

Состояние здоровья и поведение мышей регистрировали каждый день, а вес тела отмечали два раза в неделю. Мышей забивали, если у них появлялись признаки истощения, токсического действия препаратов, паралич задних конечностей или тяжелая потеря веса тела. После умерщвления собирали костный мозг, спинной мозг, надпочечники и почки и проверяли экспрессию ICAM-1 на опухолевых клетках. Для того, чтобы различить клетки человеческого от мышиноного происхождения, антимышь CD45 mAb использовались CD45. В результате, клетки ММ были определены как CD38⁺/mCD45⁻ (Becton Dickinson). В дополнение к этому клетки были окрашены AF647-конъюгированными анти-ICAM-1 mAb и после этого исследованы с помощью FACS LSRII. Костный мозг механически гомогенизировали до одноклеточной суспензии, в то время как клетки надпочечников, почек и спинного мозга подготавливали, используя сочетание механической гомогенизации и расщепления диспазой/коллагеназой (Gibco, Франция). До эксперимента было показано, что обработка диспазой и коллагеназой не влияет на уровни ICAM-1 в клетках линий ММ.

Подкожная общепринятая модель ARH-77 in vivo

Клетки (5×10⁶ ARH-77, в объеме 100 мкл) вводили подкожно в левый бок самок мышей линии SCID. Объем опухолей измеряли 3 раза в неделю после инъекции опухолевых клеток и на всем протяжении эксперимента. Когда опухоли достигали средней величины 100 мм³ (12 день), мышей рандомизировали согласно объему опухоли и начинали лечение.

Мыши получали или анти-ICAM- mAb или Ревлимид® или ВЕЛКЕЙД®.

Контрольным мышам вводили контрольные mAb.

Моноклональные анти-ICAM mAb или контрольные mAb вводили i.p. в 200 мкл раствора PBS в дозе 2 мг/кг, 2 раза в неделю на протяжении всего эксперимента.

ВЕЛКЕЙД® (Бортезомид; 3,5 мг, Janssen-Cilag) подготавливали, как описано, и вводили в 200 мкл i.p. в дозе 0,5 или 1 мг/кг, 2 раза в неделю на протяжении всего эксперимента.

Ревлимид® (Леналидомид, 5 мг/капсулу, Celgene) подготавливали, как описано, и вводили в 200 мкл p.o. в дозе 1 или 2 мг/кг, 5 раз в неделю на протяжении всего эксперимента.

Состояние здоровья и поведение мышей регистрировали каждый день. Мышей забивали, если у них наблюдались признаки общего истощения, токсического действия препаратов, тяжелая потеря веса тела или когда опухоль достигала размера 1,5 см в диаметре.

Результаты

Лучший эффект анти-ICAM-1 на модели диссеминированной ММ in vivo На моделях ксенотрансплантатов диссеминированной ММ (линия клеток множественной миеломы RPMI-8226), которых лечили BI-505 и четырьмя разными стандартами лечения (SOC), было продемонстрировано улучшение выживаемости при лечении BI-505 по сравнению с контрольными группами, которых лечили изотипическими контролями, смотри фиг.13.

В дополнение к этому, анти ICAM-1 mAb является более эффективным по сравнению с другими отдельными стандартами лечения SOC в дозах, которые не были остроотоксичными, см. фиг.13.

Экспрессия ICAM-1 in vivo не восприимчива к действию различных вариантов

лечения
После того, как от мышей, которых лечили стандартами лечения (Алкеран®, Ревлимид®, Дексаметазон® или ВЕЛКЕЙД®), были собраны опухолевые клетки, выяснилось, что ICAM-1 все еще экспрессируется в неизмененных, повышенных уровнях на этих опухолевых клетках, см. фиг.14.

Пример 10. Предпочтительные фармацевтические композиции, способы введения и дозы

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения могут доставляться с помощью инъекционной системы доставки лекарства с замедленным высвобождением. Эти системы специально разработаны для уменьшения частоты инъекций. Примером такой системы является Nutropin Depot, которая инкапсулирует рекомбинантный гормон роста человека (rhGH) в биodeградируемые микросферы, которые после введения медленно высвобождают rhGH в течение продолжительного периода.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения могут вводиться с помощью имплантированного хирургическим путем устройства, которое высвобождает лекарственное средство непосредственно в нужное место. Например, Vitrasert высвобождает ганцикловир прямо в глаз для лечения ретинита, вызванного цитомегаловирусом (CMV). При прямом применении этого токсичного агента в месте патологического процесса достигается эффективное лечение без значительных системных побочных эффектов лекарства.

Терапевтические системы с применением электропорации (ЕРТ) также могут использоваться для введения. Устройство, доставляя импульсное электрическое поле к клеткам, увеличивает проницаемость клеточных мембран к лекарственному средству, что приводит к значительному усилению внутриклеточной доставки лекарственного средства.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты изобретения также могут доставляться при помощи электровключения (введения) (EI). EI происходит, когда небольшие частицы (до 30 микрон в диаметре) на поверхности кожи испытывают действие электрических импульсов таких же или похожих на импульсы, использованные при электропорации. При EI эти частицы двигаются через роговой слой и в более глубокие слои кожи. Частицы могут быть нагружены или покрыты лекарственными средствами или генами или могут просто действовать как "пули", которые делают поры в коже, через которые могут войти лекарственные средства.

Альтернативным способом введения является инъекционная термочувствительная система ReGel®. Ниже температуры тела ReGel представляет собой инъецируемую жидкость, тогда как при температуре тела она немедленно образует резервуар с гелем, который медленно разрушается и разлагается на известные, безопасные, биodeградируемые полимеры. Активное вещество доставляется в течение некоторого времени по мере того, как биополимеры разлагаются.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут быть введены в клетки с помощью "тройных пептидов". Это класс полипептидов, называемых пенетратинами, которые способны перемещаться и переносить гидрофильные соединения через плазматическую мембрану. Эта система предоставляет возможность

прямого нацеливания антител или антигенсвязывающих фрагментов на цитоплазму и ядро и может не иметь специфичности к типу клеток, но является высокоэффективной (Derossi et al, 1998, Trends Cell Biol, 8, 84-87).

Предпочтительно, фармацевтическая композиция настоящего изобретения представляет собой стандартную лекарственную форму (единицу дозирования), содержащую суточную дозу или суточную субдозу или соответствующую долю активного ингредиента.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут быть введены любым парентеральным путем в виде фармацевтической композиции, содержащей активный ингредиент, необязательно в виде нетоксичной соли присоединения органической или неорганической кислоты или основания, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. В зависимости от заболевания и пациента, которого нужно лечить, а также способа введения, композиция может быть введена в разных дозах.

При лечении человека антитела или их антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут вводиться отдельно, но в основном вводятся в смеси с подходящим фармацевтическим эксципиентом, разбавителем и носителем, выбранным с учетом предполагаемого способа введения и стандартной фармацевтической практики

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты изобретения также могут вводиться парентерально, например, внутривенно, внутриартериально, внутривентрикулярно, интратекально (в полость позвоночного канала), интравентрикулярно (внутри желудочков головного мозга), внутривентрикулярно, внутримышечным и подкожным путем, или они могут быть введены методами вливания. Лучше всего их использовать в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество соли или глюкозы, для получения раствора изотонического по отношению к крови. Водные растворы должны быть забуференными (предпочтительно до значения pH от 3 до 9), по необходимости. Приготовление подходящих парентеральных композиций в стерильных условиях легко осуществляется с помощью стандартных фармацевтических методов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Композиции, подходящие для парентерального введения, включают водные и безводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворы, приводящие композиции в изотоническое состояние по отношению к крови назначенного реципиента; и водные и безводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие вещества и загустители. Композиции могут предоставляться в однодозовых и многодозовых контейнерах, например запаянных ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, которое требует только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекции, непосредственно перед применением. Экстемпоральные (для немедленного приема) инъекционные растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее.

В целом, у человека пероральное или парентеральное введение антител изобретения является предпочтительным способом, будучи наиболее удобным.

При применении в ветеринарии антитела или их антигенсвязывающие фрагменты изобретения вводятся в виде подходящих композиций в соответствии с обычной ветеринарной практикой, и ветеринарный врач будет определять режим дозирования и способ введения, наиболее подходящие для конкретного животного.

Составы фармацевтических композиций изобретения могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть приготовлены с помощью любого из методов, хорошо известных в фармацевтическом деле. Такие способы включают стадию соединения активного ингредиента с носителем, который представляет собой один или более дополнительных ингредиентов. В большинстве случаев, композиции приготавливают посредством равномерного и тщательного соединения (смешивания) активного ингредиента с жидкими носителями или мелкодисперсными твердыми носителями или и тем и другим, а затем, если необходимо, придания определенной формы продукту.

Предпочтительными стандартными лекарственными композициями являются композиции, содержащие суточную дозу или суточную субдозу или соответствующую долю активного ингредиента.

Предпочтительная система доставки изобретения может содержать гидрогель, насыщенный полипептидами, полинуклеотидами и антителами изобретения, который предпочтительно наносится на тампон, который может быть помещен в шейку матки и извлечен, как только получен необходимый для созревания шейки матки или другой желательный эффект на женскую репродуктивную систему.

Должно быть понятно, что в дополнение к ингредиентам, в частности, упомянутым выше, композиции этого изобретения могут включать другие вещества, общепринятые в данной области техники, принимая во внимание тип композиции, о которой идет речь.

Пример 11. Примеры фармацевтических композиций

Наряду с тем, что возможно введение антител изобретения в отдельности, предпочтительным является их присутствие в составе фармацевтической композиции в сочетании с одним или более приемлемыми носителями. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он является совместимым с соединением изобретения и безвредным для реципиентов. Как правило, носители являются водой или физраствором, который должен быть стерильным и апирогенным.

Следующие примеры иллюстрируют фармацевтические композиции согласно изобретению, в которых активный ингредиент является соединением изобретения.

Пример 11А. Композиция для инъекции

Активный ингредиент 0,200 г

Стерильный апирогенный фосфатный буфер (pH 7,0) до 10 мл

Активный ингредиент растворяют в большей части фосфатного буфера (35-40°C), затем доводят до метки и профильтровывают через стерильный микропористый фильтр в стерильный 10 мл флакон из янтарного стекла (тип 1) и закрывают стерильными пластмассовыми крышками и дополнительными укупорочными средствами.

Пример 11 В. Препарат для внутримышечной инъекции

Активный ингредиент	0,20 г
Бензиловый спирт	0,10 г
Глюкофузол 75®	1,45 г

Вода для инъекции (по необходимости, q.s.) до 3,00 мл

Активный ингредиент растворяют в глюкофузоле. Затем добавляют бензиловый спирт, растворяют и добавляют воду до 3 мл. Затем смесь профильтровывают через стерильный микропористый фильтр и закрывают в стерильные стеклянные флаконы 3 мл (тип 1).

Пример 11С. Таблетка

Активный ингредиент

100 мг

Лактоза	200 мг
Крахмал	50 мг
Поливинилпирролидон	5 мг
Стеарат магния	4 мг
	359 мг

5 Таблетки приготавливают из следующих ингредиентов методом влажной грануляции с последующим прессованием.

Пронумерованные ссылки:

1. Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10:317-327.

10 2. McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., et al. 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16:2825-2833.

15 3. Davis, T.A., White, C.A., Grillo-Lopez, A.J., Velasquez, W.S., Link, B., Maloney, D.G., Dillman, R.O., Williams, M.E., Mohrbacher, A., Weaver, R., et al. 1999. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol* 17:1851-1857.

20 4. Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., Reiser, M., Metzner, B., Harder, H., Hegewisch-Becker, S., et al. 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106:3725-3732.

25 5. Herold, M., Haas, A., Srock, S., Naser, S., Al-Ali, K.H., Neubauer, A., Dolken, G., Naumann, R., Knauf, W., Freund, M., et al. 2007. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol* 25:1986-1992.

30 6. Marcus, R., Imrie, K., Solal-Celigny, P., Catalano, J.V., Dmoszynska, A., Raposo, J.C., Offner, F.C., Gomez-Codina, J., Belch, A., Cunningham, D., et al. 2008. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 26:4579-4586.

7. Coiffier, B. 2007. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26:3603-3613.

35 8. Cheson, B.D., and Leonard, J.P. 2008. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 359:613-626.

9. Smith, M.R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22:7359-7368.

40 10. Fransson, J., Tornberg, U.C., Borrebaeck, C.A., Carlsson, R., and Frendeus, B. 2006. Rapid induction of apoptosis in B-cell lymphoma by functionally isolated human antibodies. *Int J Cancer* 119:349-358.

45 11. Horst, E., Radaszkiewicz, T., Hooftman-den Otter, A., Pieters, R., van Dongen, J.J., Meijer, C.J., and Pals, S.T. 1991. Expression of the leucocyte integrin LFA-1 (CD11a/CD18) and its ligand ICAM-1 (CD54) in lymphoid malignancies is related to lineage derivation and stage of differentiation but not to tumor grade. *Leukemia* 5:848-853.

12. Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. 2007. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 7:585-598.

13. Huang, Y.W., Richardson, J.A., and Vitetta, E.S. 1995. Anti-CD54 (ICAM-1) has antitumor

activity in SCID mice with human myeloma cells. *Cancer Res* 55:610-616.

14. Schmidmaier, R., Morsdorf, K., Baumann, P., Emmerich, B., and Meinhart, G. 2006. Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers* 21:218-222.

15. Johnson, J.P., Stade, B.G., Hupke, U., Holzmann, B., and Riethmuller, G. 1988. The melanoma progression-associated antigen P3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule, ICAM-1. *Immunobiology* 178:275-284.

16. Johnson, J.P., Lehmann, J.M., Stade, B.G., Rothbacher, U., Sers, C., and Riethmuller, G. 1989. Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma. *Invasion Metastasis* 9:338-350.

17. Grothey, A., Heistermann, P., Philippou, S., and Voigtmann, R. 1998. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br J Cancer* 77: 801-807.

18. Maruo, Y., Gochi, A., Kaihara, A., Shimamura, H., Yamada, T., Tanaka, N., and Orita, K. 2002. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* 100:486-490.

19. Roche, Y., Pasquier, D., Rambeaud, J.J., Seigneurin, D., and Duperray, A. 2003. Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway. *Thromb Haemost* 89: 1089-1097.

20. Rosette, C, Roth, R.B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., and Denissenko, M.F. 2005. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26:943-950.

21. Aalinkeel, R., Nair, M.P.N., Sufrin, G., Mahajan, S.D., Chadha, K.C., Chawda, R.P., and Schwartz, S.A. 2004. Gene Expression of Angiogenic Factors Correlates with Metastatic Potential of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 64:5311-5321.

22. Migkou, M., Terpos, E., Christoulas, M., Gavriatopoulou, M., Boutsikas, M., Gkatzamanidou, M., Iakovaki, M., Kastritis, M., Papatheodorou, M., and Dimopoulos, M.A. 2009. Increased levels of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and Inter-Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Correlate with Advanced Disease Features and Poor Survival in Newly Diagnosed Patients with Multiple myeloma. Reduction Post-EopTe30MH6- and Леналидомид-Based Regimens

In 51st ASH annual meeting and exposition. New Orleans, LA.

23. Kapoor, P., Greipp, P.T., Morice, W.G., Rajkumar, S.V., Witzig, T.E., and Greipp, P.R. 2008. Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 141:135-148.

24. Tai, Y.-T., Catley, L.P., Mitsiades, C.S., Burger, R., Podar, K., Shringpaure, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Hamasaki, M., Ishitsuka, K., et al. 2004. Mechanisms by which SGN-40, a Humanized Anti-CD40 Antibody, Induces Cytotoxicity in Human Multiple myeloma Cells: Clinical Implications. *Cancer Res* 64:2846-2852.

25. Treon, S.P., Pilarski, L.M., Belch, A.R., Kelliher, A., Preffer, F.I., Shima, Y., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., Szczepek, A.J., Ellman, L., et al. 2002. CD20-directed serotherapy in patients with multiple myeloma: biologic considerations and therapeutic applications. *J Immunother* 25: 72-81.

26. Mitsiades, C.S., Treon, S.P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T., and Anderson, K.C. 2001. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98:795-804.

27. Treon, S.P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Young, G., Doss, D., Schlossman, R., and Anderson, K.C. 2001. Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance to CD20 Serotherapy

in Patients With B-Cell Malignancies. *J Immunother* 24:263-271.

28. Ralph, P. 1985. The human B-cell lineage cell line ARH-77. *Cancer* 56:2544-2545.

29. Huang, Y.W., Richardson, J.A., Tong, A.W., Zhang, B.Q., Stone, M.J., and Vitetta, E.S. 1993. Disseminated growth of a human multiple myeloma cell line in mice with severe combined immunodeficiency disease. *Cancer Res* 53:1392-1396.

30. Tong, A.W., Huang, Y.W., Zhang, B.Q., Netto, G., Vitetta, E.S., and Stone, M.J. 1993. Heterotransplantation of human multiple myeloma cell lines in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Anticancer Res* 13:593-597.

31. Lokhorst, H.M., Lamme, T., de Smet, M., Klein, S., de Weger, R.A., van Oers, R., and Bloem, A.C. 1994. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 84:2269-2277.

32. Tong, A.W., Zhang, B.Q., Mues, G., Solano, M., Hanson, T., and Stone, M.J. 1994. Anti-CD40 antibody binding modulates human multiple myeloma clonogenicity in vitro. *Blood* 84:3026-3033.

33. Alsina, M., Boyce, B.F., Mundy, G.R., and Roodman, G.D. 1995. An in vivo model of human multiple myeloma bone disease. *Stem Cells* 13 Suppl 2:48-50.

34. Bellamy, W.T., Mendibles, P., Bontje, P., Thompson, F., Richter, L., Weinstein, R.S., and Grogan, T.M. 1996. Development of an orthotopic SCID mouse-human tumor xenograft model displaying the multidrug-resistant phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 37:305-316.

35. Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A., and Anderson, K.C. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87:1104-1112.

36. Urashima, M., Chen, B.P., Chen, S., Pinkus, G.S., Bronson, R.T., Dederer, D.A., Hoshi, Y., Teoh, G., Ogata, A., Treon, S.P., et al. 1997. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood* 90:754-765.

37. Kobune, M., Chiba, H., Kato, J., Kato, K., Nakamura, K., Kawano, Y., Takada, K., Takimoto, R., Takayama, T., Hamada, H., et al. 2007. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther* 6:1774-1784.

38. Nadav, L., Katz, B.Z., Baron, S., Cohen, N., Naparstek, E., and Geiger, B. 2006. The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer Res* 66:8608-8616.

39. Kawai, S., Yoshimura, Y., Iida, S., Kinoshita, Y., Koishihara, Y., Ozaki, S., Matsumoto, T., Kosaka, M., and Yamada-Okabe, H. 2006. Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigen in human myeloma xenograft models. *Oncol Rep* 15:361-367.

40. Ural, A.U., Yilmaz, M.I., Avcu, F., Pekel, A., Zerman, M., Nevruz, O., Sengul, A., and Yalcin, A. 2003. The bisphosphonate zoledronic acid induces cytotoxicity in human myeloma cell lines with enhancing effects of dexamethasone and thalidomid. *Int J Hematol* 78:443-449.

41. Drucker, L., Uziel, O., Tohami, T., Shapiro, H., Radnay, J., Yarkoni, S., Lahav, M., and Lishner, M. 2003. Thalidomid down-regulates transcript levels of GC-rich promoter genes in multiple myeloma. *Mol Pharmacol* 64:415-420.

42. Choi, S.J., Oba, T., Callander, N.S., Jelinek, D.F., and Roodman, G.D. 2003. AML-1A and AML-1B regulation of MIP-1alpha expression in multiple myeloma. *Blood* 101:3778-3783.

43. Tian, J.Y., Hu, W.X., Tian, E.M., Shi, Y.W., Shen, Q.X., Tang, L.J., and Jiang, Y.S. 2003. Cloning and sequence analysis of tumor-associated gene hMMTAG2 from human multiple myeloma cell line ARH-77. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35:143-148.

44. Tong, A.W., Seamour, B., Chen, J., Su, D., Ordonez, G., Frase, L., Netto, G., and Stone,

M.J. 2000. CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 36:543-558.

45. Feinman, R., Koury, J., Thames, M., Barlogie, B., Epstein, J., and Siegel, D.S. 1999. Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bc1-2. *Blood* 93:3044-3052.

46. Thomas, X., Anglaret, B., Magaud, J.P., Epstein, J., and Archimbaud, E. 1998. Interdependence between cytokines and cell adhesion molecules to induce interleukin-6 production by stromal cells in myeloma. *Leuk Lymphoma* 32:107-119.

47. Roodman, G.D. 1997. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 80:1557-1563.

48. Ozaki, S., Kosaka, M., Wakatsuki, S., Abe, M., Koishihara, Y., and Matsumoto, T. 1997. Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood* 90:3179-3186.

49. Lopes de Menezes, D.E., Denis-Mize, K., Tang, Y., Ye, H., Kunich, J.C., Garrett, E.N., Peng, J., Cousens, L.S., Gelb, A.B., Heise, C, et al. 2007. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother* (1997) 30:64-74.

50. de Bont, E.S., Guikema, J.E., Scherpen, F., Meeuwssen, T., Kamps, W.A., Vellenga, E., and Bos, N.A. 2001. Mobilized human CD34+ hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mouse model of human non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 61:7654-7659.

51. Sampaio, M.S., Vettore, A.L., Yamamoto, M., Chauffaille Mde, L., Zago, M.A., and Colleoni, G.W. 2009. Expression of eight genes of nuclear factor-kappa B pathway in multiple myeloma using bone marrow aspirates obtained at diagnosis. *Histol Histopathol* 24:991-997.

52. Weng, W.K., and Levy, R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947.

53. Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., et al. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1789-1796.

54. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.

55. Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. 2009. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.

56. Carter, P.J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6:343-357.

57. Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R., and Glennie, M.J. 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101:1045-1052.

58. Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.P., Jacob, M.C., Sotto, J.J., Leroux, D., Bensa, J.C., and Plumas, J. 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101:949-954.

59. Cragg, M.S., and Glennie, M.J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738-2743.

60. Smith, M.E., and Thomas, J.A. 1990. Cellular expression of lymphocyte function associated antigens and the intercellular adhesion molecule-1 in normal tissue. *J Clin Pathol* 43:893-900.

61. Roebuck, K.A., and Finnegan, A. 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1

(CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66:876-888.

62. Stebbings, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., Mistry, Y., Dilger, P., Liefoghe, E., Cludts, I., et al. 2007. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* 179:3325-3331.

63. Davis, T.A., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., McLaughlin, P., Czuczman, M.S., Link, B.K., Maloney, D.G., Weaver, R.L., Rosenberg, J., and Levy, R. 2000. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 18:3135-3143.

64. Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. 2004. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351:1860-1873.

65. Zhang, W., Gordon, M., Schultheis, A.M., Yang, D.Y., Nagashima, F., Azuma, M., Chang, H.M., Borucka, E., Lurje, G., Sherrod, A.E., et al. 2007. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 25:3712-3718.

66. Lejeune, J., Thibault, G., Ternant, D., Cartron, G., Watier, H., and Ohresser, M. 2008. Evidence for linkage disequilibrium between Fcgamma RIIIa-V158F and Fcgamma RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fcgamma RIIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. *J Clin Oncol* 26:5489-5491; author reply 5491-5482.

67. Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di Fiore, F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frebourg, T., Michel, P., et al. 2009. Impact of Fc {gamma}RIIIa-Fc {gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 27:1122-1129.

68. Schmidmaier, R., Baumann, P., Simsek, M., Dayyani, F., Emmerich, B., and Meinhardt, G. 2004. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* 104:1825-1832.

69. Urashima, M., Chauhan, D., Hatziyanni, M., Ogata, A., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., and Anderson, K.C. 1996. CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. *Leuk Res* 20:507-515.

70. Yaccoby, S., Barlogie, B., and Epstein, J. 1998. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood* 92:2908-2913.

71. Yaccoby, S., Wezeman, M.J., Henderson, A., Cottier-Fox, M., Yi, Q., Barlogie, B., and Epstein, J. 2004. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res* 64:2016-2023.

72. Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P.G., Hideshima, T., Munshi, N.C., Treon, S.P., and Anderson, K.C. 2002. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomid analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 99:4525-4530.

73. Chauhan, D., Pandey, P., Hideshima, T., Treon, S., Raje, N., Davies, F.E., Shima, Y., Tai, Y.T., Rosen, S., Avraham, S., et al. 2000. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 275:27845-27850.

74. Hideshima, T., Chauhan, D., Shima, Y., Raje, N., Davies, F.E., Tai, Y.T., Treon, S.P., Lin, B., Schlossman, R.L., Richardson, P., et al. 2000. Thalidomid and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 96:2943-2950.

75. Schneider, D., Berrouscho, J., Brandt, T., Hacke, W., Ferbert, A., Norris, S.H., Polmar, S.H., and Schafer, E. 1998. Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-

ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke. Eur Neurol 40:78-83.

76. Salmela, K., Wramner, L., Ekberg, H., Hauser, I., Bentdal, O., Lins, L.E., Isoniemi, H., Backman, L., Persson, N., Neumayer, H.H., et al. 1999. A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group. Transplantation 67:729-736.

77. Mileski, W.J., Burkhart, D., Hunt, J.L., Kagan, R.J., Saffle, J.R., Herndon, D.N., Heimbach, D.M., Luterman, A., Yurt, R.W., Goodwin, C.W., et al. 2003. Clinical effects of inhibiting leukocyte adhesion with monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 (enlimomab) in the treatment of partial-thickness burn injury. J Trauma 54:950-958.

78. Kavanaugh, A.F., Davis, L.S., Nichols, L.A., Norris, S.H., Rothlein, R., Scharschmidt, L.A., and Lipsky, P.E. 1994. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. Arthritis Rheum 37:992-999.

79. Kavanaugh, A.F., Davis, L.S., Jain, R.I., Nichols, L.A., Norris, S.H., and Lipsky, P.E. 1996. A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. J Rheumatol 23:1338-1344.

80. Kavanaugh, A.F., Schulze-Koops, H., Davis, L.S., and Lipsky, P.E. 1997. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. Arthritis Rheum 40:849-853.

Формула изобретения

1. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со специфичностью связывания с ICAM-1, или варианта, «слитого белка» или производного указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или «слитого белка» указанного варианта или его производного, со специфичностью связывания с ICAM-1,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие аминокислотные последовательности CDR участков:

FSNAWMSWVRQAPG,
AFIWYDGSNKYYADSVKGR,
ARYSGWYFDY,
CTGSSSNIGAGYDVH,
DNNNRPS и
CQSYDSSLAWL,

в производстве медикамента для лечения рака у пациента, где пациента ранее лечили по поводу рака, но он или не отвечал на указанное лечение, или он раньше отвечал на указанное лечение, а впоследствии перенес рецидив.

2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что рак, который необходимо лечить, является тем же самым раком, от которого пациента лечили ранее.

3. Применение по п. 1, отличающееся тем, что рак, который необходимо лечить, является раком, отличным от рака, от которого пациента лечили ранее.

4. Применение по п. 1, отличающееся тем, что рак, который нужно лечить, является лимфопролиферативным заболеванием.

5. Применение по п. 1, отличающееся тем, что рак, который нужно лечить, является множественной миеломой.

6. Применение по п. 1, отличающееся тем, что ICAM-1 располагается на поверхности плазматической клетки.

7. Применение по п. 1, отличающееся тем, что эффективное количество антитела,

антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или производного составляет количество в промежутке примерно от 0,1 мкг до 5 г антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного.

8. Применение по п. 1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное содержит или состоит из интактного антитела.

9. Применение по п. 1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента, выбранного из группы, состоящей из Fv фрагмента; Fab фрагмента; Fab-подобного фрагмента.

10. Применение по п. 9, отличающееся тем, что Fv фрагмент представляет собой одноцепочечный Fv фрагмент или Fv фрагмент, связанный дисульфидной связью.

11. Применение по п. 9, отличающееся тем, что Fab-подобный фрагмент является Fab' фрагментом или F(ab)₂ фрагментом.

12. Применение по п. 1, в котором антитело является рекомбинантным антителом.

13. Применение по п. 1, в котором антитело является моноклональным антителом.

14. Применение по п. 1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим антителом или гуманизированным антителом.

15. Применение по п. 1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 15.

16. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со специфичностью связывания с ICAM-1,

или варианта, «слитого белка» или производного указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или «слитого белка» указанного варианта или его производного со специфичностью связывания с ICAM-1,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие аминокислотные последовательности CDR участков:

FSNAWMSWVRQAPG,

AFIWYDGSNKYYADSVKGR,

ARYSGWYFDY,

CTGSSSNIGAGYDVH,

DNNNRPS и

CQSYDSSLAWL,

для лечения рака у пациента, где пациента ранее лечили по поводу рака, но он или не отвечал на указанное лечение, или он раньше отвечал на указанное лечение, а впоследствии перенес рецидив.

17. Применение антитела по п. 16, отличающееся тем, что рак, который необходимо лечить, является тем же самым раком, от которого пациента лечили ранее.

18. Применение антитела по п. 16, отличающееся тем, что рак, который необходимо лечить, является раком, отличным от рака, от которого пациента лечили ранее.

19. Применение по п. 16, отличающееся тем, что рак, который нужно лечить, является лимфопролиферативным заболеванием.

20. Применение по п. 16, отличающееся тем, что рак, который нужно лечить, является множественной миеломой.

21. Применение по п. 16, отличающееся тем, что ICAM-1 располагается на поверхности плазматической клетки.

22. Применение по п. 16, отличающееся тем, что эффективное количество антитела,

антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или производного составляет количество в промежутке примерно от 0,1 мкг до 5 г антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного.

23. Применение по п. 16, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное содержит или состоит из интактного антитела.

24. Применение по п. 16, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента, выбранного из группы, состоящей из Fv фрагмента; Fab фрагмента; Fab-подобного фрагмента.

25. Применение по п. 24, отличающееся тем, что Fv фрагмент представляет собой одноцепочечный Fv фрагмент или Fv фрагмент, связанный дисульфидной связью.

26. Применение по п. 24, отличающееся тем, что Fab-подобный фрагмент является Fab' фрагментом или F(ab)₂ фрагментом.

27. Применение по п. 16, в котором антитело является рекомбинантным антителом.

28. Применение по п. 16, в котором антитело является моноклональным антителом.

29. Применение по п. 16, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим антителом или гуманизированным антителом.

30. Применение по п. 16, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 15.

31. Способ лечения рака у пациента, которого ранее лечили по поводу рака, но он не отвечал или раньше отвечал на лечение, а потом перенес рецидив, который включает стадию введения пациенту эффективного количества:

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со специфичностью связывания с ICAM-1,

или варианта, «слитого белка» или производного указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или «слитого белка» указанного варианта или его производного со специфичностью связывания с ICAM-1,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие аминокислотные последовательности CDR участков:

FSNAWMSWVRQAPG,

AFIWYDGSNKYYADSVKGR,

ARYSGWYFDY,

CTGSSSNIGAGYDVH,

DNNNRPS и

CQSYDSSLAWL.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что рак, который необходимо лечить, является тем же самым раком, от которого пациента лечили ранее.

33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что рак, который необходимо лечить, является раком, отличным от рака, от которого пациента лечили ранее.

34. Способ по п. 31, отличающийся тем, что рак, который нужно лечить, является лимфопролиферативным заболеванием.

35. Способ по п. 31, отличающийся тем, что рак, который нужно лечить, является множественной миеломой.

36. Способ по п. 31, отличающийся тем, что ICAM-1 располагается на поверхности плазматической клетки.

37. Способ по п. 31, отличающийся тем, что эффективное количество антитела,

антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или производного составляет количество в промежутке примерно от 0,1 мкг до 5 г антитела, антигенсвязывающего фрагмента, варианта, «слитые белки» или его производного.

38. Способ по п. 31, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное содержит или состоит из интактного антитела.

39. Способ по п. 31, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариант, «слитый белок» или производное содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента, выбранного из группы, состоящей из Fv фрагмента; Fab фрагмента; Fab-подобного фрагмента.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что Fv фрагмент представляет собой одноцепочечный Fv фрагмент или Fv фрагмент, связанный дисульфидной связью.

41. Способ по п. 39, отличающийся тем, что Fab-подобный фрагмент является Fab' фрагментом или F(ab)₂ фрагментом.

42. Способ по п. 31, в котором антитело является рекомбинантным антителом.

43. Способ по п. 31, в котором антитело является моноклональным антителом.

44. Способ по п. 31, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим антителом или гуманизированным антителом.

45. Способ по п. 31, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 15.

12.12.10

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> BioInvent International AB
 <120> Biological materials and particular uses thereof

<130> ВЮВН/Р49295РС

<140> РСТ/ЕР2011/061983
 <141> 13/07/2011

<150> GB1011771.1
 <151> 13/07/2010

<160> 10

<170> Seqwin99

<210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 1
 Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 2
 Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 3
 Ala Arg Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 4
 Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 5
 Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 6
 Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Leu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> B11 VH region

<400> 7
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcattt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagatacagt 300
 ggctggtact ttgactactg gggccaaggt acactggtca ccgtgagctc a 351

<210> 8
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> B11 VH region

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 15
 1 5 10
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala 30
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 45
 35 40 45
 Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 60
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 80
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 95
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 110
 100 105 110

Страница 2

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> B11 VL region

<400> 9
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag 120
ctcccaggaa cggcccccac actcctcatc tatgataaca acaatcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtggggtc 240
cgggtccgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct cagtgccttg 300
ctgttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt 336

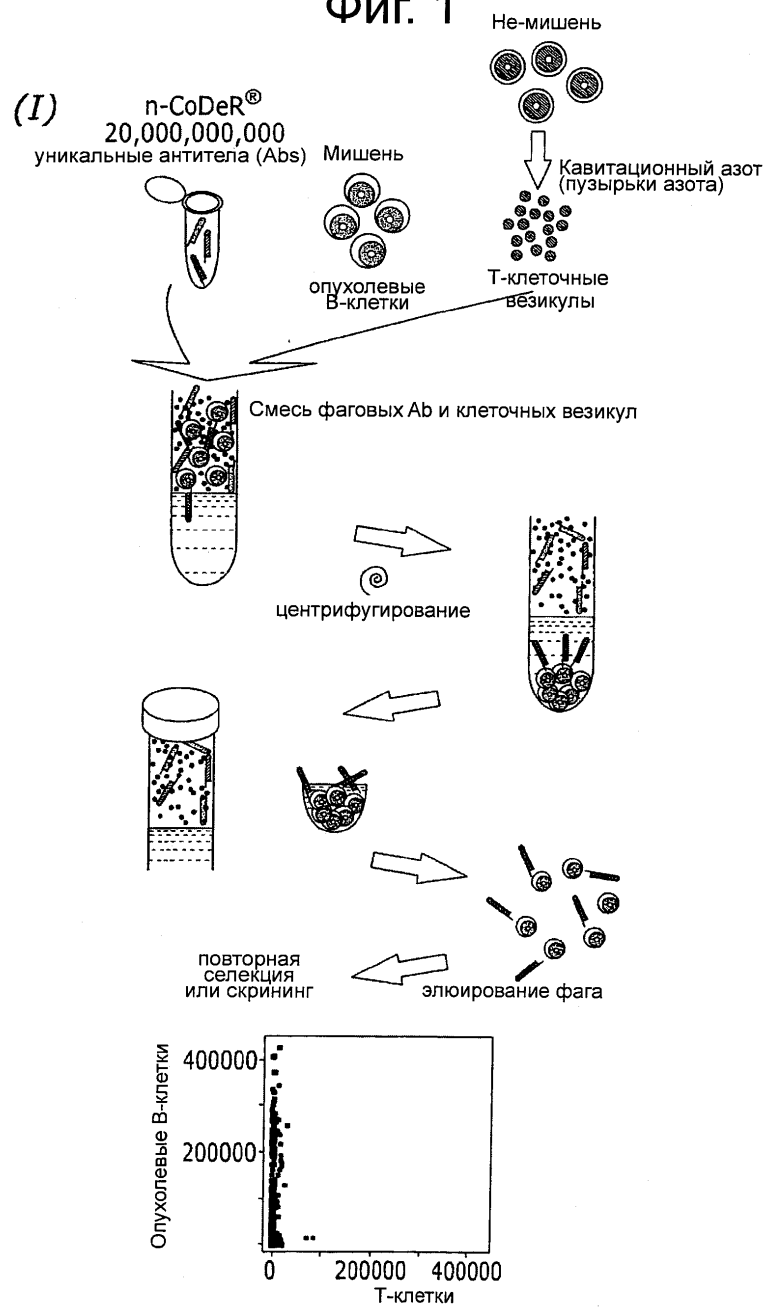
<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> B11 VL region

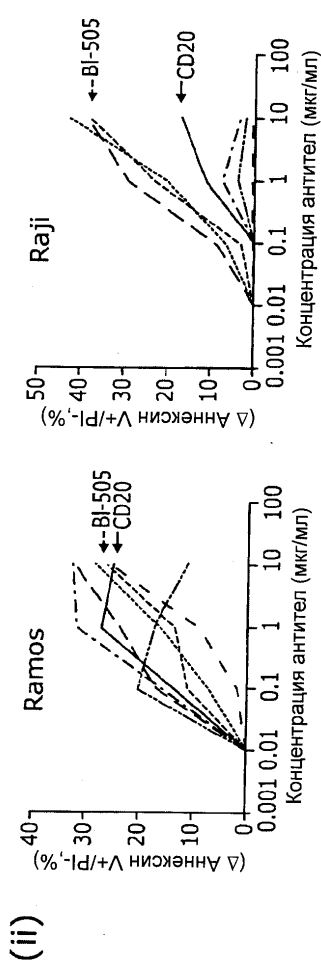
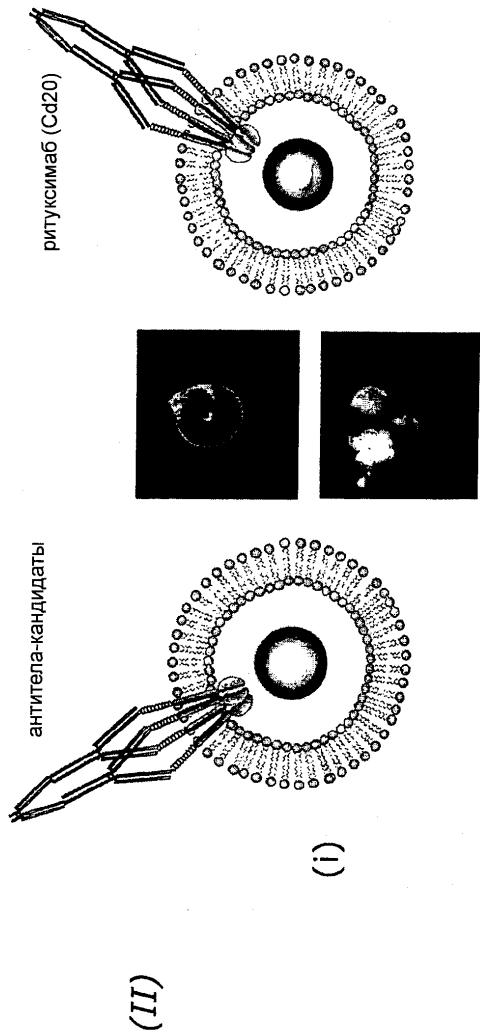
<400> 10
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Ala Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

1/23

Фиг. 1

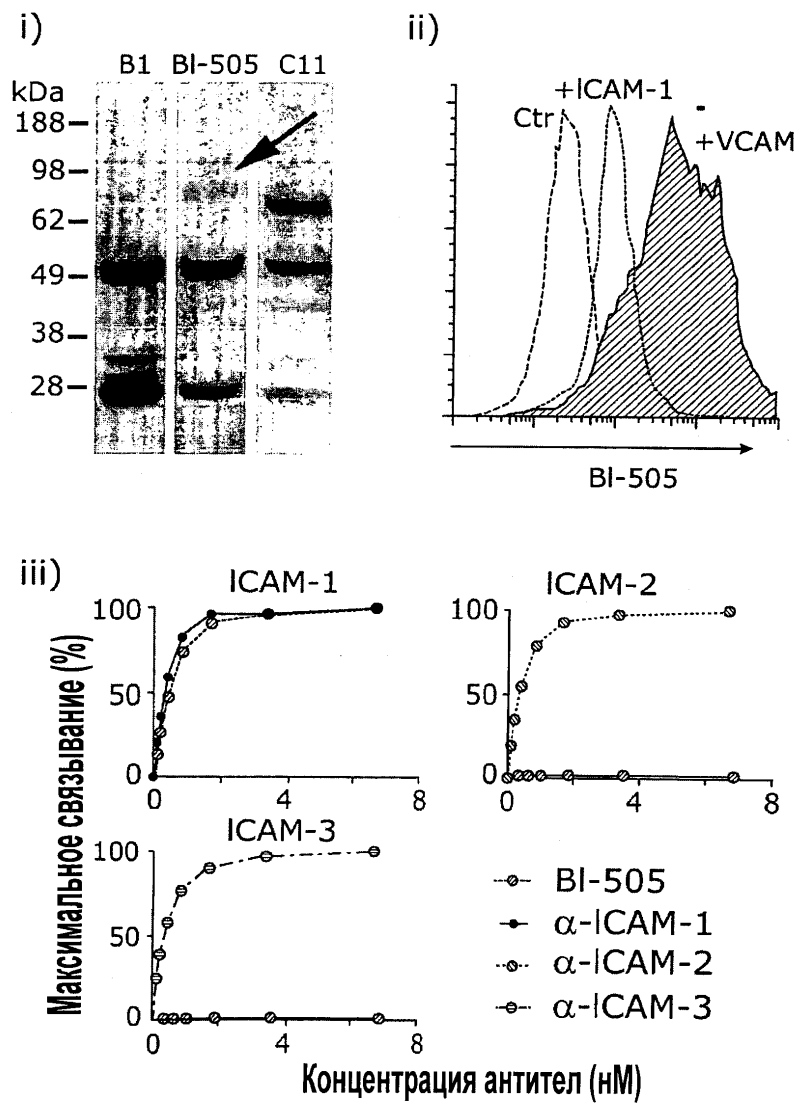


ФИГ. 1 (продолжение)



3/23

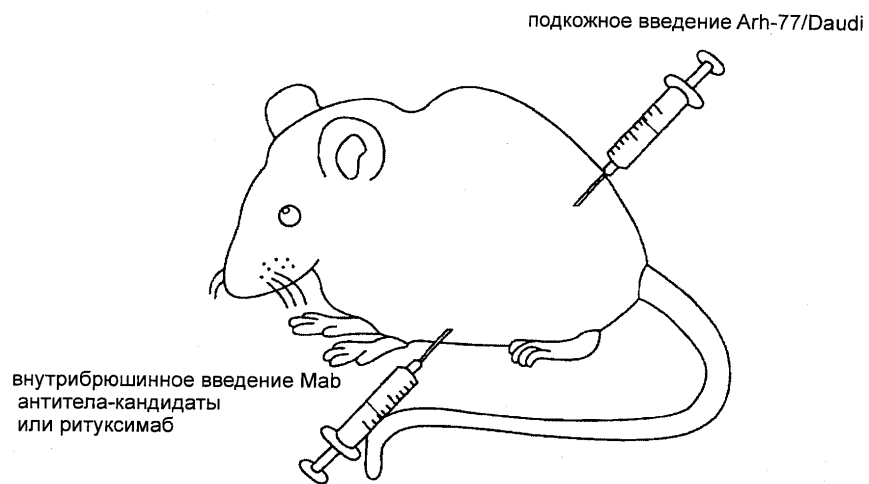
(III) Фиг. 1 (продолжение)



4/23

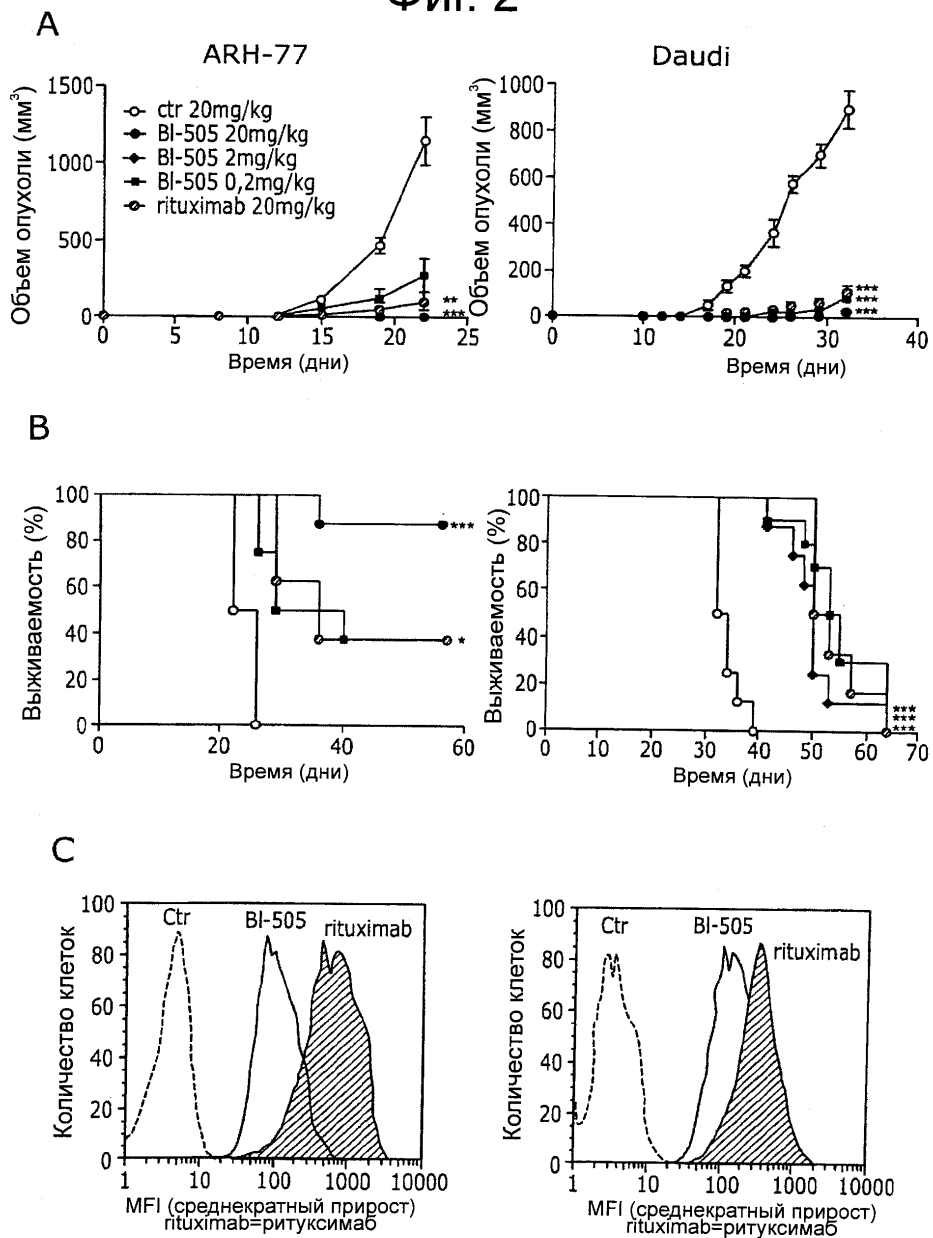
ФИГ. 1 (продолжение)

(IV)



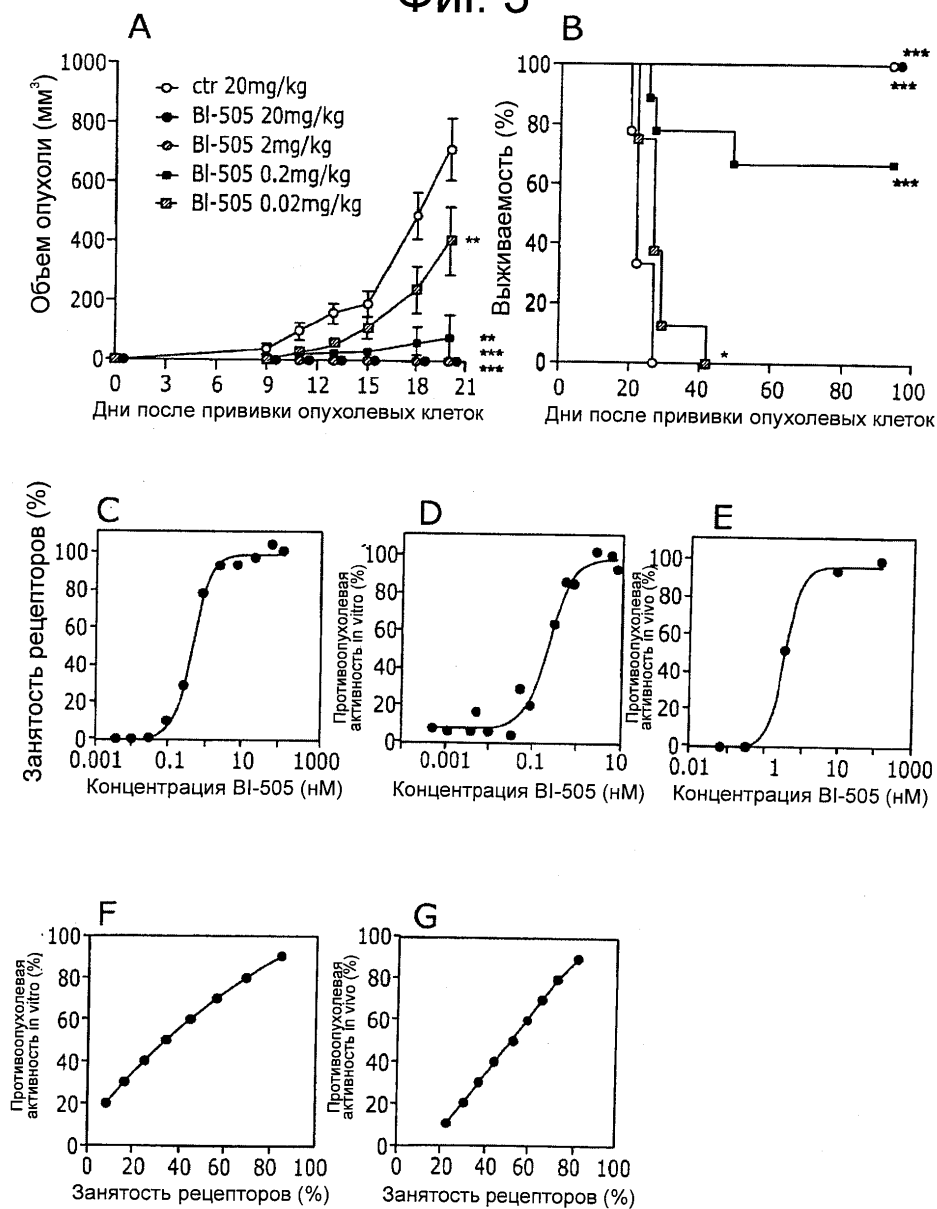
5/23

Фиг. 2



6/23

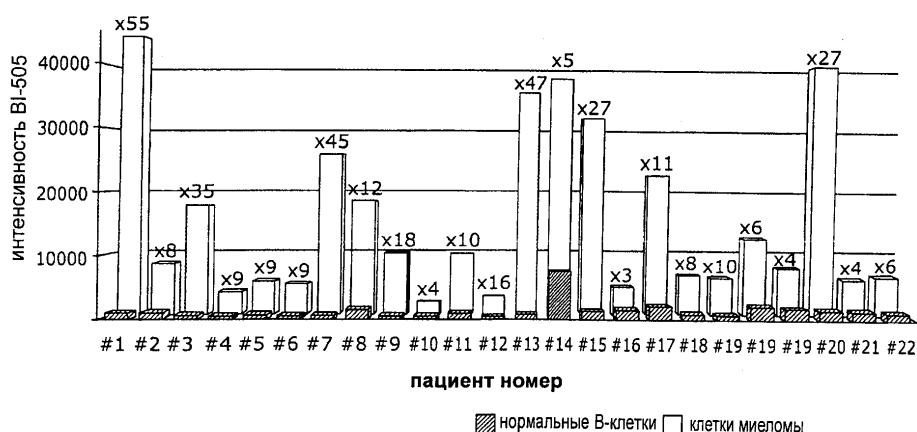
Фиг. 3



7/23

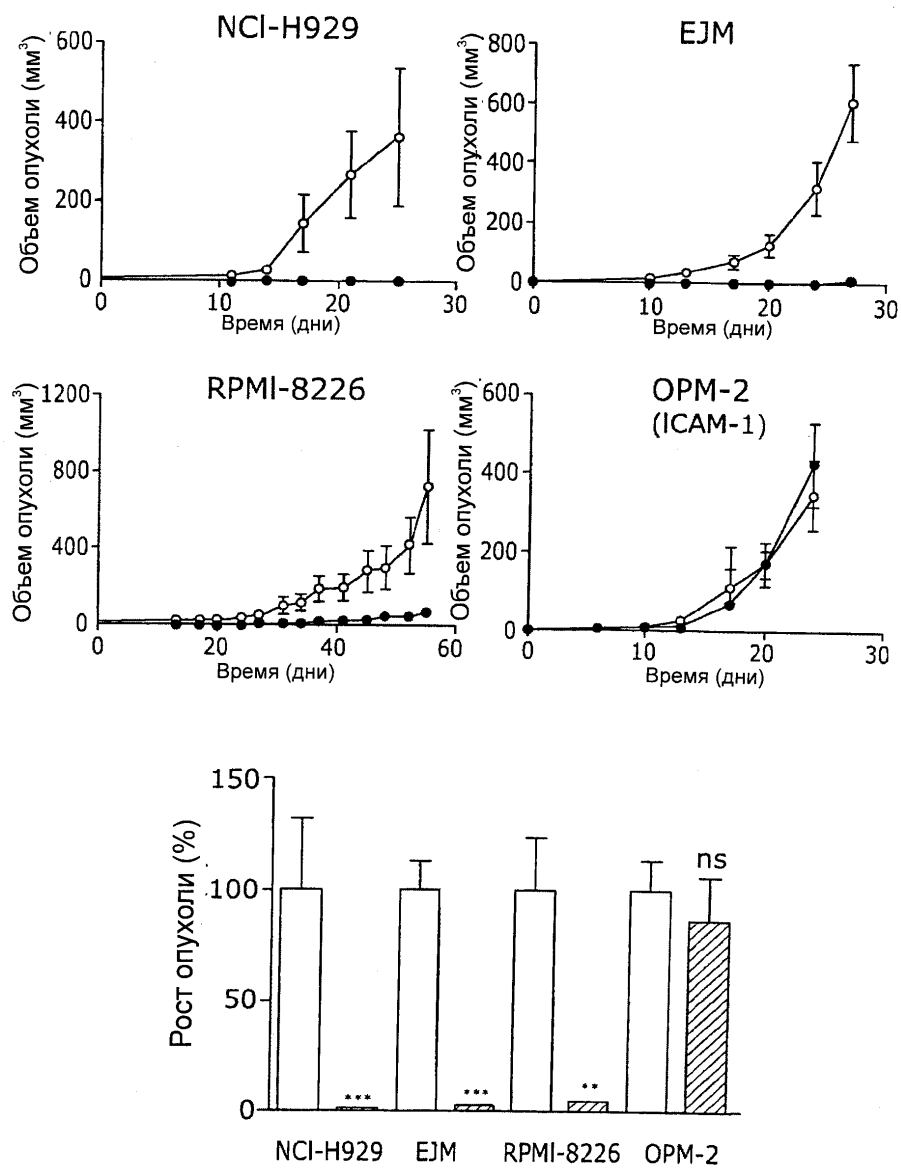
Фиг. 4

номер	возраст	пол	Ig	M(r/n)	активность сыворотки	Плазматциты (%)		BI-505	ISS	T	диагноз
						морфология	FACS				
#1	38	M	G	10	0	14	2	+++	I	0	MM
#2	46	M	G	38	0	34	20	+++	II	0	MM
#3	53	F	G	14	>10	6	22	+++	I	0	MM
#4	54	M	-	0	3	22	5	+++	III	2	несекреторная MM
#5	59	M	G	32	>10	29	7	++	I	0	MM
#6	60	F	G	4	3	2	0.1	+++	II	1	MM
#7	60	F	A	26	1	10	2	+++	I	0	MM
#8	61	M	G	28	0	23	9	+++	II	0	MM
#9	62	M	G	69	>10	30	10	++	II	0	MM
#10	62	F	G	70	>10	80	35	+	III	1	MM
#11	68	M	A	36	>10	60	6	+++	I	0	MM
#12	69	M	-	-	3	50	2	+++	I	1	несекреторная MM
#13	71	M	G	26	0	30	11	+++	I	0	MM
#14	72	M	G	13	0	29	10	+++	I	0	MM
#15	74	M	G	20	0	23	7	+++	I	0	MM
#16	75	M	A	40	0	78	77	++	II	0	MM
#17	77	M	G	45	0	34	13	+++	II	0	MM
#18	79	F	G	23	0	16	6	+++	I	0	MM
#19	79	M	G	24	7	50	24	+++	III	0	MM
#19	79	M	G	3	ND	ND	5	+++		1	MM
#19	80	M	G	3	ND	16	6	+++		2	MM
#20	82	M	A	29	0	44	20	+++	III	0	MM
#21	83	F	G	39	0	89	64	+++	III	0	MM
#22	84	M	A	17	0	38	22	+++	III	0	MM
#23	61	M	A	7	2	24	15	++		0	AL
#24	64	F	-	-	-	6	0.3	+++		0	AL
#25	72	F	-	-	0			+++		0	LCDD/MM
#26	61	F	A	42	99	80	78	+++		4	плазматочный лейкоз
#27	75	M	G	18	>10	8	30	+		4	плазматочный лейкоз
#28	52	M	G	1	1	5	0.4	+++		1	PC
#29	60	F	G	4	1	2	0.1	+++		1	PC



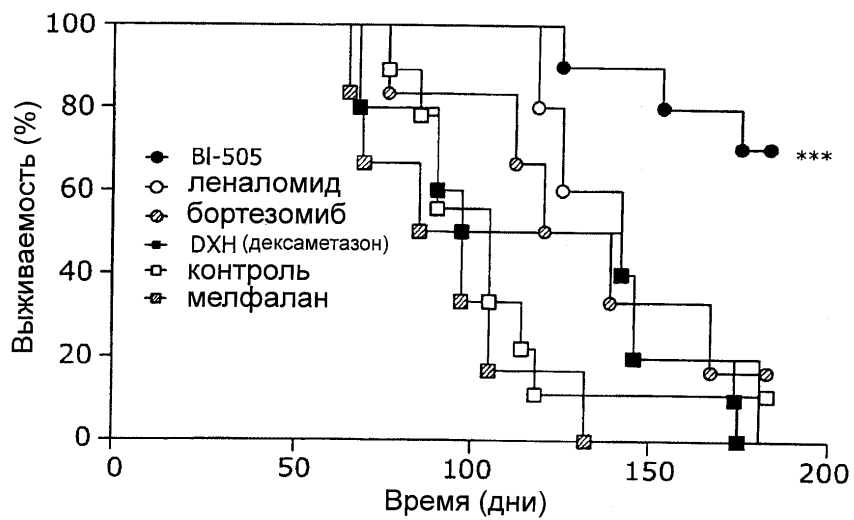
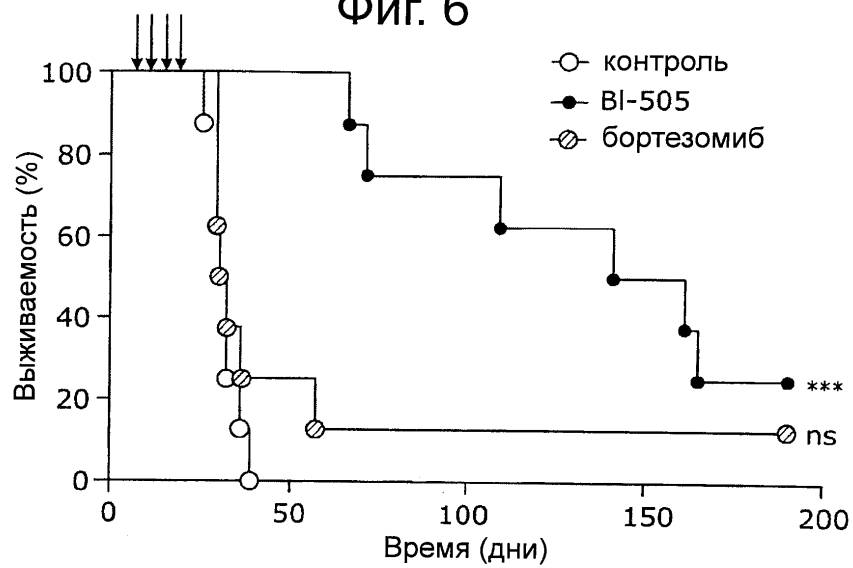
8/23

Фиг. 5



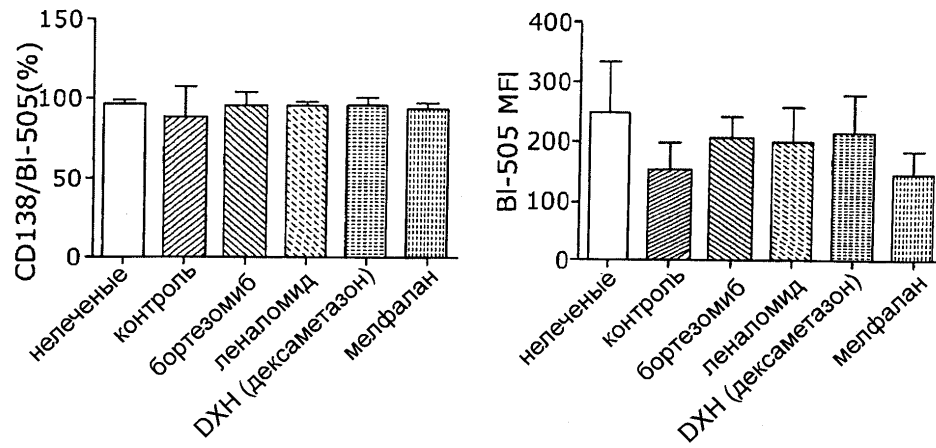
9/23

Фиг. 6



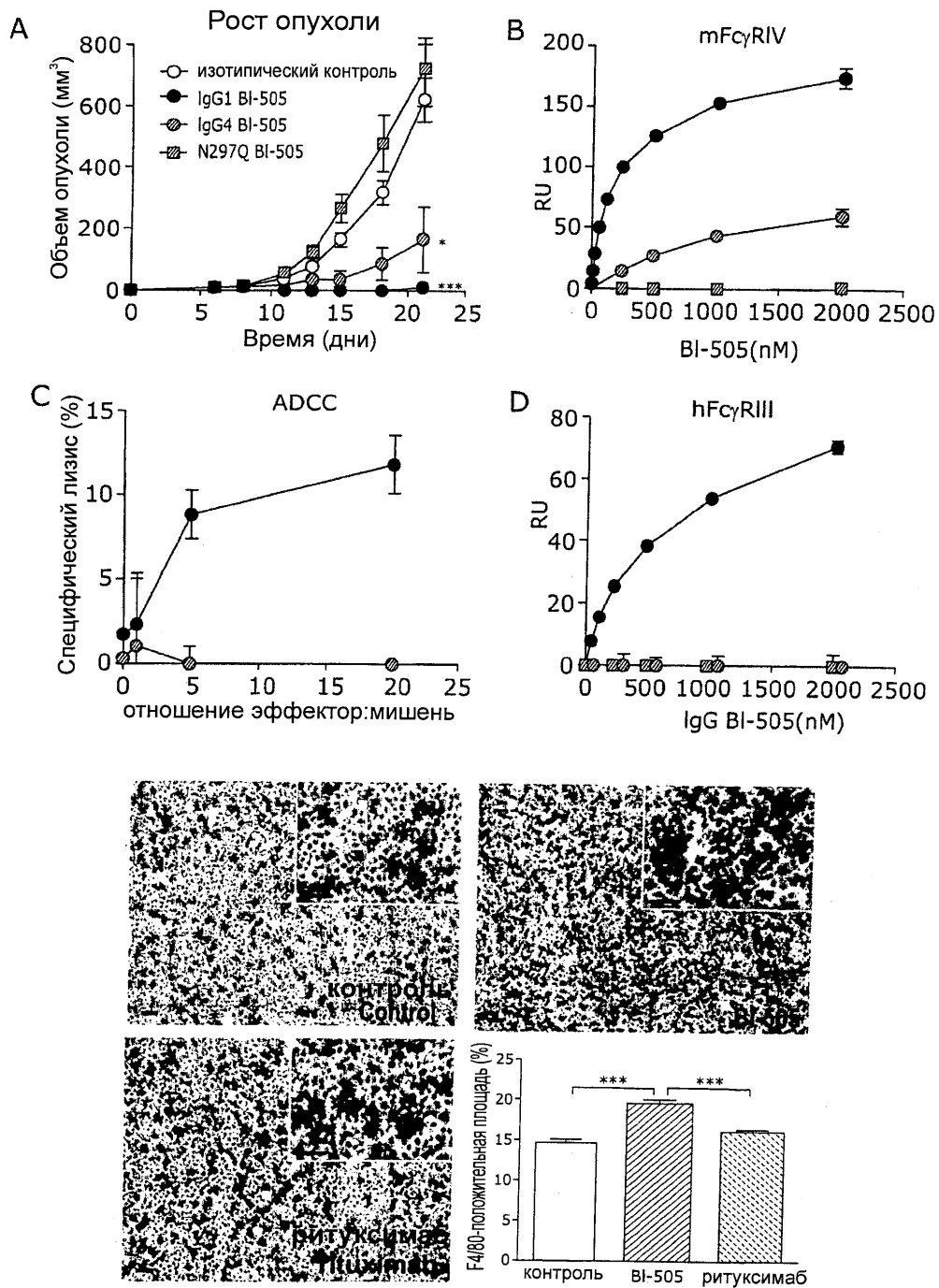
10/23

Фиг. 6 (продолжение)



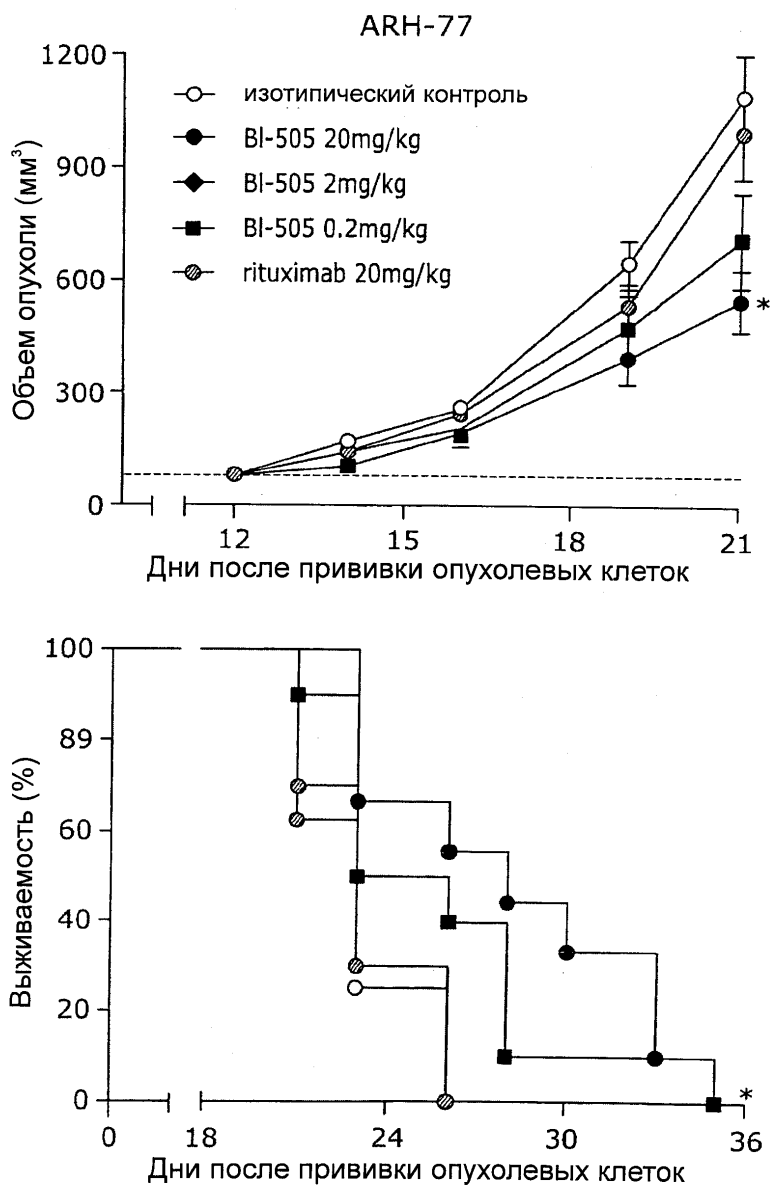
11/23

Фиг. 7



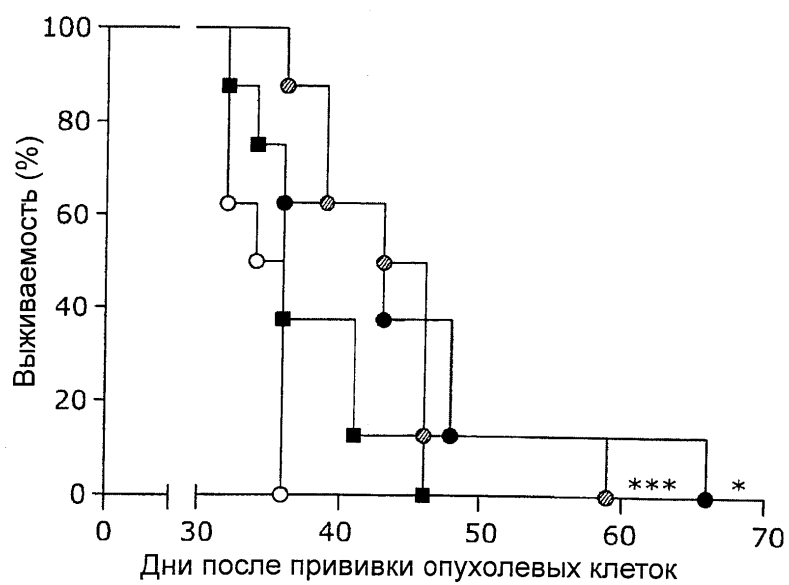
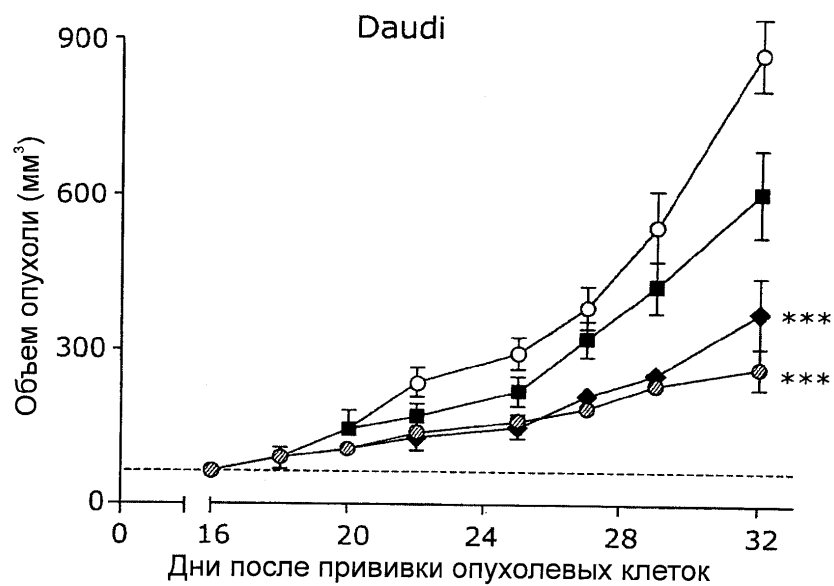
12/23

Фиг. 8



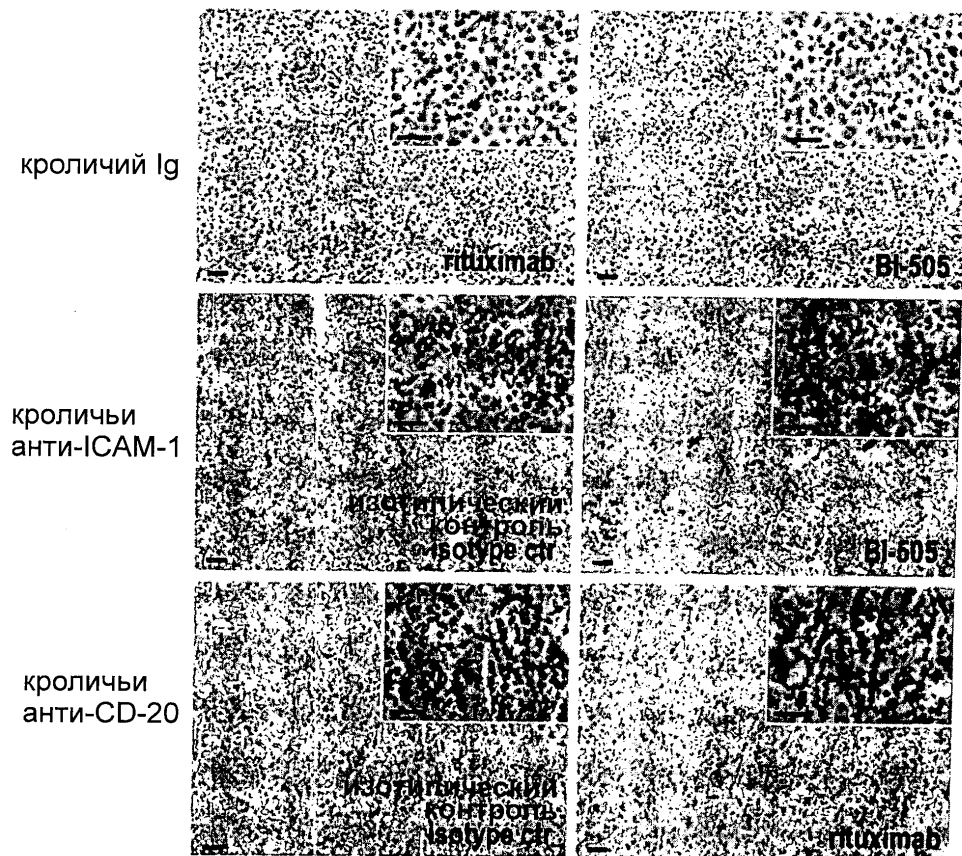
13/23

Фиг. 8 (продолжение)



14/23

Фиг. 9

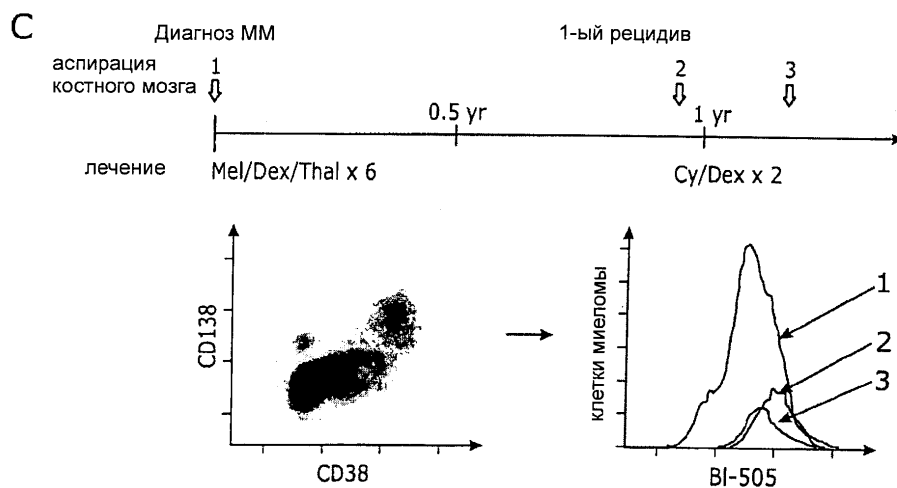
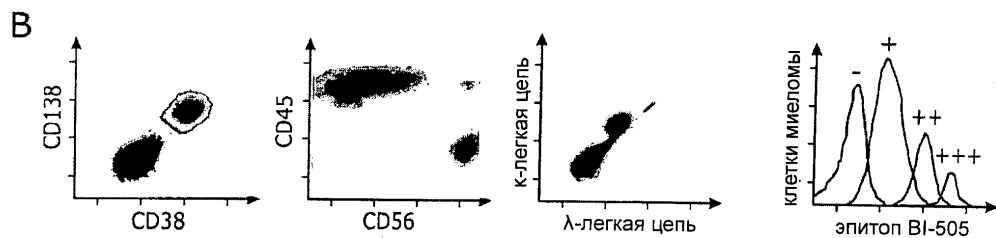


15/23

Фиг. 10

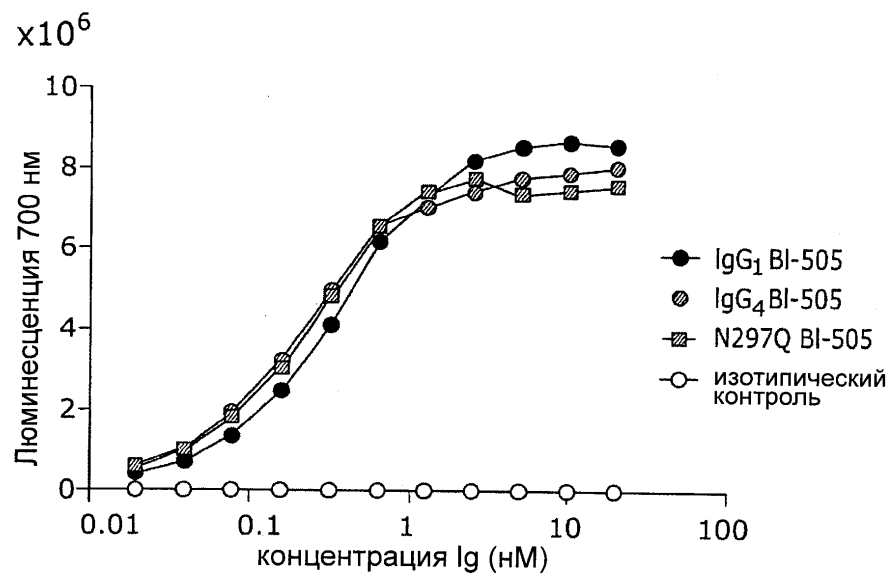
Панели иммунофенотипического окрашивания костного мозга при множественной миеломе

флуорохром	эпитоп антитела			
	панель 1	панель 2	панель 3	панель 4
FITC	CD38	CD38	CD38	cLamda
PE	CD117	CD27	CD10	cKappa
PerCP-Cy5-5	CD138	CD138	CD138	CD138
PE-Cy7	CD56	CD56	CD56	CD56
APC	CD20	CD28	BI-505 (ICAM-1)	CD38
APC-Cy7	CD19	CD19	CD19	CD19
краситель Pacific Blue	CD45	CD45	CD45	CD45



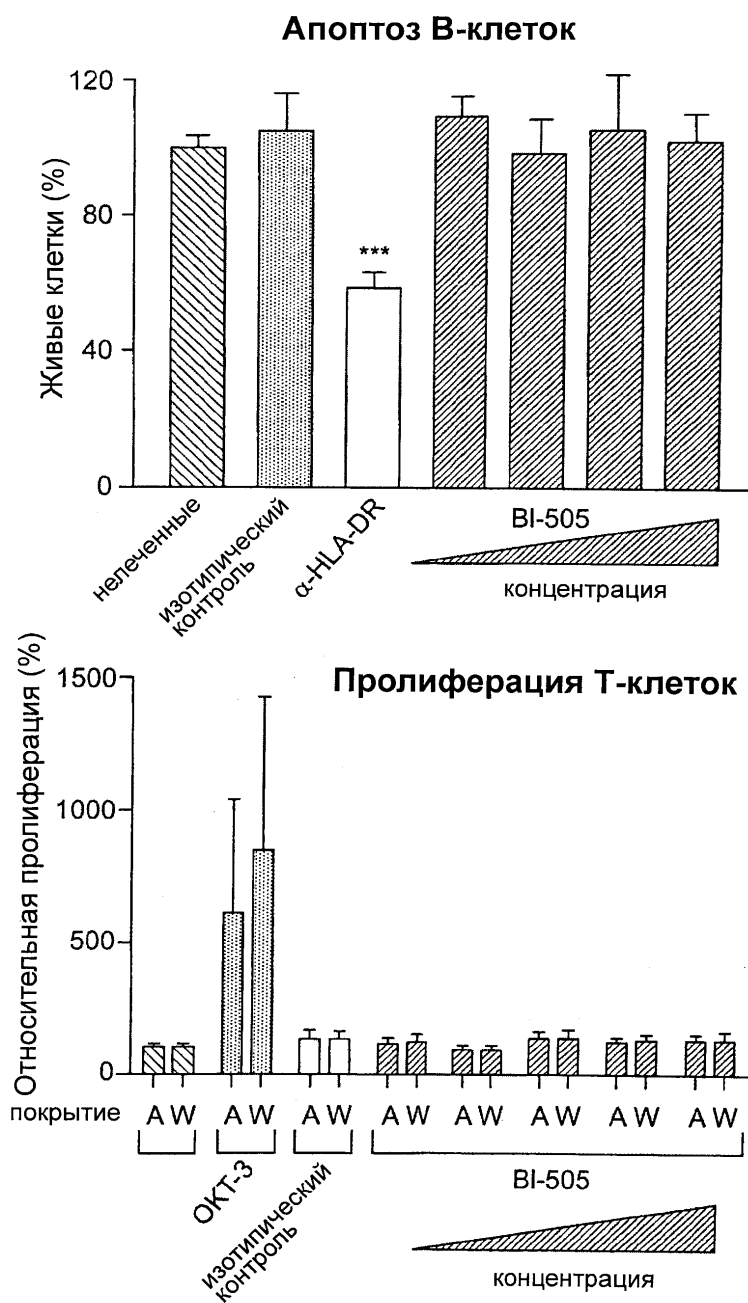
16/23

Фиг. 11



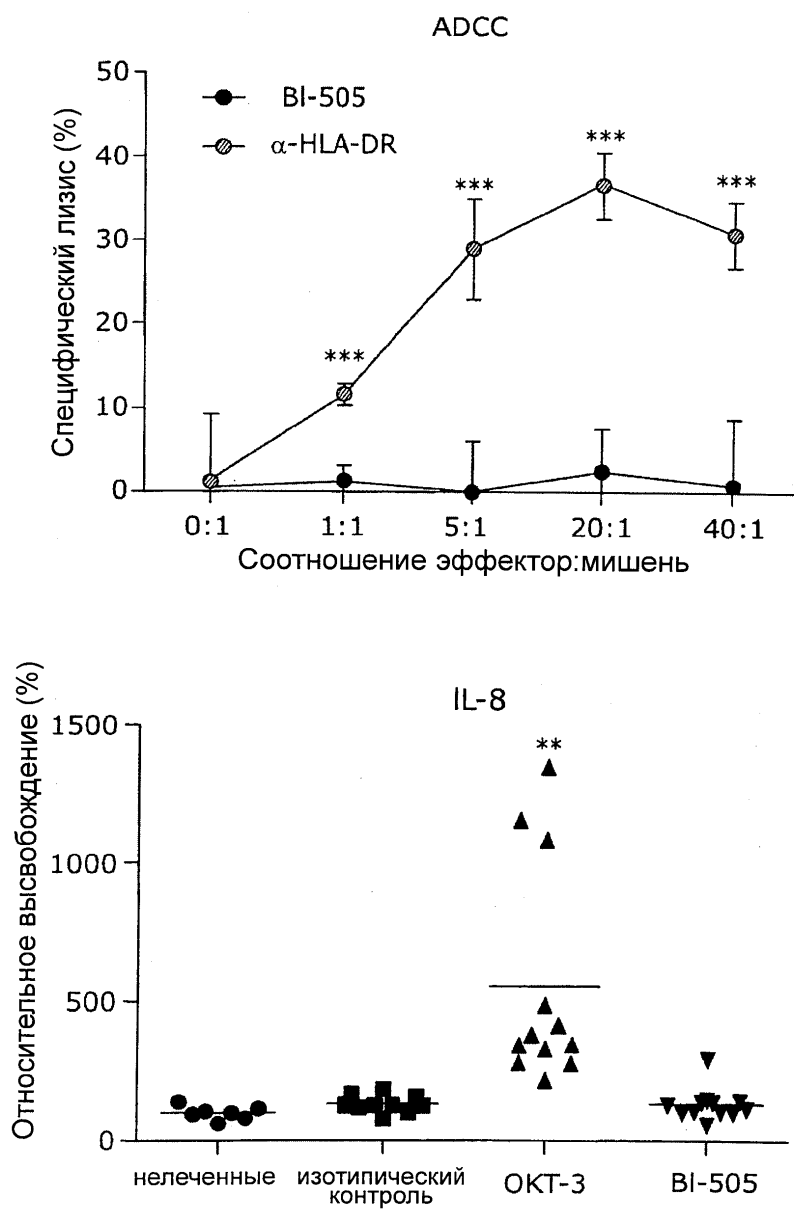
17/23

Фиг. 12



18/23

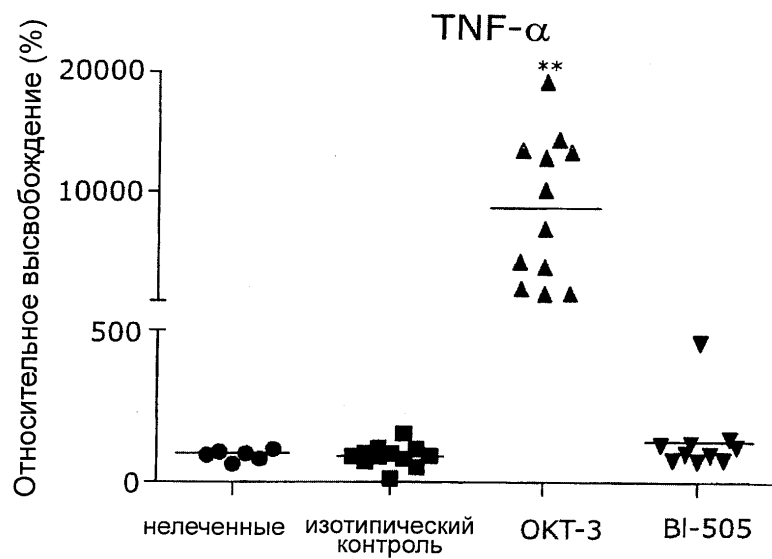
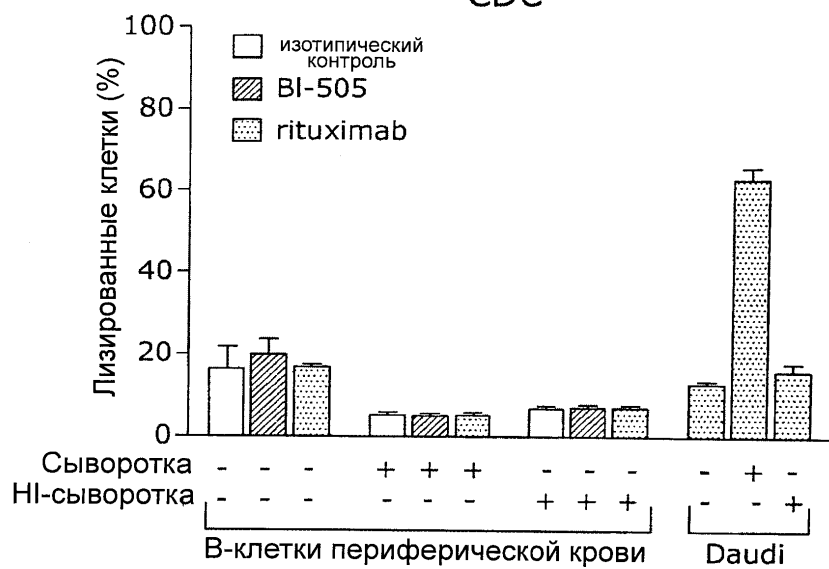
Фиг. 12 (продолжение)



19/23

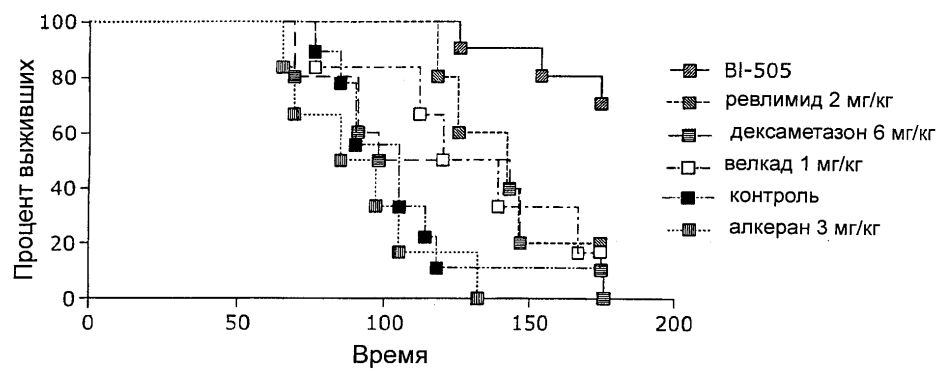
Фиг. 12 (продолжение)

CDC

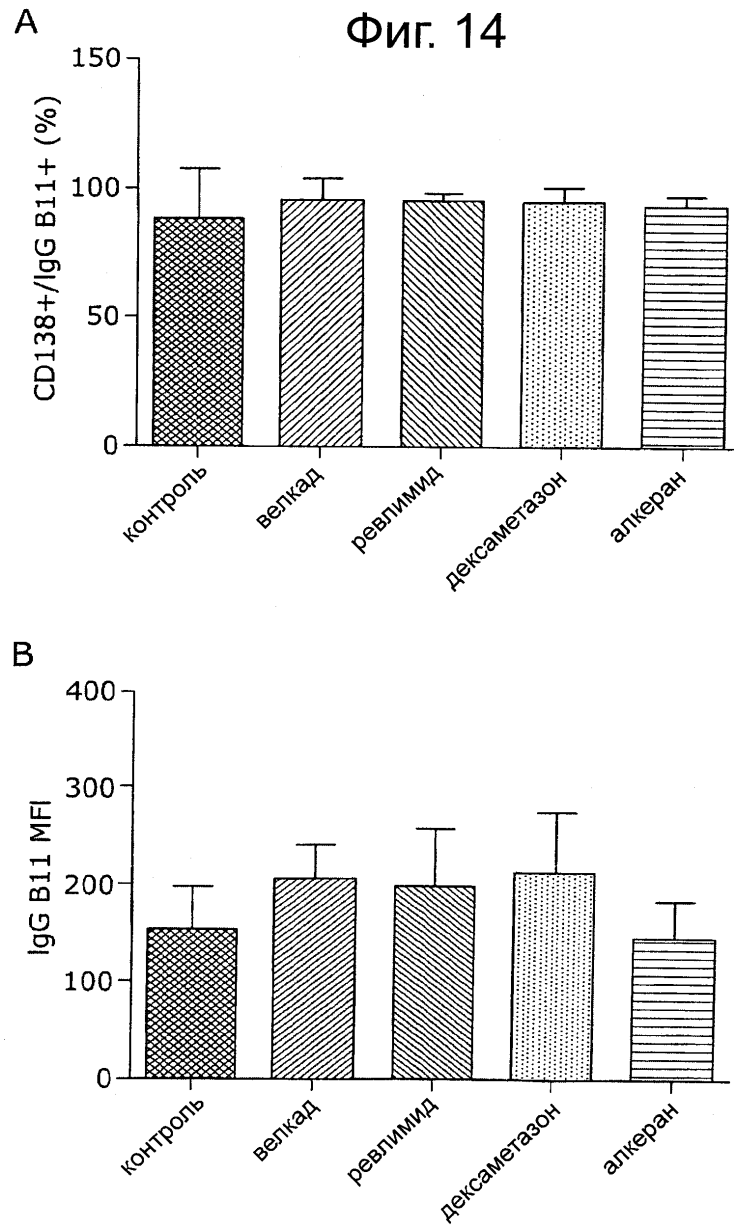


20/23

Фиг. 13



21/23



22/23

Фиг. 15

B11-VH

Нуклеотидная последовательность

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC
AGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATGGTATGATGGAAGTAATA
AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATACAGTG
GCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGT
GAGCTCA

Аминокислотная последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGK
GLEWVAFIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARYSGWYFDYWQGGLTVTVSS

23/23

Фиг. 15 (продолжение)

B11-VL

Нуклеотидная последовательность

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCG
GGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACAT
CGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGA
ACGGCCCCCAAACCTCATCTATGATAACAACAATCGGCCCT
CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT
GATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTCAGTGCTTGGC
TGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Аминокислотная последовательность

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTA
PKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQ
SYDSSLSAWLFGGGTKLTVLG