



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: **2004109149/15, 29.08.2002**

(30) Приоритет: **29.08.2001 US 60/316,537**

(43) Дата публикации заявки: **10.05.2005 Бюл. № 13**

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **29.03.2004**

(86) Заявка РСТ:  
**EP 02/09653 (29.08.2002)**

(87) Публикация РСТ:  
**WO 03/02127 (13.03.2003)**

Адрес для переписки:  
**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры",  
пат.пов. Г.Б. Егоровой**

(71) Заявитель(и):  
**ПАСИФИК НОРТВЕСТ РИСЕРЧ ИНСТИТЬЮТ  
(US)**

(72) Автор(ы):  
**ШУММЕР Микель (US),  
ХЕЛЛСТРОМ Ингегерд (US),  
ХЕЛЛСТРОМ Карл Эрик (US),  
ЛЕДБЕТТЕР Джеффри А. (US),  
ХЕЙДЕН-ЛЕДБЕТТЕР Марта (US)**

(74) Патентный поверенный:  
**Егорова Галина Борисовна**

(54) **ДИАГНОСТИКА КАРЦИНОМ**

Формула изобретения

1. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No.11, или ее вариант, производное или фрагмент, для установления присутствия в указанном биологическом образце (i) молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, или (ii) молекулы клеточной поверхности, при этом указанный образец включает клетку субъекта, а указанная молекула обладает антигенной детерминантой, которая является реакционноспособной в отношении указанного, по крайней мере, одного антитела, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

2. Способ по п.1, где антитело выбирают из группы, состоящей из поликлонального антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и одноцепочечного антитела.

3. Способ по п.1, где антитело включает аффинным образом очищенное антитело.

4. Способ по п.1, где обнаружение связывания антитела с антигенной детерминантой включает обнаружение радионуклида или обнаружение флуорофора.

5. Способ по п.1, где обнаружение связывания антитела с антигенной детерминантой включает обнаружение случая связывания между молекулой авидина и молекулой биотина или между молекулой стрептавидина и молекулой биотина.

6. Способ по п.1, где обнаружение связывания антитела с антигенной детерминантой

включает спектрофотометрическое обнаружение продукта ферментативной реакции.

7. Способ по п.1, где указанное, по крайней мере, одно антитело является обнаруживаемо меченным.

8. Способ по п.1, где указанное, по крайней мере, одно антитело не является обнаруживаемо меченным, и где обнаружение связывания антитела с антигенной детерминантой является косвенным.

9. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним антителом, для определения наличия в биологическом образце молекулы, выбранной из группы, состоящей из (i) молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, или (ii) молекулы клеточной поверхности, где указанный образец включает клетку субъекта, а указанная молекула обладает антигенной детерминантой, которая является реакционноспособной в отношении указанного, по крайней мере, одного антитела, сайт связывания антигена которого конкурентно ингибирует иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из 2H5, 3D8 и 4H4, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой, где каждый из 2H5, 3D8 и 4H4 специфически связывается с отдельным эпитопом полипептида HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No.11, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

10. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним антителом, для определения наличия в биологическом образце молекулы, выбранной из группы, состоящей из (i) молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, или (ii) молекулы клеточной поверхности, где указанный образец включает клетку субъекта, а указанная молекула обладает антигенной детерминантой, которая является реакционноспособной в отношении указанного антитела, сайт связывания антигена которого конкурентно ингибирует иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела 3D8, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой, где моноклональное антитело 3D8 специфически связывается с полипептидом HE4a, включающим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No.11, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

11. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No.11, или его варианта, производного или фрагмента, для установления присутствия в указанном биологическом образце молекулы, выбранной из группы, состоящей из (i) молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, или (ii) молекулы клеточной поверхности, при этом указанный образец включает клетку субъекта, а указанная молекула обладает антигенной детерминантой, которая является реакционноспособной в отношении указанного антитела, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного по крайней мере одного антитела с указанной антигенной детерминантой, где указанное, по крайней мере, одно антитело иммуноспецифически связывается с антигеном HE4a, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

12. Способ по п.11, где полипептид антигена HE4a также является иммуноспецифически реакционноспособным в отношении моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из 3D8, 2H5 и 4H4, где каждый из 2H5, 3D8 и 4H4 специфически связывается с отдельным эпитопом полипептида HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11.

13. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним антителом, специфическим для полипептида антигена HE4, включающего

аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11, или его варианта, производного или фрагмента, для установления присутствия в указанном биологическом образце молекулы, выбранной из группы, состоящей из (i) молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, или (ii) молекулы клеточной поверхности, при этом указанный образец включает клетку субъекта, а указанная молекула обладает антигенной детерминантой, которая является реакционноспособной в отношении указанного, по крайней мере, одного антитела, сайт связывания антигена которого конкурентно ингибирует иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из 2H5 и 4H4, где каждый из 2H5 и 4H4 связывается специфически с отдельным эпитопом антигенного полипептида HE4a, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой, где указанное, по крайней мере, одно антитело иммуноспецифически связывается с антигеном HE4a, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

14. Способ по п.13, где антиген HE4a также иммуноспецифически реакционноспособен в отношении моноклонального антитела 3D8.

15. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним иммобилизованным первым антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11, или его варианта, производного или фрагмента, для установления присутствия в указанном биологическом образце молекулы существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для специфического связывания указанного, по крайней мере, одного иммобилизованного первого антитела с указанным полипептидом антигена HE4a, и образования таким образом иммунного комплекса, удаления составляющих образца, которые не связываются специфически с указанным по крайней мере одним иммобилизованным первым антителом, и контактирование указанного иммунного комплекса с, по крайней мере, одним вторым антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, где сайт связывания антигена указанного, по крайней мере, одного второго антитела не ингибирует конкурентно сайт связывания антигена указанного, по крайней мере, одного иммобилизованного первого антитела, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения специфического связывания указанного, по крайней мере, одного второго антитела с указанным полипептидом антигена HE4a, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

16. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним иммобилизованным первым антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11, или его варианта, производного или фрагмента, для установления присутствия в указанном биологическом образце молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, где сайт связывания антигена указанного, по крайней мере, одного первого антитела конкурентно ингибирует иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела 3D8, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для специфического связывания указанного, по крайней мере, одного иммобилизованного первого антитела с указанным полипептидом антигена HE4a, и образования таким образом иммунного комплекса, удаления составляющих образца, которые не связываются специфически с указанным, по крайней мере, одним иммобилизованным первым антителом, и контактирование указанного иммунного комплекса с, по крайней мере, одним вторым антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, где сайт связывания антигена указанного, по крайней мере, одного второго антитела не ингибирует конкурентно иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела 2H5, где каждый из 3D8 и 2H5 специфически связывается с отдельным эпитопом полипептида HE4a, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения специфического связывания указанного, по крайней мере, одного второго антитела с указанным полипептидом антигена

HE4a, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

17. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с, по крайней мере, одним иммобилизованным первым антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11, или его варианта, производного или фрагмента, для установления присутствия в указанном биологическом образце молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, где сайт связывания антигена указанного, по крайней мере, одного первого антитела конкурентно ингибирует иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела 3D8, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для специфического связывания указанного по крайней мере одного иммобилизованного первого антитела с указанным полипептидом мезотелин-родственного антигена, и образования таким образом иммунного комплекса, удаления составляющих образца, которые не связываются специфически с указанным по крайней мере одним иммобилизованным первым антителом, и контактирование указанного иммунного комплекса с, по крайней мере, одним вторым антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, где сайт связывания антигена указанного, по крайней мере, одного второго антитела не ингибирует конкурентно иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела 4H4, где каждый из 3D8 и 4H4 специфически связывается с отдельным эпитопом полипептида HE4a, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения специфического связывания указанного, по крайней мере, одного второго антитела с указанным полипептидом антигена HE4a, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

18. Способ по любому из пп.1-17, дополнительно включающий определение присутствия в указанном образце, по крайней мере, одного растворимого маркера злокачественного заболевания, выбранного из группы, состоящей из мезотезин-родственного антигена, карциноэмбрионного антигена, CA125, сиалил TN, антигена плоскоклеточного рака, тканевого полипептидного антигена и плацентарной щелочной фосфатазы.

19. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование каждого из (i) первого биологического образца, полученного от первого субъекта, подозреваемого в наличии у него злокачественного болезненного состояния, и (ii) второго биологического образца, полученного от второго субъекта, для которого известно, что он не страдает от злокачественного болезненного состояния, с, по крайней мере, одним антителом, специфическим для полипептида антигена HE4a, включающего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11, или его варианта, производного или фрагмента, для установления присутствия в указанном первом и втором биологических образцах молекулы, выбранной из группы, состоящей из (i) молекулы, существующей в природе в растворимой форме в указанном образце, или (ii) молекулы клеточной поверхности, при этом указанные каждый первый и второй биологические образцы включают соответственно клетку указанного первого и второго субъектов, а указанная молекула обладает антигенной детерминантой, которая является реакционноспособной в отношении указанного, по крайней мере, одного антитела, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой, и сравнение уровня обнаруживаемого связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой в первом биологическом образце с уровнем обнаруживаемого связывания указанного антитела с указанной антигенной детерминантой во втором биологическом образце, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

20. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий обнаружение в биологическом образце, полученном от субъекта, наличия антитела, которое иммуноспецифически связывается с полипептидом антигена HE4a, где полипептид антигена HE4a включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:11, или его вариантом, производным или фрагментом.

21. Способ по любому из пп.1, 9, 11, 13, 15-17 и 19-20, где вариант полипептида антигена

HE4a представляет собой вариант сплайсинга.

22. Антитело, специфическое для полипептида антигена HE4a, включающее вариабельную область моноклонального иммуноглобулина, которая специфически связывается с полипептидом антигена HE4a, где указанный полипептид антигена HE4a включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11, и где полипептид антигена HE4a является гликозилированным.

23. Антитело по п.22, представляющее собой слитый белок.

24. Антитело по п.22, представляющее собой одноцепочечное антитело.

25. Антитело по п.22, которое выбирают из группы, состоящей из (i) антитела, которое специфически связывается с последовательностью полипептида антигена HE4a, представленной SEQ ID No:11, но не связывается специфически с полипептидной последовательностью, представленной SEQ ID No:9, (ii) антитела, которое специфически связывается с полипептидной последовательностью, представленной SEQ ID No:9, и которое специфически связывается с полипептидной последовательностью HE4a, представленной SEQ ID No:11.

26. Антитело по п.22, выбранное из группы, состоящей из моноклональных антител 2H5, 3D8 и 4H4, где каждый из 2H5, 3D8 и 4H4 специфически связывается с отдельным эпитопом полипептида HE4a, который включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID No:11.

27. Способ выявления наличия злокачественного заболевания у субъекта, включающий контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с обнаруживаемым меченым полипептидом HE4a, включающим аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:11, или его вариантом, производным или фрагментом, в условиях и в течение промежутка времени, достаточных для обнаружения связывания указанного полипептида HE4a с антителом, существующим в природе в растворимой форме в указанном образце, и обнаружение таким образом наличия злокачественного заболевания.

28. Способ по любому из пп.1, 9-11, 13, 15-17, 20 и 27, где биологический образец выбирают из группы, состоящей из крови, сыворотки крови, серозной жидкости, плазмы крови, лимфы, мочи, цереброспинальной жидкости, слюны, секрета слизистой оболочки, влагалищного секрета, асцитной жидкости, плевральной жидкости, перикардальной жидкости, перитонеальной жидкости, абдоминальной жидкости, культуральной среды, кондиционированной культуральной среды и промывочной жидкости.

29. Способ по любому из пп.1, 9-11, 13, 15-17, 19-20 и 27, где злокачественное заболевание выбирают из группы, состоящей из аденокарциномы, мезотелиомы, карциномы яичника, рака поджелудочной железы или немелкоклеточного рака легких.

30. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, включающий полипептид антигена HE4a и, по крайней мере, один домен слияния, причем полипептид HE4a включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:11, где полипептид антигена HE4a является гликозилированным, и где выделенная молекула нуклеиновой кислоты не является молекулой нуклеиновой кислоты, состоящей из нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO:9.

31. Слитый белок, включающий последовательность полипептида HE4a, слитую с доменом слияния, где последовательность полипептида HE4a представляет собой аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:11, или ее вариант, производное или фрагмент, и где антигенный полипептид HE4a является гликозилированным.

32. Слитый белок по п.31, где домен слияния представляет собой иммуноглобулин или его вариант или фрагмент.

33. Слитый белок по п.31, где последовательность полипептида HE4a отщепляется от домена слияния протеазой.

34. Слитый белок по п.31, где домен слияния представляет собой аффинно меченный полипептид, обладающий средством к лиганду.

35. Рекомбинантная конструкция экспрессии, включающая, по крайней мере, один промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой по п.30.

36. Конструкция экспрессии по п.35, где промотор представляет собой регулируемый промотор.

37. Конструкция экспрессии по п.35, где полипептид HE4a экспрессируется в виде белка, слитого с полипептидным продуктом второй последовательности нуклеиновой кислоты.

38. Конструкция экспрессии по п.37, где полипептидный продукт указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой константную область иммуноглобулина.

39. Рекомбинантная конструкция экспрессии по п.35, где конструкция экспрессии представляет собой рекомбинантную вирусную конструкцию экспрессии.

40. Клетка-хозяин, включающая рекомбинантную конструкцию экспрессии по любому из пп.35-39.

41. Клетка-хозяин по п.40, где клетка хозяин представляет собой либо прокариотическую клетку, либо эукариотическую клетку.

42. Способ продуцирования рекомбинантного слитого белка полипептида HE4a, включающий культивирование клетки-хозяина, включающей рекомбинантную конструкцию экспрессии, включающую, по крайней мере, один промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты по п.30.

43. Способ по п.42, где промотор представляет собой регулируемый промотор.

44. Способ продуцирования рекомбинантного слитого белка полипептида HE4a, включающий культивирование клетки-хозяина, инфицированной рекомбинантной вирусной конструкцией экспрессии по п.39.

45. Применение антитела, специфического для полипептида антигена HE4a, для получения лекарственного средства для лечения злокачественного заболевания, причем указанное антитело включает вариабельную область моноклонального иммуноглобулина, которая специфически связывается с полипептидом антигена HE4a, имеющим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:11.

46. Применение композиции, которая включает полипептид HE4a, включающий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:11, или его фрагмент, для получения лекарственного средства для лечения злокачественного заболевания.

47. Применение по п.46, где композиция индуцирует продуцирование антитела, которое способно специфически связываться с полипептидом HE4a, имеющим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:11, или его фрагментом.

48. Применение по п.46, где композиция индуцирует Т-лимфоцит, который способен специфически распознавать полипептид HE4a, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:11, или его фрагмент.

49. Применение по п.45 или 46, где злокачественное заболевание выбирают из группы, состоящей из аденокарциномы, мезотелиомы, карциномы яичника, рака поджелудочной железы или немелкоклеточного рака легких.