



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110789** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2012 11339</p> <p>(22) Дата подання заявки: 01.03.2011</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2016</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/310,692, 61/310,695, 61/311,057</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 04.03.2010, 04.03.2010, 05.03.2010</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.01.2013, Бюл.№ 1</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2016, Бюл.№ 4</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2011/026689, 01.03.2011</p>	<p>(72) Винахідник(и): Лу Дерік Т. (CA/US), Хуан Лін (US), Мур Пол А. (GB/US), Чень Франсін Чжіфень (US), Джонсон Леслі С. (US)</p> <p>(73) Власник(и): МАКРОДЖЕНІКС, ІНК., 9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2009008741 A1, 02.09.2009 WO 2008066691 A2, 05.06.2008 WO 2006016276 A2, 16.02.2006 WO 2008116219 A2, 25.09.2008 FIEGER CLAUDIA B ET AL, "The anti-B7-H3-4Ig antibody TES7 recognizes cancer stem cell lines, modulates angiogenic factor secretion, and exhibits potent anti-tumor activity in vivo", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, & 99TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; SAN DIEGO, CA, USA; APRIL 12 -16, 2008, vol. 49, PAGE 606 LIANG ET AL, "TES7, a monoclonal antibody targeting B7-H3, potency inhibits Hs-700T growth in vivo", THE FASEB JOURNAL, 01 January 2008, vol. 22, abstract</p>
---	--

(54) АНТИТІЛО, РЕАКТИВНЕ ВІДНОСНО В7-Н3, ЙОГО ІМУНОЛОГІЧНО АКТИВНІ ФРАГМЕНТИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до В7-Н3 зв'язувальних антитіл та їх фрагментів або діатіл, застосування вказаних антитіл для діагностики раку, фармацевтичної композиції, що містить вказане антитіло та застосування антитіла або фармацевтичної композиції для одержання лікарського засобу для лікування раку.

UA 110789 C2

Перехресні посилання на споріднені заявки:

Ця заявка заявляє пріоритет патентних заявок США із серійними номерами 61/310,692 (подана 4 березня 2010 року; знаходиться на стадії розгляду); 61/310,695 (подана 4 березня 2010 року; знаходиться на стадії розгляду), 61/311,057 (подана 5 березня 2010 року; знаходиться на стадії розгляду), кожна із цих заявок є введеною в дану заявку як посилання у своїй цілісності.

Посилання на список послідовностей:

Ця заявка включає один або більше списків послідовностей у відповідно з 37 C.F.R. 1.821 et seq., які є представленими як на паперовому носії, так і на носії для комп'ютера, при цьому розкриття як паперового носія, так і носія для комп'ютера є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

Передумови створення винаходу:

Галузь, до якої відноситься винахід:

Даний винахід відноситься до антитіл та їх фрагментів, які є імунореактивними стосовно рецептора B7-H3 ссавців та, зокрема, людини, та до його застосувань, зокрема у лікуванні раку та запалення. Таким чином, даний винахід, зокрема, відноситься до гуманізованих B7-H3-реактивних антитіл та їх імунореактивних фрагментів, які є здатними опосередковувати, та більш бажано, поліпшувати активацію імунної системи проти ракових клітин, які є асоційованими з різноманітними видами раку людини.

Опис рівня техніки:

Ріст та метастази пухлин у значній мірі залежать від їх здатності уникати хазяйського імунологічного контролю та долати захист хазяїна. Більшість пухлин експресують антигени, які можуть впізнаватися у різній мірі імунною системою хазяїна, проте у багатьох випадках може виникати неадекватна імунна відповідь з причини неефективної активації ефекторних Т-клітин (Khawli, L.A. *ma in.* (2008) "Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors," *Exper. Pharmacol.* 181: 291-328).

CD4+ Т-лімфоцити представляють суттєвих організаторів більшості імунних та аутоімунних відповідей (Dong, C. *ma in.* (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1): 39-48). Активация CD4+ хелперних Т-клітин була виявлена як така, що опосередковується шляхом ко-стимуляторної взаємодії між антиген-презентуючими клітинами та нестимульованими CD4+ Т-лімфоцитами. Є необхідними дві взаємодії (Viglietta, V. *ma in.* (2007) "Modulating Co-Stimulation," *Neurotherapeutics* 4: 666-675; Korman, A.J. *ma in.* (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90: 297-339). У першій взаємодії антиген-презентуючі клітини повинен демонструвати цільовий антиген, релевантно зв'язаний з основним комплексом клітинної гістосумісності так, що він може зв'язуватися з Т-клітинним рецептором ("TCR") нестимульованого CD4+ Т-лімфоцита. У другій взаємодії ліганд антиген-презентуючої клітини повинен зв'язуватися з CD28 рецептором CD4+ Т-лімфоцита (Dong, C. *ma in.* (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1): 39-48; Lindley, P.S. *ma in.* (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," *Immunol. Rev.* 229: 307-321). CD4+ хелперні Т-клітини, що піддаються впливу обох стимуляторних сигналів, потім стають здатними відповідати на цитокіни (такі, як інтерлейкін-2 та інтерлейкін-12) для перетворення нав Th1 клітини. Такі клітини продукують інтерферон-гамма (IFN- γ) та фактор альфа некрозу пухлин (TNF- α), що опосередковують запальні відповіді на цільові клітини, які експресують цільовий антиген. Також відбувається активація та проліферація В-клітин, що приводить до утворення антитіл, специфічних для цільового антигену (Bernard, A. *ma in.* (2005) "T and B Cell Cooperation: A Dance of Life ma Death," *Transplantation* 79: S8-S11). За відсутності обох ко-стимуляторних сигналів під час включення TCR Т-клітини входять у стан функціональної нечутливості, що називається клональною толерантністю (Khawli, L.A. *ma in.* (2008) "Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors," *Exper. Pharmacol.* 181: 291-328). При патологічних станах Th1 клітини є основними фігурами різноманітних органоспецифічних аутоімунних захворювань, таких, як діабет I типу, ревматоїдний артрит та розсіяний склероз (Dong, C. *ma in.* (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1): 39-48).

I. B7 надродина та B7-H3

Дослідження стосовно лігандів CD28 рецептора привели до характеристики набору споріднених молекул, які є відомими як B7 надродина (Coyle, A.J. *ma in.* (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function," *Nature Immunol.* 2(3): 203-209; Sharpe, A.H. *ma in.* (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126; Greenwald, R.J. *ma in.* (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23: 515-548; Collins, M. *ma in.* (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.*

6: 223.1-223.7; Loke, P. *ma in.* (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family and Regulatory T Cells." *Arthritis Res. Ther.* 6: 208-214; Korman, A.J. *ma in.* (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90: 297-339; Flies, D.B. *ma in.* (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3): 251-260; Agarwal, A. *ma in.* (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance," *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13: 366-372; Lenschow, D.J. *ma in.* (1996) "CD28/B7 System of T Cell Costimulation," *Ann. Rev. Immunol.* 14: 233-258; Wang, S. *ma in.* (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," *Microbes Infect.* 6: 759-766). На сьогоднішній день існує сім відомих членів цієї родини: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), індукційний ко-стимуляторний ліганд (ICOS-L), ліганд запрограмованої смерті 1 (PD-L1), ліганд запрограмованої смерті 2 (PD-L2), B7-H3 та B7-H4 (Collins, M. *ma in.* (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6: 223.1-223.7).

Члени родини B7 являють собою членів надродини імуноглобулінів з імуноглобулін-V-подібним та імуноглобулін-C-подібним доменом (наприклад, IgV-IgC) (Sharpe, A.H. *ma in.* (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126). Кожний з IgV та IgC доменів членів B7-родини кодується одиничними екзонами, з додатковими екзонами, які кодують лідерні послідовності, трансмембранні та цитоплазматичні домени. Цитоплазматичні домени є короткими, коливаються за довжиною від 19 до 62 амінокислотних залишків та можуть кодуватися множинними екзонами (Collins, M. *ma in.* (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6: 223.1-223.7). B7-H3 є унікальним в тому, що основна людська форма містить два позаклітинні тандемні IgV-IgC домени (тобто, IgV-IgC-IgV-IgC) (Collins, M. *ma in.* (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6: 223.1-223.7). Члени родини B7, як передбачається утворюють бек-ту-бек, нековалентні гомодимери на поверхні клітин, та такі димери були виявлені по відношенню до B7-1 (CD80) та B7-2 (CD86).

B7-1 (CD80) та B7-2 (CD86) мають подвійну специфічність для стимуляторного CD28 рецептора та інгібіторного CTLA-4 (CD152) рецептора (Sharpe, A.H. *ma in.* (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126). Незважаючи на те, що спочатку передбачалося, що вони включають тільки 2 Ig домени (IgV-IgC) (Chapoval, A. *ma in.* (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production," *Nature Immunol.* 2: 269-274; Sun, M. *ma in.* (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," *J. Immunol.* 168: 6294-6297), було ідентифіковано варіант, що містить чотири імуноглобулінові позаклітинні домени ("4Ig-B7-H3"), та виявлено, що він являє собою більш загальну форму людського білка (Sharpe, A.H. *ma in.* (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126). Не спостерігали ніякої функціональної відмінності між цими двома формами, оскільки природна мишача форма (2Ig) та людська 4Ig форма демонструють подібні функції (Hofmeyer, K. *ma in.* (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30): 10277-10278). Молекула 4Ig-B7-H3 інгібує обумовлений клітинами природних кілерів лізис ракових клітин (Castriconi, R. *ma in.* "Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34): 12640-12645). Людський B7-H3 (2Ig форма) було виявлено як такий, що сприяє активації Т-клітин та продукції IFN- γ шляхом зв'язування путативного рецептора на активованих Т-клітинах (Chapoval, A. *ma in.* (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production," *Nature Immunol.* 2: 269-274; Xu, H. *ma in.* (2009) "MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors," *Cancer Res.* 69(15): 5275-5281). Як B7-H4, так і B7-H1, є потужними інгібіторами імунної функції, коли експресуються на пухлинних клітинах (Flies, D.B. *ma in.* (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3): 251-260).

Спосіб дії B7-H3 є складним, оскільки білок опосередковує як ко-стимуляцію, так і ко-інгібування Т-клітин (Hofmeyer, K. *ma in.* (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30): 10277-10278; Martin-Orozco, N. *ma in.* (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4): 288-298; Subudhi, S.K. *ma in.* (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition," *J. Mol. Med.* 83: 193-202). B7-H3 зв'язується з (TREM)-подібним транскриптом 2 (TLT-2) та ко-стимулює активацію Т-клітин, а також зв'язується з ще неідентифікованим(и) рецептором(ами) для того, щоб опосередковувати ко-інгібування Т-клітин. Крім того, B7-H3 шляхом взаємодії з невідомим(и) рецептор(ами) являє собою інгібітор для клітин природних кілерів та клітин остеобластів (Hofmeyer, K. *ma in.* (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30): 10277-10278). Інгібування може здійснюватися шляхом взаємодії з членами основних шляхів передачі сигналу, за допомогою яких рецептор Т-клітин (TCR) регулює транскрипцію генів (наприклад, NFAT, NF- κ B

або AP-1 факторів).

B7-H3 ко-стимулює проліферацію CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітин. B7-H3 також стимулює продукцію IFN- γ та CD8⁺ літичну активність (Charoval, A. *ma in.* (2001) "*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production*," Nature Immunol. 2: 269–274; Sharpe, A.H. *ma in.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2: 116-126). Проте, можливо, білок також діє за допомогою NFAT (ядерний фактор для активованих Т-клітин), NF- κ B (ядерний фактор каппа В), та AP-1 (білок-1 активатора) фактори, що приводить до інгібування активації Т-клітин (Yi. K.H. *ma in.* (2009) "*Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*," Immunol. Rev. 229: 145-151). B7-H3 також передбачається як такий, що інгібує Th1, Th2 або Th17 *in vivo* (Prasad, D.V. *ma in.* (2004) "*Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells*," J. Immunol. 173: 2500-2506; Fukushima, A. *ma in.* (2007) "*B7-H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice*," Immunol. Lett. 113: 52-57; Yi. K.H. *ma in.* (2009) "*Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*," Immunol. Rev. 229: 145-151). Декілька незалежних досліджень показали, що клітини злоякісної пухлини людини демонструють значне підвищення експресії B7-H3 білка та що ця підвищена експресія була асоційована з підвищеною тяжкістю захворювання (Zang, X. *ma in.* (2007) "*The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition*," Clin. Cancer Res. 13: 5271-5279), це дає змогу передбачити, що B7-H3 використовується пухлинами як шлях уникнення імунітету (Hofmeyer, K. *ma in.* (2008) "*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278).

Молекули, що блокують здатність B7 молекули зв'язуватися з рецептором Т-клітини (наприклад, CD28), інгібують імунну систему, та вони були запропоновані для лікування аутоімунного захворювання (Linsley, P.S. *ma in.* (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Co-Stimulation*," Immunolog. Rev. 229: 307-321). Клітини нейробластоми, що експресують 4Ig-B7-H3, оброблені при використанні анти-4Ig-B7-H3 антитіл, були більш чутливими до NK клітин. Проте є неясним, чи може ця активність бути приписана тільки антитілам, направленим проти 4Ig-B7-H3 форми, оскільки усі описані антитіла, що виникали проти 4Ig-B7-H3, також зв'язувалися з двома Ig-подібними формами B7H3 (Steinberger, P. *ma in.* (2004) "*Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains*," J. Immunol. 172(4): 2352-2359 та Castriconi *ma in.* (2004) "*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34): 12640-12645).

B7-H3 не експресується на В або Т клітинах, що знаходяться у стані спокою, моноцитах або дендритних клітинах, проте він індукується на дендритних клітинах за допомогою IFN- γ та на моноцитах за допомогою GM-CSF (Sharpe, A.H. *ma in.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2: 116-126). Рецептор(и), що зв'язує(ють) B7-H3 не були повністю охарактеризовані. Рання робота передбачає, що один такий рецептор буде необхідним для швидкої та транзиторної підвищувальної регуляції на Т-клітинах після активації (Loke, P. *ma in.* (2004) "*Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells*," Arthritis Res. Ther. 6: 208-214). Нещодавно рецептор (TREM)-подібного транскрипта 2 (TLT-2, або TREML2) (King, R.G. *ma in.* (2006) "*Trem-Like Transcript 2 Is Expressed On Cells Of The Myeloid/Granuloid And B Lymphoid Lineage And Is Up-Regulated In Response To Inflammation*," J. Immunol. 176: 6012-6021; Klesney-Tait, J. *ma in.* (2006) "*The TREM Receptor Family And Signal Integration*," Nat. Immunol. 7: 1266–1273; Yi. K.H. *ma in.* (2009) "*Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4*," Immunol. Rev. 229: 145-151), який експресується на мієлоїдних клітинах, був продемонстрований як такий, що є здатним до зв'язування з B7-H3 та, таким чином, до ко-стимуляції активації CD8⁺ Т-клітин, зокрема (Zang, X. *ma in.* (2003) "*B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 100:10388–10392; Hashiguchi, M. *ma in.* (2008) "*Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cell-Like Transcript 2 (TLT-2) Is A Counter-Receptor For B7-H3 And Enhances T Cell Responses*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10495-10500; Hofmeyer, K. *ma in.* (2008) "*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278).

Додатково до його експресії на клітинах нейробластоми, людський B7-H3 є також відомими як такий, що експресується на різноманітних ракових клітинах (наприклад, клітинах різних видів раку шлунку, яєчника та недрібноклітинного раку легень). Експресія B7-H3 білка була імуногістологічно визначена у лініях пухлинних клітин (Charoval, A. *ma in.* (2001) "*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation And IFN- γ Production*," Nature Immunol. 2: 269–274; Saatian, B. *ma in.* (2004) "*Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation*," Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287: L217–L225; Castriconi *ma in.* (2004) "*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*," Proc. Natl. Acad. Sci.

(U.S.A.) 101(34):12640-12645); Sun, M. *ma in.* (2002) "Characterization of Mouse And Human B7-H3 Genes," J. Immunol. 168: 6294-6297). Експресія мРНК була виявлена у серці, нирках, яєчках, легенях, підшлунковій залозі, передміхуровій залозі, кишечнику та у клітинах остеобластів (Collins, M. *ma in.* (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," Genome Biol. 6: 223.1-223.7). На білковому рівні B7-H3 був виявлений у печінці, легенях, жовчному міхурі, яєчках, передміхуровій залозі, молочних залозах, плаценті та лімфоїдних органах (Hofmeyer, K. *ma in.* (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278).

II. Терапевтичні антитіла

На доповнення до їх відомого застосування у діагностиці, антитіла були продемонстровані як корисні як терапевтичні агенти. Наприклад, імунотерапія, або застосування антитіл для терапевтичних цілей, використовувалося останніми роками для лікування раку. Пасивна імунотерапія передбачає застосування моноклональних антитіл у лікуванні раку (див. наприклад, DeVita, Hellman, And Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, восьме видання (2008), DeVita, V. *ma in.* ред., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, стор. 537-547, 2979-2990). Ці антитіла можуть мати генетично детерміновану терапевтичну біологічну активність як для безпосереднього інгібування росту пухлинних клітин або їх виживання, так і стосовно їх здатності залучати активність клітин природних кілерів імунної системи організму. Ці агенти, які можуть вводитися самостійно або у поєднанні з опроміненням або хіміотерапевтичними агентами ритуксимабом та трастузумабом, що є схваленими для лікування не-ходжкінської лімфоми та раку молочної залози, відповідно, являють собою приклади таких терапевтичних агентів. Альтернативно, антитіла можуть використовуватися для створення кон'югатів антитіл, в яких антитіло є зв'язаним з токсичним агентом та направляє цей агент до пухлини шляхом специфічного зв'язування з пухлиною. Гемтузумаб озогаміцин являє собою приклад схваленого кон'югату антитіла, що використовується для лікування лейкемії.

Були розкриті моноклональні антитіла, що зв'язуються з раковими клітинами та мають потенційне застосування для діагностики та терапії (див., наприклад, наступні патентні заявки які розкривають, зокрема, деякі молекулярні маси цільових білків: патент США № 6,054,561 (200 кДа с-erbB-2 (Her2), та інші невідомі антигени, що мають розмір 40-200 кДа) та патент США № 5,656,444 (онкофетальні білки 50 кДа та 55 кДа)). Приклади антитіл, які перебувають на стадії клінічних досліджень та/або є схваленими для лікування солідних пухлин, включають: трастузумаб (антиген: 180 кДа, HER2/neu), едреколомаб (антиген: 40-50 кДа, Ер-САР), анти-людські глобули молочного жиру (НМFGI) (антиген >200 кДа, НМВ муцин), цетуксимаб (антигени: 150 кДа та 170 кДа, EGF рецептор), алемтузумаб (антиген: 21-28 кДа, CD52) та ритуксимаб (антиген: 35 кДа, CD20).

Антигенні мішені трастузумабу (Her-2 рецептор), який використовується для лікування раку молочної залози, та цетуксимабу (EGF рецептор), який перебуває на стадії клінічних досліджень та використовується для лікування деяких видів раку, є присутніми на деякому здатному до визначення рівні у великій кількості нормальних тканин людини, включаючи шкіру, кишечник, легені, яєчник, печінку та підшлункову залозу. Широта терапевтичного діапазону при застосуванні цих лікарських засобів, можливо, забезпечується відмінністю у рівнях експресії антигену або у доступі до цих сайтів, або активності антитіла у цих сайтах.

Інший тип імунотерапії являє собою активну імунотерапію, або вакцинацію, при використанні антигену, присутнього на специфічній(их) раковій(их) пухлині(ах), або ДНК конструкціях, що направляє експресію антигену, який потім втягується в імунну відповідь індивідуума, тобто, для індукції індивідуума з метою активної продукції антитіл проти його власного виду раку. Активна імунізація не використовувалася так часто, як пасивна імунотерапія або імунотоксини.

Були запропоновані деякі моделі розвитку захворювання (включаючи рак). Теорії коливаються від обумовленості захворювання однією інфективною/трансформуючою подією до еволюції у підвищеній мірі "подібного до захворювання" або "подібного до раку" типу тканини, що в результаті приводить до такого з повною патогенною або злоякісною здатністю. Деякі стверджують, що у випадку раку, наприклад, однієї мутаційної події є достатньо для того, що спричинити злоякісність, у той час, як інші доводять, що подальші зміни також є необхідними. Деякі дослідники також стверджують, що підвищене мутаційне навантаження та вид пухлини є необхідними як для ініціації, так і для розвитку неоплазії через ряд подій селекції мутацій на клітинному рівні. Деякі ракові мішені виявляються тільки у пухлинних тканинах, у той час як інші є присутніми у нормальних тканинах та піддаються підвищувальній регуляції та/або понадекспресуються у пухлинній тканині. У таких ситуаціях деякі дослідники передбачають, що понадекспресія є пов'язаною з набуттям злоякісності, у той час як інші передбачають, що понадекспресія являє собою тільки маркер тенденції у проходженні довгого шляху стану посилення захворювання

У деяких випадках ракові мішені, такі, як онкобілки, експресовані або понадекспресовані у пухлинах, були продемонстровані як такі, що є присутніми під час ембріонального та фетального розвитку та служать як регулятори росту та диференціації. Деякі дослідники виявили, що експресія цих онкобілків під час ембріонального та фетального розвитку, як

виявилось, є обмеженою специфічними тканинами та також обмежується специфічними стадіями розвитку. На противагу до цього, експресія цих онкобілків у дорослих була показана як така, що асоціюється з понадекспресією у пухлинному рості та/або порушенням функціонування пухлинних супресорних білків.

Ідеальне діагностичне та/або терапевтичне антитіло буде специфічним для антигену, присутнього у великій кількості видів раку, проте такого, що відсутнім або присутнім на дуже низьких рівнях у будь-якій нормальній тканині. Відкриття, характеристика та ізоляція нового антитіла, здатного до зв'язування з антигеном, що є специфічно асоційованим з раком, буде корисним у багатьох способах. По-перше, антитіло буде мати біологічну активність проти таких ракових клітин та буде здатним організувати відповідь імунної системи, забезпечуючи лікування захворювання. Антитіло може вводитися у формі єдиної терапії або у комбінації із сучасними способами лікування або використовуватися для одержання імунокон'югатів, зв'язаних з токсичними агентами. Антитіло з такою ж специфічністю, проте з низькою біологічною активністю або без біологічної активності при введенні самостійно може також бути корисним у тому, що антитіло може використовуватися для одержання імунокон'югату з радіоізотопом, токсином або хіміотерапевтичним агентом або ліпосомою, що містить хіміотерапевтичний агент, кон'югованої форми, яка є біологічно активною за рахунок того, що антитіло направляє токсин до клітин, які містять антиген.

Як обговорюється вище, антитіла та інші молекули, що специфічно зв'язуються з B7-H3, були описані (див., патенти США № 7,527,969; 7,368,554; 7,358,354; та 7,279,567; публікації патентних заявок США № US 20090087416; US 20090022747; US 20090018315; US2008116219; US20080081346; US 20050202536; US20030103963; US20020168762; PCT публікації WO 2008/116219; WO 2006/016276; WO 2004/093894; WO 04/001381; WO 2002/32375; WO 2002/10187 та WO 2001/094413; EP 1292619B; Modak, S. *ma in.* (March 1999) "*Disialoganglioside GD2 And Antigene 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small Round Cell Tumor (DSRCT) And Rhabdomyosarcoma (RMS)*," Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting, том 40:474 (90th Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research; Philadelphia, Pennsylvania, US; April 10-14, 1999; Modak, S. *ma in.* (March 2000) "*Radioimmunotargeting To Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9*," Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 41 :724; Modak, S. *ma in.* (2001) "*Monoclonal Antibody 8H9 Targets A Novel Cell Surface Antigene Expressed By A Wide Spectrum Of Human Solid Tumors*," Cancer Res. 61(10): 4048-4054; Steinberger, P. *ma in.* (2004) "*Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains*," J. Immunol. 172(4): 2352-2359; Xu, H. *ma in.* (2009) "*MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitor Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors*," Cancer Res. 69(15): 5275-6281).

Проте один аспект, бажаний для ідеального діагностичного та/або терапевтичного антитіла, буде являти собою відкриття та характеристику нових антитіл, здатних опосередковувати та, зокрема, поліпшувати активацію імунної системи проти ракових клітин (особливо ракових клітин людини), що є асоційованими з різними видами раку. Такі композиції будуть також корисними для відкриття лікарських засобів (наприклад, невеликих молекул) та для додаткової характеристики клітинної регуляції, росту та диференціації.

Таким чином, незважаючи на усі попередні відкриття, все ще залишається необхідність у поліпшених композиціях, здатних до зв'язування з раковими клітинами та до поліпшення або опосередковування імунної відповіді проти ракових клітин. Такі композиції можуть використовуватися для діагностики та лікування таких видів раку. Існує додаткова потреба, що базується на відкриттях, розкритих в даній заявці, у нових композиціях, що специфічно впізнають подвійні мішені на поверхні клітин, та які можуть, таким чином, модулювати або знижувати, або підвищувати здатність B7-H3 опосередковувати активацію Т-клітин або шляхом впізнання, або шляхом знищення ракових клітин, що експресують B7-H3. Об'єкт даного винаходу являє собою ідентифікацію таких композицій. Інший об'єкт даного винаходу являє собою забезпечення нових сполук для застосування в аналізі експресії B7-H3.

Як детально описується нижче, даний винахід відноситься до нових антитіл, включаючи, зокрема, перенацілювальні агенти з подвійною афінністю ("DART[™]s"), що включають модулятори активації B7-H3 Т-клітин, які є здатними впливати на активацію Т-клітин, а також нових антитіл, що зв'язуються з B7-H3 рецепторами ракових клітин та сприяють або

опосередковують загибель таких клітин. Даний винахід є направленим на такі композиції та на їх застосування у діагностиці та у лікуванні таких захворювань, як рак.

Короткий виклад суті винаходу:

Даний винахід відноситься до антитіл та їх фрагментів, що є імунореактивними стосовно ссавців, та особливо, людського B7-H3 рецептора, та до їх застосування, зокрема, у лікуванні раку та запалення. Винахід, таким чином, зокрема, стосується гуманізованих B7-H3-реактивних антитіл та їх імунореактивних фрагментів, які є здатними до опосередковування, та більш бажано, до підвищення активації імунної системи проти ракових клітин, що є асоційованими з різноманітними видами раку людини.

Більш детально, даний винахід стосується ізольованого антитіла або його імунореактивного фрагменту, де ізольоване антитіло або його фрагмент включає варіабельний домен, який специфічно зв'язується з позаклітинним доменом B7-H3, де антитіло конкурує за зв'язування B7-H3 з будь-яким з антитіл: BRCA69D, BRCA84D або PRCA157.

Винахід додатково відноситься до описаного вище ізольованого антитіла або його імунореактивного фрагменту, де антитіло або цей фрагмент включає варіабельний домен, що включає:

- (A) CDR₁ (SEQ ID NO: 21), CDR₂ (SEQ ID NO: 23) та CDR₃ (SEQ ID NO: 25) легкого ланцюга BRCA69D, та CDR₁ (SEQ ID NO: 29), CDR₂ (SEQ ID NO: 31) та CDR₃ (SEQ ID NO: 33) важкого ланцюга BRCA69D;
- (B) CDR₁ (SEQ ID NO: 5), CDR₂ (SEQ ID NO: 7) та CDR₃ (SEQ ID NO: 9) легкого ланцюга BRCA84D, та CDR₁ (SEQ ID NO: 13), CDR₂ (SEQ ID NO: 15) та CDR₃ (SEQ ID NO: 17) важкого ланцюга BRCA84D; або
- (C) CDR₁ (SEQ ID NO: 37), CDR₂ (SEQ ID NO: 39) та CDR₃ (SEQ ID NO: 41) легкого ланцюга PRCA157, та CDR₁ (SEQ ID NO: 45), CDR₂ (SEQ ID NO: 47) та CDR₃ (SEQ ID NO: 49) важкого ланцюга PRCA157.

Винахід додатково відноситься до будь-якого з описаних вище ізольованих антитіл або його імунореактивних фрагментів, де антитіло зв'язується з B7-H3, що ендогенно експресується на поверхні ракової клітини.

Винахід додатково відноситься до будь-якого з описаних вище ізольованих антитіл або його імунореактивних фрагментів, де антитіло зв'язується з B7-H3, що інтерналізується при зв'язуванні з B7-H, який експресується на поверхні ракової клітини.

Винахід додатково відноситься до будь-якого з описаних вище ізольованих антитіл або його імунореактивних фрагментів, де антитіло являє собою гуманізоване моноклональне антитіло.

Винахід додатково відноситься до будь-якого з описаних вище ізольованих антитіл або його імунореактивних фрагментів, де антитіло являє собою модифіковане антитіло, що включає варіант Fc ділянки людського IgG1, де варіант Fc ділянки людського IgG1 включає принаймні одну амінокислотну модифікацію стосовно Fc ділянки вихідного антитіла, при цьому амінокислотна(i) модифікація(ї) включає амінокислотну(i) модифікацію(ї), що змінює(ють) афінність або авідність варіантної Fc ділянки для зв'язування з FcγR, так, що модифіковане антитіло демонструє поліпшену ефекторну функцію у порівнянні із вихідним антитілом.

Винахід додатково відноситься до будь-якого з описаних вище ізольованих антитіл або його імунореактивних фрагментів, де модифікація Fc ділянки включає:

(A) принаймні одну заміну, вибрану з групи, що складається з:

(1) F243L; (5) Y300L;

(2) D270E; (6) V305I;

(3) R292P; (7) A330V; та

(4) S298N; (8) P396L;

(B) принаймні одну заміну з двох амінокислотних залишків, де заміна є вибраною з групи, що складається з:

(1) F243L та P396L;

(2) F243L та R292P; та

(3) R292P та V305I;

(C) принаймні одну заміну з трьох амінокислотних залишків, де заміна є вибраною з групи, що складається з:

- (1) F243L, R292P та Y300L;
- (2) F243L, R292P та V305I;
- 5 (3) F243L, R292P та P396L; та
- (4) R292P, V305I та P396L;

(D) принаймні одну заміну з чотирьох амінокислотних залишків, де заміна є вибраною з групи, що складається з:

- (1) F243L, R292P, Y300L та P396L; та
- 10 (2) F243L, R292P, V305I та P396L;

ог

(E) заміну принаймні п'яти амінокислотних залишків: F243L, R292P, Y300L, V305I та P396L.

Винахід додатково відноситься до описаного вище антитіла, де антитіло включає заміни:

- (A) F243L, R292P та Y300L;
- 15 (B) L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L; або
- (C) F243L, R292P, Y300L, V305I та P396L.

Винахід додатково відноситься до описаного вище антитіла, де антитіло включає:

- (A) варіабельний домен, що включає CDR₁ (SEQ ID NO: 5), CDR₂ (SEQ ID NO: 7) та CDR₃ (SEQ ID NO: 9) легкого ланцюга BRCA84D, та CDR₁ (SEQ ID NO: 13), CDR₂ (SEQ ID NO: 15) та CDR₃ (SEQ ID NO: 17) важкого ланцюга BRCA84D; та
- 20 (B) модифікацію Fc ділянки, що включає заміни: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L.

Винахід додатково відноситься до описаного вище антитіла, де антитіло являє собою химерне антитіло або гуманізоване антитіло.

- 25 Винахід додатково відноситься до описаних вище ізолюваних антитіл або їх імунореактивних фрагментів, де антитіло включає:

(A) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність hBRCA84D-2 VL (SEQ ID NO: 89);

(B) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність hBRCA84D-2 VH (SEQ ID NO: 99); та

- 30 (C) Fc-ділянку, що має заміни: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L.

Винахід додатково відноситься до гібридоми, що секретирує моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з позаклітинним доменом B7-H3, де антитіло конкурує за зв'язування B7-H3 з будь-яким із антитіл: BRCA69D, BRCA84D або PRCA157.

- 35 Винахід додатково відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує будь-яке з описаних вище ізолюваних антитіл або імунореактивних фрагментів.

Винахід додатково відноситься до перенацілювального реагенту з подвійною афінністю (DART™), де реагент включає:

- (A) поліпептидний ланцюг I, що включає епітопзв'язувальний домен VL імунoglobуліну, специфічний для зв'язування B7-H3, та епітопзв'язувальний домен VH, специфічний для зв'язування молекули, відмінної від B7-H3; та
- 40 (B) поліпептидний ланцюг II, що включає епітопзв'язувальний домен VH імунoglobуліну, специфічний для зв'язування B7-H3, та епітопзв'язувальний домен VL, специфічний для зв'язування молекули, відмінної від B7-H3;

- де поліпептидні ланцюги I та II є асоційованими разом так, що утворюють функціональні епітопзв'язувальні домени, здатні до зв'язування B7-H3 та молекули, відмінної від B7-H3.

Винахід додатково відноситься до описаного вище перенацілювального реагенту з подвійною афінністю (DART™), де молекула, відмінна від B7-H3, що може зв'язуватися за допомогою DART™, являє собою гаптен, та зокрема, де гаптен являє собою флуоресцеїн ізотіоціанат.

- 50 Винахід додатково відноситься до описаного вище перенацілювального реагенту з подвійною афінністю (DART™), де молекула, відмінна від B7-H3, що може зв'язуватися за допомогою DART™, являє собою рецептор Т-клітини або рецептор NKG2D.

- Винахід додатково відноситься до описаного вище перенацілювального реагенту з подвійною афінністю (DART™), де молекула, відмінна від B7-H3, що може зв'язуватися за допомогою DART™, являє собою асоційований з пухлиною антиген, та зокрема, де асоційований з пухлиною антиген є вибраним із групи, що складається з A33; ADAM-9; ALCAM; BAGE; бета-катеніну; CA125; карбоксипептидази M; CD103; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD36; CD40/CD154; CD45; CD46; CD5; CD56; CD79a/CD79b; CDK4; CEA; CTLA4; цитокератину 8; EGF-R; EphA2; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2/GD3/GM2; gp100;
- 60 HER-2/neu; людського папіломавірусу-E6; людського папіломавірусу-E7; інтегрин-альфа-V-бета-

6; JAM-3; KID3; KID31; KSA (17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-ацетилглюкозамінілтрансферази; онкостатину M; p15; PIPA; PSA; PSMA; ROR1; sTn; рецептора TNF- β ; рецептора TNF- α ; рецептора TNF- γ ; рецептора трансферину; та VEGF рецептора.

Винахід додатково відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидний ланцюг будь-якого з описаних вище перенацілювальних реагентів з подвійною афінністю (DART™).

Винахід додатково відноситься до фармацевтичної композиції, що включає (i) терапевтично ефективну кількість будь-якого з описаних вище ізольованих антитіл або імунореактивних фрагментів або перенацілювальних реагентів з подвійною афінністю (DART™) та (ii) фармацевтично прийнятний носій.

Винахід додатково відноситься до описаної вище фармацевтична композиція, де антитіло являє собою гуманізоване антитіло, що включає:

(A) варіабельний домен, що включає CDR₁ (SEQ ID NO: 5), CDR₂ (SEQ ID NO: 7) та CDR₃ (SEQ ID NO: 9) легкого ланцюга BRCA84D, та CDR₁ (SEQ ID NO: 13), CDR₂ (SEQ ID NO: 15) та CDR₃ (SEQ ID NO: 17) важкого ланцюга BRCA84D; та

(B) модифікацію Fc ділянки, що включає заміни: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L.

Винахід додатково відноситься до описаної вище фармацевтичної композиції, де антитіло являє собою гуманізоване антитіло, що включає:

(A) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність hBRCA84D-2 VL (SEQ ID NO: 89);

(B) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність hBRCA84D-2 VH (SEQ ID NO: 99); та

(C) Fc-ділянку, що має заміни: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L.

Винахід додатково відноситься до будь-якої з описаних вище фармацевтичних композицій, що додатково включає один або більше додаткових протиракових агентів, та зокрема, де додатковий протираковий агент являє собою хімотерапевтичний агент, радіаційний терапевтичний агент, гормональний терапевтичний агент або імунотерапевтичний агент.

Винахід додатково відноситься до застосування будь-якого з описаних вище антитіл або імунореактивних фрагментів або перенацілювальних агентів з подвійною афінністю (DART™) у діагностиці раку, де ізольоване антитіло, імунореактивний фрагмент або DART™ є міченим за допомогою здатної до визначення мітки.

Винахід додатково відноситься до описаного вище застосування, що відрізняється тим, що рак характеризується присутністю ракової клітини, вибраної з групи, яка складається з клітини пухлини надниркової залози, раку, асоційованого зі СПІДом, альвеолярної саркоми м'яких тканин, астроцитарної пухлини, раку жовчного міхура, раку кісток, раку головного та спинного мозку, метастатичного раку мозку, раку молочної залози, пухлин каротидного гломуса, раку шийки матки, хондросаркоми, хордоми, хромофобної карциноми ниркових клітин, гіпернефродної пухлини нирки, раку кишечника, колоректального раку, шкірної доброякісної фіброзної гістіоцити, десмопластичної дрібнокруглоклітинної пухлини, епіндиміоми, саркоми Юїнга, позаскелетної міксоїдної хондросаркоми, фіброгенного недовершеного остеогенезу, фіброзної дисплазії кісток, раку жовчного міхура або жовчної вивідної протоки, раку шлунково-кишкового тракту, гестаційного трофобластного захворювання, пухлини зародкової клітини, раку голови та шиї, карциноми печінкових клітин, пухлини острівкових клітин, саркоми Капоші, раку нирки, лейкемії, ліпоми/доброякісної ліпоматозної пухлини, ліпосаркоми/злоскісної ліпоматозної пухлини, печінкового раку, лімфоми, раку легень, медулобластоми, меланоми, менінгіоми, множинної ендокринної неоплазії, множинної міеломи, мієлодиспластичного синдрому, нейробластоми, нейроендокринних пухлин, раку яєчника, раку підшлункової залози, папілярної карциноми щитовидної залози, пухлини парашитовидної залози, педіатричного раку, пухлини капсули периферичного нерву, феохромоцити, пухлини гіпофізу, раку передміхурової залози, задньої ювеальної меланоми, виключного гематологічного розладу, ниркового метастатичного раку, паличковидної пухлини, рабдоміосаркоми, саркоми, раку шкіри, саркоми м'яких тканин, раку лускатих клітин, раку шлунка, сировіальної саркоми, тестикулярної саркоми, тимусної карциноми, тимоми, метастатичного раку щитовидної залози та раку матки.

Винахід додатково відноситься до застосування будь-якого з описаних вище антитіл або імунореактивних фрагментів або перенацілювальних реагентів з подвійною афінністю (DART™) в одержанні лікарського засобу для лікування або запобігання раку у пацієнта. Винахід додатково відноситься до таких застосувань, які відрізняються тим, що рак характеризується присутністю ракової клітини, вибраної з групи, яка складається з клітини пухлини надниркової залози, раку, асоційованого зі СПІДом, альвеолярної саркоми м'яких тканин, астроцитарної пухлини, раку жовчного міхура, раку кісток, раку головного та спинного мозку, метастатичного

раку мозку, раку молочної залози, пухлин каротидного гломуса, раку шийки матки, хондросаркоми, хордоми, хромофобної карциноми ниркових клітин, гіпернефроїдної пухлини нирки, раку кишечника, колоректального раку, шкірної доброякісної фіброзної гістіоцитомі, десмопластичної дрібнокруглоклітинної пухлини, епіндимомі, саркоми Юїнга, позаскелетної міксоїдної хондросаркоми, фіброгенного недовершеного остеогенезу, фіброзної дисплазії кісток, раку жовчного міхура або жовчної вивідної протоки, раку шлунково-кишкового тракту, гестаційного трофобластного захворювання, пухлини зародкової клітини, раку голови та шиї, карциноми печінкових клітин, пухлини острівкових клітин, саркоми Капоші, раку нирки, лейкемії, ліпоми/доброякісної ліпоматозної пухлини, ліпосаркоми/злоякісної ліпоматозної пухлини, печінкового раку, лімфоми, раку легень, медулобластоми, меланоми, менінгіоми, множинної ендокринної неоплазії, множинної мієломи, мієлодиспластичного синдрому, нейробластоми, нейроендокринних пухлин, раку яєчника, раку підшлункової залози, папілярної карциноми щитовидної залози, пухлини паращитовидної залози, педіатричного раку, пухлини капсули периферичного нерву, феохромоцитомі, пухлини гіпофізу, раку передміхурової залози, задньої ювальної меланоми, виключного гематологічного розладу, ниркового метастатичного раку, паличковидної пухлини, рабдоміосаркоми, саркоми, раку шкіри, саркоми м'яких тканин, раку лускатих клітин, раку шлунка, синовіальної саркоми, тестикулярної саркоми, тимусної карциноми, тимомі, метастатичного раку щитовидної залози та раку матки.

Винахід додатково відноситься до описаних вище застосувань, які відрізняються тим, що застосування додатково включає введення однієї або більше додаткових протиракових терапій, вибраних з групи, що складається з хіміотерапії, імунотерапії, радіаційної терапії, гормональної терапії та хірургії.

Короткий опис малюнків

Фігури 1A-1B показують результати ІНС досліджень, що проводилися при використанні зразків нормальних тканин підшлункової залози, печінки, легені та товстого кишечника із застосуванням BRCA84D при дозі 0,625 мкг/мл та 0,078 мкг/мл (Фігура 1A) та нормальної тканини серця, нирки та надниркової залози при використанні BRCA84D при дозі 0,625 мкг/мл (Фігура 1B).

Фігура 2 показує результати ІНС досліджень, що проводилися при використанні зразків ракових тканин підшлункової залози, молочної залози, товстого кишечника та легені із застосуванням BRCA84D при дозі 0,625 мкг/мл та 0,078 мкг/мл.

Фігури 3A-3D показують залежне від дози перенацілене знищення, опосередковане антитілами згідно з даним винаходом. Фігури 3A-3B показують залежне від дози перенацілене знищення клітин A498 карциноми ниркових клітин (із нестимульованими PBMC через 18 годин (LDH)) моноклональними антитілами, реактивних стосовно B7-H3 (співвідношення ефектор : мішень 20:1) (Фігура 3A: BRCA68D, BRCA69D, PRCA157, GB8, TCR-4420; Фігура 3B: OVCA22, BRCA84D, TDH6, TES7, TCR-4420). Фігури 3C-3D показують залежне від дози перенацілене знищення клітин A549 раку легень (із нестимульованими PBMC через 18 годин (LDH)) моноклональними антитілами, реактивних стосовно B7-H3 (співвідношення ефектор : мішень 30:1) (Фігура 3C: BRCA84D, OVCA22, PRCA157, TES7; Фігура 3D: TDH6, BRCA68D, BRCA69D).

Фігури 4A-4B показують здатність анти-B7-H3 антитіл до зв'язування з розчинним B7H3-2Ig (Фігура 4A) та розчинним B7H3-4Ig B7-H3 (Фігура 4B) (концентрація антитіла складає 100 нМ). Позначення: (A) BLA8; (B) BRCA165; (C) BRCA68D; (D) BRCA69D; (E) BRCA84D; (F) GB8; (G) LUCA1; (H) LUCA50; (I) OVCA21; (J) OVCA22; (K) PA20; (L) PRCA123; (M) SG24; (N) SG27; (O) STO9; (P) TDH4 (184-192); (Q) TDH4; (R) TDH5; (S) TES7. Вертикальне положення позначення корелює з положенням відповідної кривої.

Фігури 5A-5S демонструють зв'язувальну афінність між антигенами у розчині та такими, що є захопленими моноклональними антитілами (суцільні лінії; B7-H3(4Ig) 100 нМ; пунктирні лінії; B7-H3, 100 нМ).

Фігури 6A-6I показують результати BIACORE™ аналізів B7-H3 антитіл, імобілізованих на B7-H3-2Ig (пунктирні сірі лінії) або B7-H3-4Ig (суцільні чорні лінії). Антитіла титрували від 0,063 мкМ до 1 мкМ. Час позначений у секундах.

Фігура 7 забезпечує порівняння BIACORE™ аналізу антитіл PRCA157, BRCA69D, BLA8, PA20, BRCA84D, GB8 та SG27.

Фігура 8 забезпечує BIACORE™ аналіз, який демонструє, що антитіла BRCA68D, BRCA69D та PRCA157 не конкурують з BRCA84D за зв'язування з людським B7-H3.

Фігури 9A-9B показують результати досліджень здатності анти-B7-H3 антитіл даного винаходу ставати інтерналізованими при зв'язуванні з раковими клітинами (Фігура 9A, CSC клітини передміхурової залози; Фігура 9B, Hs700t клітини підшлункової залози).

Фігури 10A-10F показують здатність анти-B7-H3 антитіл згідно з даним винаходом

перехресно блокувати одне одного, виявляючи, таким чином, перекривання відмінних епітопів. Використовували десятикратний надлишок конкурентного антитіла.

Фігури 11A-11B показують вирівнювання амінокислотних залишків варіабельних легких ланцюгів (Фігура 11A) або варіабельних важких ланцюгів (Фігура 11B) BRCA84D та його гуманізованої похідної, hBRCA84D.

Фігура 12 показує відносні зв'язувальні афінності похідних легкого ланцюга hBRCA84D: BRCA84D-3VL, BRCA84D-4VL та BRCA84D-5VL для людського B7-H3.

Фігура 13 показує відносні зв'язувальні афінності hBRCA84D похідних важкого ланцюга hBRCA84D: BRCA84D-2VH, BRCA84D-3VH та BRCA84D-4VH для людського B7-H3.

Фігура 14 показує відносні зв'язувальні афінності (1) антитіл, що містять hBRCA84D-2VL та hBRCA84D-2VH (досліди 1 та 2), (2) химерного BRCA84D, (3) антитіла, що містить hBRCA84D-5VL, та химерного BRCA84D-HC та (4) антитіла, що містить hBRCA84D-5VL та hBRCA84D-2VH.

Фігура 15 показує здатність Fc-модифікованих гуманізованих анти-B7-H3 антитіл до інгібування пухлинного росту клітин HT-1197 карциноми сечового міхура *in vivo* у ксенотрансплантатній мишачій модельній системі. Fc-модифіковане hBRCA84D-2 антитіло (що включає Fc модифікації L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) вводили мишам (при дозі 1 мкг/кг, 10 мкг/кг або 20 мкг/кг) через 7 днів, 14 днів, 21 день та 28 днів після імплантації ракових клітин.

Фігура 16 показує здатність Fc-модифікованих гуманізованих анти-B7-H3 антитіл до інгібування пухлинного росту клітин A498 ренальної карциноми клітин *in vivo* у ксенотрансплантатній мишачій модельній системі. Fc-модифіковане hBRCA84D-2 антитіло (що включає Fc модифікації L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) вводили мишам (при дозі 1 мкг/кг, 10 мкг/кг або 20 мкг/кг) через 7 днів, 14 днів, 21 день та 28 днів після імплантації ракових клітин.

Фігури 17A-17D демонструють здатність hBRCA84D-2 / анти-TCR DART™ ("T-DART™") опосередковувати перенацілене знищення SK-MES-1 клітин раку легень, A498 клітин ренальної карциноми, LNCaP клітин раку передміхурової залози та UACC-62 клітин меланоми.

Фігури 18A-18C показують фармакокінетичне концентрації падіння анти-B7-H3 Mab1 у сироватці самців мишей mCD16^{-/-}, hCD16A_FOXN1, що не мають пухлини (Фігури 18A-18B). Фігура 18C показує передбачені фармакокінетичні профілі, одержані при використанні двокомпаратментної моделі з параметрами від дози 5 мг/кг при 0,1, 0,5, 1, 5 та 10 мг/кг.

Фігура 19 показує відносну експресію HER2 та PRCA135 клітинною лінією HT-1197 раку сечового міхура.

Фігура 20 показує зв'язувальну афінність варіантів анти-B7-H3 антитіла hBRCA84D стосовно HT-1197 клітин.

Фігури 21A-21C показують результати аналізу у мишачій ксенотрансплантатній моделі для HT-1197. Групи з 8 самок мишей одержували носій або 10 мг/кг IgG контролю, або цетуксимаб при дозі 1, 5, або 15 мг/кг або анти-B7-H3 антитіло Mab1 при дозі 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг (Q7D x 5). Вимірювання пухлин здійснювали кожні 3-4 дні. Фігура 21A показує здатність анти-B7-H3 антитіла Mab1 запобігати або інгібувати пухлинний розвиток у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Порівняння проти IgG контролю: Mab1 (1 та 5 мг/кг) проти IgG контролю *** від дня 51; Mab1 (10 мг/кг) проти IgG контролю ** від дня 48. Фігура 21B показує здатність цетуксимабу запобігати або інгібувати пухлинний розвиток у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Цетуксимаб (7 мг/кг) проти IgG контролю ** від дня 51; цетуксимаб (15 мг/кг) проти IgG контролю *** від дня 58. Фігура 21C порівнює результати, одержані при максимальних дозах, які піддавали аналізу.

Фігури 22A-22B показують відносну експресію HER2 та PMSA клітинною лінією HT-1376 раку сечового міхура.

Фігура 23 показує результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для HT-1376. Групи мишей одержували носій або 1,0 мг/кг анти-B7-H3 антитіла Mab1 (Q7D x 4).

Фігура 24 показує результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для AGS. Групи мишей одержували носій або 10 мг/кг анти-B7-H3 антитіла Mab1 при дозі 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг (Q7D x 5).

Фігура 25 показує результати *in vitro* аналізу цитотоксичності A549 клітин раку легень при інкубації з hBRCA84D, chBRCA84D та hBRCA84 (Fc Var1) варіантом анти-B7-H3 антитіла (E:T співвідношення = 25:1; ефектор = людський PBMC; LDH зчитування результатів).

Фігура 26 показує результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для A549. Групи мишей одержували носій або 1,0 мг/кг анти-B7-H3 антитіла Mab1 (Q7D x 4).

Фігура 27 показує результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для CaLu3. Групи мишей одержували носій або 0,5, 1 або 5 мг/кг (Q7D x5) анти-B7-H3 антитіла Mab1 або IgG

контролю (10 мг/мл).

Фігури 28А-28С показують результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для LOX-IMVI клітин меланомного раку. Групи з 8 самок мишей одержували носій або 5 мг/кг IgG контролю, або доцетаксел при дозі 5, 10 або 20 мг/кг, або анти-В7-Н3 антитіло Mab1 при дозі 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Фігура 28А показує здатність анти-В7-Н3 антитіла Mab1 запобігати або інгібувати пухлинний розвиток у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Фігура 28В показує здатність доцетакселу запобігати або інгібувати пухлинний розвиток у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Фігура 28С порівнює результати, одержані при максимальних дозах, які піддавали аналізу.

Фігура 29 показує результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для UACC-62 клітин меланомного раку. Групи мишей одержували носій або 5 мг/кг IgG контролю, або анти-В7-Н3 антитіло Mab1 при дозі 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг.

Фігури 30А-30С показують результати мишачого ксенотрансплантатного аналізу для 2rv клітин раку передміхурової залози. Групи з 8 самок мишей одержували носій або 10 мг/кг IgG контролю, або трастузумаб при дозі 1, 7 або 15 мг/кг, або анти-В7-Н3 антитіло Mab1 при дозі 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Фігура 30А показує здатність анти-В7-Н3 антитіла Mab1 запобігати або інгібувати пухлинний розвиток у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Фігура 30В показує здатність трастузумабу запобігати або інгібувати розвиток пухлини у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Фігура 30С порівнює результати, одержані при максимальних дозах, які піддавали аналізу.

Фігура 31 показує результати *in vitro* аналізу цитотоксичності А498 клітин ниркового раку при інкубації з hBRCA84D, chBRCA84D та hBRCA84 (Fc Var1) варіантами анти-В7-Н3 антитіла (Е:Т співвідношення = 25:1; ефектор = людські PBMC; LDH зчитування результатів).

Фігура 32 показує результат мишачого ксенотрансплантатного аналізу для клітин А498 ренального раку. Групи мишей одержували носій або 10 мг/кг IgG контролю, або анти-В7-Н3 антитіло Mab1 при дозі 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Цетуксимаб (анти-EGFR антитіло) вводили мишам контрольної групи при дозах 1, 7 або 15 мг/кг.

Фігури 33А-33В результат мишачого ксенотрансплантатного аналізу для клітин 786-0 ренального раку у порівнянні із цетуксимабом. Групи мишей одержували носій або 10 мг/кг IgG контролю, або анти-В7-Н3 антитіло Mab1 при дозі 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Цетуксимаб (анти-EGFR антитіло) вводили мишам контрольної групи при дозах 1, 7 або 15 мг/кг.

Фігура 34 показує результат мишачого ксенотрансплантатного аналізу для клітин 786-0 ренального раку у порівнянні із паклітакселом. Групи мишей одержували носій або 5 мг/кг IgG контролю, або анти-В7-Н3 антитіло Mab1 при дозі 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Паклітаксел вводили мишам контрольної групи при дозі 2,5 мг/кг.

Детальний опис винаходу:

Даний винахід відноситься до антитіл та їх фрагментів, що є імунореактивними у ссавців, та більш конкретно, до людського В7-Н3 рецептора та до їх застосування, зокрема, у лікуванні раку та запалення. Винахід, таким чином, зокрема, стосується гуманізованих В7-Н3-реактивних антитіл та їх імунореактивних фрагментів, які є здатними до опосередковування та, більш бажано, до поліпшення активації імунної системи проти ракових клітин, що є асоційованими з різноманітними видами раку людини.

I. Загальні методики

Практика даного винаходу буде використовувати, якщо не зазначене інше, традиційні методики молекулярної біології (включаючи рекомбінантні методики), мікробіології, клітинної біології, біохімії та імунології, які є звичайними для даної галузі техніки. Такі методики повністю пояснюються у літературі, такий, як, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, третє видання (Sambrook *та ін.* Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; *Oligonucleotide Synthesis: Methods And Applications (Methods in Molecular Biology)*, Herdewijn, P., вид., Humana Press, Totowa, NJ; *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, M.J., вид., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (Cellis, J.E., вид., 1998) Academic Press, New York, NY; *Animal Cell Culture* (Freshney, R.I., вид., 1987); *Introduction to Cell And Tissue Culture* (Mather, J.P. та Roberts, P.E., вид., 1998) Plenum Press, New York, NY; *Cell And Tissue Culture: Laboratory Procedures* (Doyle, A. *та ін.*, ред., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.) New York, NY; *Weir's Handbook of Experimental Immunology* (Herzenberg, L.A. *та ін.* ред. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller, J.M. *та ін.* ред., 1987) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. *та ін.*, ред., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, K. *та ін.*, ред., 1994) Birkhäuser, Boston MA; *Current Protocols in Immunology* (Coligan, J.E. *та ін.*, ред., 1991) John

Wiley та Sons, Hoboken, NJ; Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; Immunobiology 7 (Janeway, C.A. *ma in.*, 2007) Garland Science, London, UK; Antibody (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ред., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (Shepherd, P. *ma in.*, вид., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; Using Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow, E. *ma in.*, вид., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; The Antibodies (Zanetti, M. *ma in.*, вид. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK); та DeVita, Hellman, And Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 8-е вид., DeVita, V. *ma in.*, ред. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

II. Визначення

Як використовується в даній заявці, термін "B7-H3" відноситься до члена родини людських білків B7, мембранного білка типу I з Ig-подібними доменами, що також є відомим як CD276. Термін "2Ig-B7-H3" позначає B7-H3 форму, що включає тільки два Ig-подібні домени; термін "4Ig-B7-H3" позначає B7-H3 форму, що включає чотири Ig-подібні домени (див., Sun, M. *ma in.* (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," J. Immunol. 168: 6294-6297; Steinberger *ma in.* (2004), "Molecular Characterization Of Human 4Ig-B7-H3, A Member Of The B7 Family With Four Ig-like Domains," J. Immunol. 2004, 172(4): 2352-2359 та Castriconi *ma in.* (2004) "Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34): 12640-12645). Антиген "TES7" (WO 2008/066691) являє собою антиген, що володіє характеристиками 4Ig-B7-H3. У відповідності із цим антитіла, що специфічно зв'язуються з TES7, зв'язуються з 4Ig-B7-H3. TES7 антиген може мати більше, ніж один, відмінний епітоп, та епітопи можуть бути нелінійними. Декілька анти-B7-H3 антитіл є відомими як такі, які зв'язуються з нелінійними епітопами, включаючи деякі, які є присутніми тільки на ізоформі 4Ig-B7-H3. На сьогоднішній день передбачається, що TES7 може піддаватися понадекспресії у деяких ракових клітинах у порівнянні із аналогами у нормальній тканині.

Агоністи, антагоністи та інші модулятори функції B7-H3 очевидним чином є включеними в об'єм даного винаходу. Ці агоністи, антагоністи та модулятори являють собою поліпептиди, що включають один або більше сайтів антигенної детермінанти B7-H3, або включають один або більше фрагментів таких сайтів, варіантів таких сайтів, або пептидоміметиків таких сайтів. Ці агоністичні, антагоністичні та B7-H3 модуляторні сполуки забезпечуються в лінійній або циклічній формі, та необов'язково включають принаймні один амінокислотний залишок, що звичайно виявляється у природі, або принаймні один амідний ізостер. Ці сполуки можуть бути глікозильованими.

Зокрема, термін "B7-H3 модулятор", як використовується в даній заявці, визначається як будь-яка сполука, яка (1) є здатною до руйнування або блокування взаємодії між людським B7-H3 та його природними лігандами або анти-B7-H3 антитілом; (2) є здатною до зв'язування з людським B7-H3 та його природними лігандами або анти-B7-H3 антитілом; (3) містить антигенний сайт, що може використовуватися для індукції антитіл, здатних до зв'язування з людським B7-H3 та його природними лігандами або анти-B7-H3 антитілом; (4) містить антигенний сайт, що може використовуватися у скринінгу антитіл, здатних до зв'язування з людським B7-H3 та його природними лігандами або анти-B7-H3 антитілом; (5) містить антигенний сайт, що може використовуватися для індукції антитіл, здатних до руйнування або блокування взаємодії між людським B7-H3 та його природними лігандами або анти-B7-H3 антитілом; (6) містить антигенний сайт, що може використовуватися у скринінгу антитіл, здатних до руйнування або блокування взаємодії між людським B7-H3 та його природними лігандами або анти-B7-H3 антитілом. B7-H3 модулятори можуть являти собою "B7-H3 агоністи" або "B7-H3 антагоністи" у залежності від того, чи поліпшує їх активність активацію Т-клітин або інгібує активацію Т-клітин, відповідно.

B7-H3 агоністи, антагоністи та модулятори включають B7-H3 варіанти, B7-H3 пептидні антагоністи, пептидоміметики та малі молекули, анти-B7-H3 антитіла та імуноглобулінові варіанти, амінокислотні варіанти людського B7-H3, включаючи варіанти на основі амінокислотної заміни, делеції та вставки, або будь-якої їх комбінації та химерні імуноглобуліни. B7-H3 агоністи, антагоністи та модулятори згідно з даним винаходом базуються на ідентифікації B7-H3 доменів, втягнутих у зв'язування людського B7-H3 з його нативними лігандами або анти-B7-H3 антитілами. Таким чином, винахід забезпечує B7-H3 агоністи, антагоністи та модулятори з молекулярними структурами, які дублюють або імітують один або більше анти-B7-H3 зв'язувальних доменів людського B7-H3.

Як використовується в даній заявці, термін "B7-H3 варіант" означає будь-який амінокислотний варіант людського B7-H3, включаючи варіанти на основі амінокислотної заміни,

делеції та вставки, або будь-якої їх комбінації. Визначення охоплює химерні молекули, такі, як химера людський B7-H3/ не-людський та інші гібридні молекули. Також у це визначення є включеним будь-який фрагмент варіантів B7-H3 молекули, що включає варіант або гібридну(і) ділянку(и) молекули.

5 Як використовується в даній заявці, "антитіло" являє собою молекулу імуноглобуліну, здатну до специфічного зв'язування з мішенню, такою, як вуглевод, поліуклеотид, ліпід, поліпептид, тощо, за допомогою принаймні одного антигенного сайту впізнання, розміщеного у варіабельній ділянці молекули імуноглобуліну. Як використовується в даній заявці, термін охоплює не тільки поліклональні або моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі, як Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), одиничні ланцюги (ScFv), їх мутанти, існуючі в природі варіанти, злиті білки, що включають частину антитіла із сайтом впізнання антигену необхідної специфічності, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, "BiTEs®," "DART™" молекули та будь-які інші модифіковані конфігурації молекули імуноглобуліну, що включають сайт впізнання антигену необхідної специфічності.

15 Термін "BiTE" (біспецифічні захоплюючі T-клітини) відноситься до однокланових поліпептидних молекул, які мають два антигензв'язувальні домени, один з яких зв'язується з T-клітинним антигеном, а другий зв'язується з антигеном, присутнім на поверхні мішені (WO 05/061547; Baeuerle, P *ma in.* (2008) "BiTE®: A New Class Of Antibody That Recruit T Cells," *Drugs of the Future* 33: 137-147; Bargou, *ma in.* 2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody," *Science* 321: 974-977).

20 Термін "DART™" (перенацілювальний реагент з подвійною афінністю) відноситься до імуноглобулінової молекули, що включає принаймні два поліпептидні ланцюги, що об'єднуються (зокрема, шляхом ковалентної взаємодії) з утворенням принаймні двох епітопзв'язувальних сайтів, які можуть впізнавати ті самі або відмінні епітопи. Кожний з поліпептидних ланцюгів DART™ включає варіабельну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну та варіабельну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну, проте ці ділянки не взаємодіють з утворенням епітопзв'язувального сайту. Переважніше варіабельна ділянка важкого ланцюга імуноглобуліну одного (наприклад, першого) DART™ поліпептидного ланцюга взаємодіє з варіабельною ділянкою легкого ланцюга імуноглобуліну відмінного поліпептидного ланцюга (наприклад, другого) DART™ з утворенням епітопзв'язувального сайту. Подібно до цього, варіабельна ділянка легкого ланцюга імуноглобуліну одного поліпептидного ланцюга (наприклад, першого) DART™ взаємодіє з варіабельною ділянкою важкого ланцюга імуноглобуліну відмінного поліпептидного ланцюга (наприклад, другого) DART™ з утворенням епітопзв'язувального сайту. DART™ можуть бути моносспецифічними, біспецифічними, триспецифічними, тощо, та, таким чином, є здатними до одночасного зв'язування одного, двох, трьох або більше різних епітопів (які можуть являти собою однакові або різні антигени). DART™ можуть додатково бути моновалентними, бівалентними, тривалентними, тетравалентними, пентавалентними, гексавалентними, тощо, та, таким чином, є здатними до одночасного зв'язування однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести або більше різних молекул. Ці дві властивості DART™ (тобто, ступінь специфічності та валентності) можуть бути поєднані, наприклад, для одержання біспецифічних антитіл (тобто, здатних до зв'язування двох епітопів) що є тетравалентними (тобто, є здатними до зв'язування чотирьох наборів епітопів), тощо. DART™ молекули розкриваються у публікаціях PCT WO 2006/113665, WO 2008/157379 та WO 2010/080538.

45 Термін "моноклональне антитіло" відноситься до гомогенної популяції антитіла, в якій моноклональне антитіло включає амінокислоти (існуючі в природі та такі, що не існують в природі), що є втягненими у селективне зв'язування антигену. Моноклональні антитіла є високо специфічними та направленими проти антигенного сайту. Термін "моноклональне антитіло" охоплює не тільки інтактні моноклональні антитіла та повнорозмірні моноклональні антитіла, а також їх фрагменти (такі, як Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), одиничні ланцюги (ScFv), їх мутанти, злиті білки, що включають частину антитіла, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла та будь-які інші модифіковані конфігурації імуноглобулінових молекул, що включають сайт впізнання антигену необхідної специфічності та мають здатність до зв'язування антигену. Термін не є призначеним для обмеження джерелом одержання антитіла або способом, за допомогою якого його одержують (наприклад, при використанні гібридоми, фагової селекції, рекомбінантної експресії, трансгенних тварин, тощо). Термін включає цільні імуноглобуліни, а також їх фрагменти, тощо, описані вище, що підпадають під визначення "антитіло."

60 Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до химерних молекул, які звичайно одержують при використанні рекомбінантних методик, що мають сайт зв'язування антигену, який походить від імуноглобуліну з видів, відмінних від людини, та іншу структуру молекули імуноглобуліну, що базується на структурі та /або послідовності людського імуноглобуліну. Антигензв'язувальний

сайт може включати або повні варіабельні домени, злиті на константних домену, або тільки ділянки, що визначають комплементарність (CDR), прищеплені на прийнятні каркасні ділянки у варіабельних домену. Антигензв'язувальні сайти можуть бути дикого типу або модифіковані за допомогою однієї або більше амінокислотних замінів. Це усуває константні ділянки як імуноген у людських індивідуумах, проте здатність до імунної відповіді на сторонні варіабельні ділянки залишається (LoBuglio, A.F. *ma in.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224). Інший підхід фокусується не тільки на забезпеченні константних ділянок, що походять від людини, але й на модифікації варіабельних ділянок, а також на переформуванні їх для того, щоб вони були більш близькими до людської форми. Є відомим, що варіабельні ділянки як важкого, так і легкого ланцюгів, містять три ділянки, що визначають комплементарність (CDR), які варіюють у відповідь на певний антиген та визначають здатність до зв'язування, фланковані чотирма каркасними ділянками (FR), які є відносно консервативними у даних видів та які п'ятьма забезпечують утворення CDR. Коли не-людські антитіла одержують стосовно певного антигену, варіабельні ділянки можуть бути "переформовані" або "гуманізовані" за допомогою прищеплення CDR, які походять від не-людського антитіла, FR, що є присутніми у людському антитілі, яке піддається модифікації. Застосування цього підходу до різноманітних антитіл було описане Sato, K. *ma in.* (1993) Cancer Res 53 :851-856. Riechmann, L. *ma in.* (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332: 323-327; Verhoeven, M. *ma in.* (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239: 1534-1536; Kettleborough, C. A. *ma in.* (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4: 773-3783; Maeda, H. *ma in.* (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2: 124-134; Gorman, S. D. *ma in.* (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4181-4185; Tempest, P.R. *ma in.* (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9: 266-271; Co, M. S. *ma in.* (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 2869-2873; Carter, P. *ma in.* (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89: 4285-4289; and Co, M.S. *ma in.* (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148: 1149-1154. В деяких втіленнях гуманізовані антитіла зберігають усі CDR послідовності (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить усі шість CDR з мишачого антитіла). В інших втіленнях гуманізовані антитіла мають один або більше CDR (один, два, три, чотири, п'ять, шість), які є зміненими у порівнянні із вихідним антитілом, які також називаються одним або більше CDR, що "походять від" одного або більше CDR з вихідного антитіла.

Як використовується в даній заявці, антитіло або поліпептид, як кажуть, "специфічно" зв'язує ділянки іншої молекули (тобто, епітопу), якщо воно реагує або асоціюється частіше, швидше, з більшою тривалістю та/або з більшою афінністю з епітопом, спорідненим з альтернативним епітопом. Наприклад, антитіло, що специфічно зв'язується з B7-H3 епітопом, являє собою антитіло, що зв'язує цей B7-H3 епітоп з більшою афінністю, авідністю, зв'язує більш легко, та/або з більшою тривалістю, ніж воно зв'язується з B7-H3 епітопами або не-B7-H3 епітопами. Є також зрозумілим при читанні цього визначення, що, наприклад, антитіло (або залишок, або епітоп), який специфічно зв'язується з першою мішенню може специфічно або переважно зв'язуватися з другою мішенню або може не зв'язуватися з нею. Як таке, "специфічне зв'язування" з необхідністю не вимагає (незважаючи на те, що може включати) виключне зв'язування. В загальному випадку, проте без необхідності, посилання на зв'язування означає "специфічне" зв'язування.

Як використовується в даній заявці, термін "що є імунологічно активним" при посиланні на епітоп або "залишається імунологічно активним" відноситься до здатності антитіла (наприклад, анти-B7-H3 антитіла) зв'язуватися з епітопом за різних умов, наприклад, після того, як епітоп піддавали дії відновних умов та умов денатурації.

Різні біологічні функції асоціюються з анти-B7-H3 антитілами, включаючи, але не обмежуючись один або більше з: здатність до специфічного зв'язування з B7-H3 (та, зокрема, з B7-H3 молекулами, що експресуються на поверхні ракових клітин, включаючи, але без обмеження, нирки, передміхурову залозу або легені, ракові клітини); здатність до конкурентного інгібування переважного зв'язування відомого анти-B7-H3 антитіла з B7-H3, включаючи здатність до переважного зв'язування з тим самим B7-H3 епітопом, з яким переважно зв'язується вихідне антитіло; здатність зв'язуватися з частиною B7-H3, що міститься на поверхні живої клітини *in vitro* або *in vivo*; здатність зв'язуватися з частиною B7-H3, що міститься на поверхні живої ракової клітини, такої, як, але без обмеження, ракові клітини передміхурової

залози, легенів або нирок, здатність до доставки хіміотерапевтичного агента до ракових клітин (до таких, як ракові клітини нирки, передміхурової залози або легень), що експресують B7-H3 на своїй поверхні; та/або здатність до доставки терапевтичного агента або здатного до визначення маркера у ракові клітини, що експресують B7-H3 на своїй поверхні. Як обговорюється в даній заявці, поліпептиди (включаючи антитіла) згідно з винаходом можуть мати будь-яку одну або більше таких характеристик.

“Анти-B7-H3 еквівалентне антитіло” або “анти-B7-H3 еквівалентний поліпептид” відноситься до антитіла або поліпептиду, що має одну або більше біологічних функцій, які асоціюються з анти-B7-H3 антитілом, таку, як, наприклад, зв'язувальна специфічність.

Як використовується в даній заявці, термін “агент” відноситься до біологічної, фармацевтичної або хімічної сполуки. Необмежувальні приклади включають прості та складні неорганічні та органічні молекули, пептид, білок, олігонуклеотид, антитіло, похідне антитіла, фрагмент антитіла, похідне вітаміну, вуглевод, токсин або хіміотерапевтичну сполуку. Можуть синтезуватися різноманітні сполуки, наприклад, малі молекули та олігомери (наприклад, олігопептиди та олігонуклеотиди) та синтетичні органічні сполуки, що базуються на різноманітних корових структурах. Крім того, різноманітні природні джерела можуть забезпечувати сполуки для скринінгу, такі, як рослинні або тваринні екстракти, та подібні до них.

Агенти, що використовуються у способах згідно з даним винаходом, можуть піддаватися грубому відбору, раціональному відбору або конструюватися. Як використовується в даній заявці, кажуть, що агент є грубо відібраний тоді, коли агент вибирають без попереднього розгляду або знань специфічних амінокислотних або інших хімічних залишків, які є втягненими в асоціацію молекули з її нативним(и) партнером(ами) зв'язування або відомими антитілами. Приклад випадковим чином відібраного агента являє собою агент, який був ідентифікований при використанні та скринінгу хімічної бібліотеки або пептидної комбінаторної бібліотеки.

Як використовується в даній заявці, коли кажуть, що агент є раціонально відібраним або сконструйованим, то у цьому випадку агент вибирають на невинуватій основі, що бере до уваги послідовність цільового сайту та/або його конформацію у зв'язку з дією агента. У зв'язку з анти-B7-H3 агентами зараз передбачається, що існує принаймні три епітопи на B7-H3, до яких утворюються антитіла, та, таким чином, принаймні три сайти дії для агентів, які блокують B7-H3/анти-B7-H3 взаємодію. Даний винахід також охоплює агенти, що діють при сайтах взаємодії між B7-H3 та його нативним партнером зв'язування, незважаючи на те, що інші ліганди та їх активні B7-H3-інтерактивні сайти, або такі, що є відомими на сьогоднішній день, або такі, що ідентифіковані пізніше, також охоплюються об'ємом даного винаходу. Агенти можуть бути раціонально відібрані або раціонально сконструйовані при використанні пептидних послідовностей, які складають сайти контакту рецептор/ліганд та/або комплекс B7-H3/анти-B7-H3 антитіло. Наприклад, раціонально відібраний пептидний агент може бути пептидом, амінокислотна послідовність якого є ідентичною з епітопом, який виявляється на B7-H3, оскільки він розміщується на поверхні живої клітини в її нативному оточенні. Такий агент буде знижувати або блокувати асоціацію анти-B7-H3 антитіла з B7-H3 або асоціацію B7-H3 з його нативним лігандом, як є бажаним, шляхом зв'язування з анти-B7-H3 антитілом або його нативним лігандом.

Як використовується в даній заявці, термін “мічений” стосовно антитіла є призначенням для охоплення безпосереднього мічення антитіла шляхом злиття (тобто, фізичного зв'язування) з речовиною, здатною до визначення, такою, як радіоактивний агент або флуорофор (наприклад, фікоеритрин (PE) або флуоресцеїн ізотіоціанат (який також є відомим як фторізотіоціанат або FITC)) з антитілом, а також опосередкованого зв'язування зонда або антитіла при використанні реактивності зі здатною до визначення речовиною.

Як використовується в даній заявці, термін “асоціація” стосовно до антитіла, включає ковалентне та нековалентне приєднання або зв'язування агента (наприклад, хіміотерапевтичного агента) з антитілом. Антитіло може бути асоційованим з агентом (наприклад, хіміотерапевтичним агентом) шляхом безпосереднього зв'язування або опосередкованого зв'язування шляхом приєднання до загальної платформи, так, що антитіло направляє локалізацію агента до ракових клітин, з якими зв'язується антитіло, та де антитіло та агент не піддаються суттєвій дисоціації при фізіологічних умовах, так, що агент не є націленим на ту саму ракову клітину, з якою зв'язується антитіло, або так, що ефективність агента не знижується.

Термін “біологічний зразок” включає в себе різні типи зразків, які отримані від індивідуума та які можуть використовуватися в діагностичних аналізах або при моніторингу. Визначення включає в себе слину, кров та інші зразки рідин біологічного походження, тверді зразки тканин, такі, як шматочки біопсії або культури тканин або клітин, що походять від них, та їх потомство,

наприклад, клітини, що одержують із зразка тканини від особи, яка передбачається як така, що має рак, у переважному втіленні з яєчників, легенів, простати, підшлункової залози, товстої кишки та тканини молочної залози. Визначення також включає зразки, які піддавалися обробці будь-яким чином після їх одержання, такий, як обробка реагентом, солюбілізація або збагачення на деякі компоненти, такі, як білки або полінуклеотиди, або включення у напівтвердий або твердий матрикс для цілей одержання зрізів. Термін "біологічний зразок" включає в себе клінічні зразки, а також включає клітини у культурі, клітинні супернатанти, клітинні лізати, сироватку, плазму, біологічні рідини та зразки тканини.

Термін "клітина-хазяїн" включає окремі клітини або культуру клітин, які можуть являти собою або являли собою рециєнта для вектора(ів) для введення полінуклеотидної вставки. Хазяйські клітини включають потомство однієї клітини-хазяїна, при цьому потомство не обов'язково може бути повністю ідентичним (за морфологією або за комплементом геномної ДНК) з вихідною батьківською клітиною завдяки природним, випадковим або навмисним мутаціям. Хазяйські клітини включають клітини, трансфіковані *in vivo* за допомогою полінуклеотиду(ів) згідно з даним винаходом.

Як використовується в даній заявці, термін "затримка розвитку метастазів" означає відстрочку, запобігання, уповільнення, гальмування, стабілізацію та/або віддалення розвитку метастазів. Ця затримка може складати різні проміжки часу, в залежності від історії раку та/або індивідуумів, яких піддають лікуванню. Як є очевидним для фахівця в даній галузі техніки, достатня або значна затримка може, по суті, охоплювати профілактику, в тому, що індивідуум не розвиває метастази.

Як використовується в даній заявці, "ефективна кількість" фармацевтичної композиції в одному з втілень являє собою кількість, достатню для одержання корисних або бажаних результатів, включаючи, але без обмеження, клінічні результати, такі, як зменшення розмірів пухлини (в контексті раку, наприклад, раку молочної залози або раку передміхурової залози), уповільнення росту ракових клітин, відстрочення розвитку метастазів, зменшення симптомів в результаті захворювання, підвищення якості життя людей, які страждають від захворювання, зниження дози інших препаратів, необхідних для лікування захворювання, сприяння ефекту інших лікарських засобів, як, наприклад, за допомогою націлювання та/або інтерналізації, затримку розвитку захворювання, та/або подовження виживання людей. Ефективну кількість можна вводити за допомогою одного або більше введень. Для цілей цього винаходу ефективна кількість препарату, сполуки або фармацевтичної композиції являє собою кількість, достатню для зниження проліферації (або руйнування) ракових клітин та зменшення та/або затримку розвитку або росту метастазів ракових клітин, або безпосередньо або опосередковано. У деяких втіленнях ефективна кількість препарату, сполуки або фармацевтичної композиції може бути досягнута або не може бути досягнута у поєднанні з іншим лікарським засобом, сполукою або фармацевтичною композицією. Таким чином, "ефективна кількість" може бути розглянута в контексті введення одного або більше хіміотерапевтичних агентів, та одиничний агент може розглядатися як такий, що вводиться в ефективній кількості, якщо, в поєднанні з одним або більше іншими агентами, бажаний результат може бути досягнутий або досягається. Незважаючи на те, що індивідуальні потреби варіюють, визначення оптимальних інтервалів ефективних кількостей кожного компонента знаходиться у межах знань в даній області техніки. Звичайна доза включає від 0,1 до 100 мг/кг/маси тіла. Переважні дози включаються від 1 до 100 мг/кг/маси тіла. Найбільш бажані дози включаються від 10 до 100 мг/кг/маси тіла.

Як використовується в даній заявці, кажуть, що молекула нуклеїнової кислоти або агент, антитіло, композиція або клітина, тощо, є "ізолюваною" тоді, коли ця молекула нуклеїнової кислоти або агент, антитіло, композиція або клітина, тощо, є суттєво відокремленою від контамінантних молекул нуклеїнової кислоти, антитіл, агентів, композицій або клітин, тощо, що у природі є присутніми в їх природному джерелі.

Термін "індивідуум" відноситься до хребетної тварини, переважно ссавців. Ссавці включають, але без обмеження, людей, сільськогосподарських тварини, спортивних тварини, домашніх тварин, приматів, мишей та щурів. У найбільш бажаному втіленні термін індивідуум означає людини.

Терміни "поліпептид", "олігопептид", "пептид" та "білок" використовуються тут як взаємозамінні для позначення полімерів амінокислот будь-якої довжини. Полімер може бути лінійним або розгалуженим, він може включати модифіковані амінокислоти, та він може бути перерваний хімічними структурами, відмінними без амінокислот. Терміни також охоплюють амінокислотні полімери, які були змінені природно або шляхом втручання людини; наприклад, шляхом утворення дисульфідних зв'язків, глікозилювання, ліпидування, ацетилювання, фосфорилювання або будь-яких інших маніпуляцій або модифікацій, таких, як кон'югація з

компонентом для мічення. Також включеними у визначення є, наприклад, поліпептиди, що містять один або більше аналогів амінокислот (включаючи, наприклад, неприродні амінокислоти та інші), а також інші модифікації, що є відомими в даній галузі. Зрозуміло, що, оскільки поліпептиди згідно з даним винаходом базуються на антитілі, поліпептиди можуть утворюватися у вигляді одного ланцюга або як зв'язані ланцюги.

Також даним винаходом охоплюються пептидоміметики В7-Н3 пептидних агоністів, антагоністів та модуляторів (включаючи анти-В7-Н3 антитіла) описані в даній заявці. Такі пептидоміметики включають пептиди, в яких принаймні один амінокислотний залишок є заміщеним залишком амінокислоти, що не зустрічаються у природі, такими, як ізомер D амінокислот або N-алкіловані види амінокислот. В інших втіленнях пептидоміметики утворюються шляхом заміни принаймні одного амідного зв'язку ($-C(=O)-NH-$) в В7-Н3 пептидному агоністі, антагоністі або модуляторах амідним ізостером. Прийнятні амідні ізостери включають $-CH_2-NH-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-S(O)-$, $-CH_2-S(O)_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$ (Е або Z форма), $-C(=O)-CH_2-$, $-CH(CN)-NH-$, $-C(OH)-CH_2-$ та $-O-C(=O)-NH-$. Амідні зв'язки в В7-Н3 пептидному агоністі, антагоністі або модуляторі, що є прийнятними кандидатами для заміщення за допомогою амідних ізостерів, включають зв'язки, що є здатними до гідролізу за допомогою ендогенних естераз або протеаз у суб'єкта, призначеного для лікування при використанні В7-Н3 пептидного агоніста, антагоніста або модулятора.

Як використовується в даній заявці, термін "суттєво чистий" відноситься до матеріалу, який складає не менше 50% чистого (тобто вільного від забруднення), більш переважно принаймні на 90% є чистим, більш переважно принаймні на 95%, більш переважно принаймні на 98%, більш переважно, принаймні на 99% є чистим, та найбільш переважно більше ніж на 99% є чистим.

Як використовується в даній заявці, термін "токсин" відноситься до будь-якої речовини, яка викликає шкідливий ефект у клітині. Наприклад, токсин, направлений на ракову клітину, буде мати шкідливий, іноді руйнівний ефект, на ракову клітину. Приклади токсинів включають, але без обмеження такими, таксан, майтансиноїд, аурістатин (наприклад, монометил аурістатин (ММАЕ), монометил аурістатин F (ММАF), аурістатин Е (АЕ), тощо) (такі, як ті, що є розкритими у патентах США № 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,441,163; 6,596,757; 7,276,497; 7,585,857; або 7,851,432), каліхеаміцин, антрациклін (наприклад, доксорубіцин), СС-1065 аналог, доцетаксел, катепсин В або Е; рицин, гелонін, екзотоксин *Pseudomonas*, дифтерійний токсин, та РНКазу; радіоактивно мічені антитіла (наприклад, туксетан-кон'юговані або мічені за допомогою токсичного радіоізоотопу (наприклад, ^{90}Y ; ^{131}I , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , тощо).

Як використовується в даній заявці, терміни "лікування" або "процес лікування" означають підхід для отримання корисного або бажаного результату, включаючи та переважно корисного або бажаного клінічного результату. Такі корисні або бажані клінічні результати включають, але без обмеження такими, один або більше з наступних: зниження проліферації (або знищення) ракових клітин або інших хворих клітин, зниження метастазів ракових клітин, що виявляються при ракових захворюваннях, зменшення розмірів пухлини, зменшення симптомів в результаті захворювання, підвищення якості життя людей, які страждають від захворювання, зниження дози інших препаратів, необхідних для лікування захворювання, затримку розвитку захворювання та/або подовження виживання індивідуумів.

Як використовується в даній заявці, термін "рак" є призначеним для охоплення видів раку, які характеризуються наявністю ракової клітини, вибраної з групи, яка складається з клітини пухлини надниркової залози, раку, асоційованого зі СПІДом, альвеолярної саркоми м'яких тканин, астроцитарної пухлини, раку жовчного міхура, раку кісток, раку головного та спинного мозку, метастатичного раку мозку, раку молочної залози, пухлин каротидного гломуса, раку шийки матки, хондросаркоми, хордоми, хромофобної карциноми ниркових клітин, гіпернефроїдної пухлини нирки, раку кишечника, колоректального раку, шкірної доброякісної фіброзної гістіоцитомі, десмопластичної дрібнокруглоклітинної пухлини, епіндимомі, саркоми Юїнга, позаскелетної міксоїдної хондросаркоми, фіброгенного недовершеного остеогенезу, фіброзної дисплазії кісток, раку жовчного міхура або жовчної вивідної протоки, раку шлунково-кишкового тракту, гестаційного трофобластного захворювання, пухлини зародкової клітини, раку голови та шиї, карциноми печінкових клітин, пухлини острівкових клітин, саркоми Капоші, раку нирки, лейкомії, ліпоми/доброякісної ліпоматозної пухлини, ліпосаркоми/злоякісної ліпоматозної пухлини, печінкового раку, лімфоми, раку легень, медулобластоми, меланоми, менінгіоми, множинної ендокринної неоплазії, множинної мієломи, мієлодиспластичного синдрому, нейробластоми, нейроендокринних пухлин, раку яєчника, раку підшлункової залози, папілярної карциноми щитовидної залози, пухлини парашитовидної залози, педіатричного раку, пухлини

капсули периферичного нерву, феохромоцитоми, пухлини гіпофізу, раку передміхурової залози, задньої ювеальної меланоми, виключного гематологічного розладу, ниркового метастатичного раку, паличковидної пухлини, рабдіоміосаркоми, саркоми, раку шкіри, саркоми м'яких тканин, раку лускатих клітин, раку шлунка, синовіальної саркоми, тестикулярної саркоми, тимусної карциноми, тимоми, метастатичного раку щитовидної залози та раку матки.

III. Способи створення антитіл та поліпептидів

Способи створення моноклональних антитіл є відомими у галузі техніки. Один спосіб, який може використовуватися, являє собою метод Kohler, G. *ma in.* (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody o Of Predefined Specificity*," Nature 256: 495-497, або його модифікацію. Типово, моноклональні антитіла одержують у видів, відмінних від людини, таких, як миші. В загальному випадку, миші або пацюки використовуються для імунізації, але інші тварини також можуть використовуватися. Антитіла одержують шляхом імунізації мишей імуногенною кількістю клітин, клітинних екстрактів або препаратів білка, які містять людський B7-H3. Імуноген може являти собою, але не обмежуючись такими, первинні клітини, культури ліній клітин, ракові клітини, нуклеїнові кислоти або тканини. В одному втіленні використовуються клітини людської карциноми легенів. Клітини, які використовуються для імунізації, наприклад, такі чоловічої статеві залози або аденокарциноми підшлункової залози, або клітини шлунка, можуть культивуватися протягом певного періоду часу (наприклад, протягом принаймні 24 годин) до їх використання як імуногена. Клітини (наприклад, такі чоловічої статеві залози, шлунка або клітини аденокарциноми підшлункової залози) можуть використовуватися як імуногени самі по собі або у поєднанні з неденатуруючим ад'ювантом, таким, як Ribi. В загальному випадку, клітини повинні бути інтактними та переважно бути життєздатними при використанні як імуногенів. Інтактні Т-клітини можуть дозволити проводити краще визначення антигенів, ніж виявити пошкоджені клітини, отримані від імунізованої тварини. Використання денатуруючих або жорстких ад'ювантів, наприклад, ад'юванта Фрейнда, може призвести до розриву клітин, та тому їх використання не рекомендується. Імуноген може бути введений кілька разів через певні проміжки часу, наприклад, раз на два тижні, або на тиждень, або може бути введений таким чином, щоб підтримувати життєздатність тварини (наприклад, в рекомбінантній тканині).

В одному втіленні моноклональні антитіла, що зв'язуються з B7-H3, одержують при використанні хазяйських клітин, які понадекспресують B7-H3 як імуноген. Такі клітини включають, як приклад, але без обмеження такими, клітин легеневої карциноми людини та клітини раку товстого кишечника людини.

Для моніторингу антитілогенезу невеликий біологічний зразок (наприклад, кров) можуть одержувати від тварин та перевіряти на титр антитіла проти імуногена. Селезінка та/або декілька великих лімфатичних вузлів можуть бути видалені та дисоційовані на одиничні клітини. При бажанні клітини селезінки можуть піддаватися скринінгу (після видалення клітин, що приєдналися неспецифічно) шляхом перенесення клітинної суспензії на чашку або пластину, покриту антигеном. В-клітини, що експресують зв'язаний з мембранною імуноглобулін, специфічний для антигену, будуть зв'язуватися з пластиною, та не змиваються з при використанні решти суспензії. В результаті цього В-клітини або всі дисоційовані клітини селезінки можуть бути злиті з мієломною клітиною (наприклад, X63-Ag8.653 та такими із Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA). Поліетиленгліколь (PEG) може використовуватися для злиття клітин селезінки або лімфоцитів з мієломними клітинами, щоб сформувати гібридоми. Гібридому потім культивують у селективному середовищі (наприклад, у середовищі на основі гіпоксантину, аміноптерину, тимідину, яке є відомим як "середовище HAT"). Одержані гібридами потім переносять шляхом обмежувального розведення та піддають аналізу на продукцію антитіл, які специфічно зв'язуються з імуногеном, при використанні, наприклад, скринінгу на основі FACS (сортування флуоресцентно активованих клітин) або імуногістохімії (IHC). Відібрані гібридами, що секретують моноклональне антитіло, потім культивують або *in vitro* (наприклад, у колбах для культури тканин або ферментерах із системою порожнистих волокон), або *in vivo* (наприклад, як асцити у мишей).

Як ще одну альтернативу до методики злиття клітин для одержання моноклональних антитіл згідно з даним винаходом можуть використовуватися імуорталізовані вірусом Епштейна-Барр (EBV) В клітини. Гібридами розмножують та піддають субклонуванню, при бажанні, та супернатанти аналізують на анти-імуногенну активність звичайними методами аналізу (наприклад, FACS, IHC, радіоімуноаналіз, імуоферментний аналіз, флуоресцентний імуноаналіз і т.д.).

Згідно з іншою альтернативою анти-B7-H3 моноклональне антитіло та будь-яке інше еквівалентне антитіло можуть бути секвеновані та одержані рекомбінантними способами,

відомими в даній галузі (наприклад, гуманізація, використання трансгенних мишей для продукції повністю людських антитіл, технологія фагового дисплею і т.д.). В одному втіленні анти-B7-H3 моноклональне антитіло піддають секвенуванню, та полінуклеотидну послідовність потім клонують у вектор для експресії або розмноження. Послідовність, що кодує антитіло, яке

представляє інтерес, може підтримуватися у векторі в хазяйській клітині, та хазяйська клітина може потім піддаватися розмноженню та заморожуватися для подальшого використання.

Полінуклеотидна послідовність анти-B7-H3 моноклонального антитіла та будь-яких інших еквівалентних антитіл може використовуватися для генетичних маніпуляцій для створення "гуманізованого" антитіла, для поліпшення афінності або інших характеристик антитіла.

Загальний принцип гуманізації антитіла включає збереження основних послідовностей антиген-зв'язувальної частини антитіла при заміні не-людської частини, що залишилася, на послідовності з людського антитіла. Існують чотири основні етапи гуманізації моноклонального антитіла. До них відносяться: (1) визначення нуклеотидної та передбаченої амінокислотної послідовності варіабельних доменів легкого та важкого ланцюгів вихідного антитіла (2) конструювання гуманізованого антитіла, тобто визначення, які каркасні ділянки антитіла використовувати для процесу гуманізації (3) методики/способи фактичної гуманізації та (4) трансфекція та експресія гуманізованого антитіла. Див., наприклад, патенти США №№ 4816567; 5807715; 5866692; та 6331415.

Був описаний ряд молекул "гуманізованого" антитіла, що включають антигензв'язувальний сайт, які походять від не-людського імуноглобуліну, включаючи химерні антитіла, що мають V ділянки пацюків або модифіковані V ділянки пацюків та асоційовані з ними ділянки, що визначають комплементарність (CDR), злиті з людськими константними доменами (див., наприклад, Winter *ma in.* (1991) "Man-made Antibodies," *Nature* 349: 293-299; Lobuglio *ma in.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 4220-4224 (1989), Shaw *ma in.* (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," *J. Immunol.* 138: 4534-4538, та Brown *ma in.* (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/ Human Chimeric Monoclonal Antibody," *Cancer Res.* 47: 3577-3583). Інші посилання описують CDR пацюків, прищені на ділянки, що підтримують каркасну ділянку (FR) людини, перед злиттям з прийнятим константним доменом людського антитіла (див., наприклад, Riechmann, L. *ma in.* (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332: 323-327; Verhoeven, M. *ma in.* (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239: 1534-1536; та Jones *ma in.* (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," *Nature* 321: 522-525). Інше посилання описує CDR пацюків, що підтримуються рекомбінантно фланкованими каркасними ділянками пацюків. Див., наприклад, публікацію європейського патенту № 519,596. Такі "гуманізовані" молекули конструюють для мінімізації небажаної імунологічної відповіді на молекули анти-людського антитіла пацюків, що обмежує тривалість та ефективність терапевтичних застосувань цих залишків у людських реципієнтів. Інші способи гуманізації антитіл, що можуть використовуватися, є розкритими Daugherty *ma in.* (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," *Nucl. Acids Res.* 19: 2471-2476 та патенти США №№ 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; та 5,866,692.

Винахід також охоплює фрагменти варіабельних ділянок одиничних ланцюгів ("scFv") антитіл згідно з даним винаходом, такі, як μ -анти-B7-H3. Фрагменти варіабельних ділянок одиничних ланцюгів одержують шляхом зв'язування варіабельних ділянок легкого та/або важкого ланцюга при використанні коротких зв'язувальних пептидів. Bird *ma in.* (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242: 423-426) описує принцип зв'язування пептидів, що мають місток розміром приблизно 3,5 нм між карбокситермінальним кінцем однієї варіабельної ділянки та амінотермінальним кінцем іншої варіабельної ділянки. Були сконструйовані та використовуються лінкери, що мають інші послідовності (Bird *ma in.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242: 423-426). Лінкери, у свою чергу, можуть бути модифіковані для здійснення інших функцій, таких, як приєднання лікарських засобів або приєднання до твердих поверхонь. Одноланцюгові варіанти можуть бути одержані або рекомбінантно, або синтетичним шляхом. Для синтетичного одержання scFv може використовуватися автоматичний синтезатор. Для рекомбінантної продукції ScFv прийнятна плазмідна, що містить полінуклеотид, який кодує ScFv, може бути введена у прийнятну хазяйську клітину або еукаріот, таку, як клітини дріжджів, рослин, комах або ссавців, або прокаріот, таких, як *E. coli*. Полінуклеотиди, які кодують ScFv, що представляє інтерес, можуть бути одержані шляхом звичайних маніпуляцій, таких, як лігування полінуклеотидів. Отримані ScFv можуть бути ізольовані при використанні стандартних методів

очищення білка, що є відомими в даній галузі.

Винахід включає модифікації антитіл та поліпептидів, які зв'язуються з B7-H3, та його агоністи, антагоністи та модулятори, включаючи функціонально еквівалентні антитіла та поліпептиди, що істотно не впливають на їх властивості, та варіанти, які підвищують або знижують активність. Модифікація поліпептидів є звичайною практикою у даній галузі та не повинна докладно описуватися в даному документі. Приклади зміни поліпептидів включають поліпептиди з консервативними замінами амінокислотних залишків, одне або більше видалення або вставку амінокислот, які не викликають істотної шкідливої зміни функціональної активності, або використання хімічних аналогів. Амінокислотні залишки, які можуть бути консервативно замінені один на інший, включають але без обмеження такими: гліцин/аланін, валін/ізолейцин/лейцин, аспарагін/глутамін; аспарагінова кислота глутамінова кислота, серин/треонін, лізин/аргінін та фенілаланін/триозин. Ці поліпептиди також включають глікозильовані та неглікозильовані поліпептиди, а також поліпептиди з іншими посттрансляційними модифікаціями, такими як, наприклад, глікозильовання з різними цукрами, ацетилювання та фосфорилування. Переважно, амінокислотні заміни будуть консервативними, тобто замінені амінокислоти будуть володіти подібними хімічними властивостями, що й оригінальні амінокислоти. Такі консервативні заміни є відомими у галузі техніки та їх приклади були надані вище. Амінокислотні модифікації можуть варіюватися від зміни або зміни однієї або більше амінокислот до повного переконструювання ділянки, такої, як варіабельна ділянка. Зміни в варіабельних ділянках можуть змінити зв'язувальну афінність та/або специфічність. Інші методи модифікації здійснюють при використанні методик злиття, відомих в даній галузі, включаючи, але не обмежуючись такими, як ферментативні засоби, окисне заміщення та хелатування. Модифікації можуть бути використані, наприклад, для приєднання міток для імуноаналізу, таких, як введення радіоактивних фрагментів для радіоімуноаналізу. Модифіковані поліпептиди одержують при використанні добре відомих процедур та піддають скринінгу при використанні стандартних аналізів, відомих в даній галузі.

Винахід також охоплює злиті білки, що включають один або більше фрагментів або ділянок з поліпептидів та антитіл згідно з даним винаходом. В одному втіленні забезпечується злитий поліпептид, який включає принаймні 10 послідовних амінокислот варіабельної ділянки легкого ланцюга та принаймні 10 амінокислот варіабельної ділянки важкого ланцюга. В іншому втіленні злитий поліпептид містить гетерологічну константну ділянку імуноглобуліну. В іншому втіленні злитий поліпептид містить варіабельні ділянки легкого ланцюга та варіабельні ділянки важкого ланцюга антитіла, одержаного з доступної гібридомі. Для цілей даного винаходу злитий білок антитіла містить один або більше поліпептидних доменів, що специфічно зв'язуються з B7-H3, та іншу амінокислотну послідовність, до якої він не приєднується у нативній молекулі, наприклад, гетерологічну послідовність або гомологічну послідовність з іншої ділянки.

Анти-B7-H3 поліпептиди та інші B7-H3 агоністи, антагоністи та модулятори можуть бути створені за допомогою способів, відомих у галузі техніки, наприклад, синтетично або рекомбінантно. Один спосіб одержання B7-H3 пептидних агоністів, антагоністів та модуляторів втягує хімічний синтез поліпептидів, після чого здійснюють обробку за умов окиснення, прийнятних для одержання нативної конформації, іншими словами, правильних дисульфідних зв'язків. Цього можна досягти при використанні методик, добре відомих спеціалістам у даній галузі техніки (див., наприклад, Kelley, R. F. *ma in.* (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. ред., Plenum Press, N.Y., том 12, стор. 1-19; Stewart, J.M. *ma in.* (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; див. також патенти США №№ 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; та 3,862,925).

Поліпептиди згідно з винаходом можуть бути традиційно одержані при використанні твердофазного синтезу пептидів (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748): 341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15): 5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1): 3-10).

Ще в одному альтернативному втіленні повністю людське антитіло може бути одержане за допомогою застосування комерційно доступних мишей, які були виведені для експресії специфічних білків людського імуноглобуліну. Трансгенні тварини, що є виведеними для продукування більш бажаної (наприклад, повного людського антитіла) або більш сильної імунної відповіді, можуть також використовуватися для одержання гуманізованих або людських антитіл. Приклади такої методики являють собою XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA), HuMAV-MOUSE® та TC MOUSE™ (обидва від Medarex, Inc., Princeton, NJ).

В альтернативному втіленні антитіла можуть бути створені рекомбінантно та експресовані

при використанні будь-якого способу, відомого у галузі техніки. Антитіла можуть бути створені рекомбінантно спочатку за допомогою ізоляції антитіл, одержаних із організму тварини хазяїна, одержання послідовності гена та при використанні цієї послідовності гена для рекомбінантної експресії антитіла у хазяйських клітинах (наприклад, CHO клітинах). Інший спосіб, що може використовуватися, являє собою експресію послідовності антитіла у рослинах (наприклад, тютюну) або трансгенному молоці. Прийнятні способи для рекомбінантної експресії антитіл у рослинах або молоці були розкриті (див., наприклад, Peeters *ma in.* (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," Vaccine 19: 2756; Lonberg, N. *ma in.* (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol 13: 65-93; та Pollock *ma in.* (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," J. Immunol Methods 231: 147-157). Прийнятні способи для одержання похідних антитіл, наприклад, гуманізованих, одноланцюгових, тощо, є відомими у галузі техніки. В іншій альтернативі антитіла можуть бути створені рекомбінантно при використанні технології фагового дисплея (див., наприклад, патенти США №№ 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; та Winter, G. *ma in.* (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," Annu. Rev. Immunol. 12. 433-455).

Антитіла або білок, що представляють інтерес, можуть піддаватися секвенуванню за допомогою деградації Едмана, яка є добре відомою спеціалісту у даній галузі техніки. Інформація про пептиди, одержана за допомогою мас-спектрометрії або деградації Едмана, може використовуватися для конструювання зондів або праймерів, які використовуються для клонування білка, що представляє інтерес.

Альтернативний спосіб клонування білка, що представляє інтерес, здійснюється шляхом "пенінгу" при використанні очищеного B7-H3 або його частин для клітин, що експресують антитіло або білок, який представляє інтерес. B7-H3 існує у вигляді "2Ig" форми та у вигляді "4Ig" форми. Амінокислотна послідовність "2Ig" форми людського B7-H3 являє собою (SEQ ID NO:1):

```
MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQGNASRLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEGSKTALQ
PLKHSDDSKED DGQEIA
```

Послідовність кДНК, що кодує "2Ig" форму людського B7-H3, являє собою (SEQ ID NO:2):

```
atgctgcgctc ggcgggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagaccc agtggtggca
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tcttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg cctcttccc ggacctgctg
gcacagggca acgcatccct gaggtgagc cgcgtgcgtg tggcgagcga gggcagcttc
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc tcagcctgca ggtggccgct
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat
gggcaggggtg tgcccttgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
ttgtttgatg tgacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc
ctggtgcgca acccctgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag
cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt
gcactgctgg tggccctggc ttctgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag
gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag
cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc
```

Амінокислотна послідовність "2Ig" форми людського B7-H3 (SEQ ID NO:1) (приведена нижче,

виділена жирним шрифтом та підкреслена) повністю є включеною у “4lg” форму людського B7-H3 (SEQ ID NO:76):

MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQGNASRLRQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAV**EVQ**
VPEDPVVALV GTDATLRCSE SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASRLRQV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGO
GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEEN
AGAEDQDGE EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA

5

Послідовність кДНК, що кодує “4lg” форму людського B7-H3, являє собою (SEQ ID NO:77); залишки, що кодують “2lg” форму B7-H3, виділені жирним шрифтом та підкреслені:

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtec ctgaagaccc agtgggtggca
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgtctgc tctttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca cagctttgct
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
gcacagggca acgcatccct gaggtgtcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgtccg tcagcctgca ggtggccgct
ccctactcga agcccagcat gacctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
gtgaccatca cgtgtctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtgc agatggccaa cgagcagggc
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat ggcacagct ctgtcaccat cacacccag
agaagcccca caggagccgt **ggaggtccag gtccctgagg acccgggtgtt ggccctagt**
ggcaccgatg ccacctgcg ctgtctcttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc
cgggaccagg gcagcgcta tgccaaccgc acggccctct tccccgacct gctggcacia
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtg gccgtcagcc tgcagggtggc cgctccctac
tcgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc
atcacgtgct ccagctaccg gggctacctt gaggtgtagg tgttctggca ggatgggag
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt
gatgtgcaca gcgtctctgc ggtggtgtct ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg
acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg
ctggtggccc tggctttctg gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat
gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cc

10

Процедура “пенінга” може проводитися шляхом одержання бібліотеки кДНК з тканин або клітин, що експресують B7-H3, понадекспресії кДНК у клітинах іншого типу та скринінгу трансфікованих клітин іншого типу на специфічне зв’язування з B7-H3. Детальні описи способів, що використовуються у клонуванні генів ссавців, які кодують білки поверхні клітин, шляхом “пенінгу”, можуть бути знайдені у даній галузі техніки (див., наприклад, Aruffo, A. *та ін.* (1987)

15

"Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84: 8573-8577 та Stephan, J. *ma in.* (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," Endocrinol. 140: 5841-5854).

кДНК, які кодують анти-B7-H3 антитіла та інші B7-H3 пептидні агоністи, антагоністи та модулятори, можуть бути отримані шляхом зворотної транскрипції мРНК з конкретного типу клітин у відповідності зі стандартними методами, що є відомими у даній області. Зокрема, мРНК може бути ізолювана при використанні різних літичних ферментів або хімічних розчинів у відповідності з процедурами, викладеними у Sambrook та ін., що приведені вище, або може бути екстрагована за допомогою комерційно доступних смол, що зв'язують нуклеїнові кислоти у відповідності із супроводжувальними інструкціями виробників (наприклад, Qiagen, Invitrogen, Promega). Синтезовані кДНК потім вводять в експресійний вектор для одержання антитіла або білка, що представляє інтерес, у клітини іншого типу. Мається на увазі, що експресійний вектор повинен бути здатним до реплікації у хазяйських клітинах або як епісома, або як невід'ємна частина хромосомної ДНК. Прийнятні експресійні вектори включають, але без обмеження такими, плазміди, вірусні вектори, включаючи аденовіруси, адено-асоційовані віруси, ретровіруси та косміди.

Вектори, що містять полінуклеотиди, які представляють інтерес, можуть бути введені у хазяйську клітину за допомогою будь-якого з ряду прийнятних засобів, включаючи електропорацію, трансфекцію з використанням хлориду кальцію, хлориду рубідію, фосфату кальцію, DEAE-декстрану або інших речовин; шляхом бомбардування мікрочастинками; ліпофекції та інфекції (наприклад, де вектор являє собою інфекційний агент, такий, як вірус коров'ячої віспи). Вибір векторів або полінуклеотидів, що вводяться, часто залежить від особливостей хазяйської клітини.

Будь-які хазяйські клітини, здатні до понадекспресії гетерологічних ДНК, можуть бути використані для виділення генів, що кодують антитіло, поліпептиди або білок, що представляють інтерес. Не обмежувальні приклади прийнятних хазяйських клітин ссавців включають, але без обмеження такими, клітини COS, HeLa та CHO. Є бажаним, коли, хазяйські клітини експресують кДНК на рівні близько у 5 разів вище, більш переважно у 10 разів вище, ще більш переважно у 20 разів вище, ніж такий для відповідного ендогенного антитіла або білка, що представляє інтерес, якщо вони є присутніми у хазяйських клітинах. Скринінг хазяйських клітин на специфічне зв'язування з B7-H3 здійснюють за допомогою імуноаналізу або FACS. Клітини, що понадекспресують антитіло або білок, що представляє інтерес, можуть бути ідентифіковані.

Також є доступними різні способи, які зараз використовуються для продукції мутантних B7-H3 пептидних агоністів, антагоністів та модуляторів, які передбачають вставки, делеції або зміни в амінокислотній послідовності одержаного білка у порівнянні із молекулою вихідного пептидного агоніста, антагоніста або модулятора B7-H3.

Винахід включає поліпептиди, що включають амінокислотну послідовність з антитіл згідно з даним винаходом. Поліпептиди згідно з даним винаходом можуть бути одержані за допомогою процедур, відомих в даній галузі техніки. Поліпептиди можуть бути одержані за допомогою протеолітичних методів або інших способів деградація антитіл, рекомбінантними методами (наприклад, одиничний або злитий поліпептид), як описано вище, або шляхом хімічного синтезу. Поліпептиди з антитіл, особливо короткі поліпептиди, що містять до 50 амінокислот, традиційно одержують шляхом хімічного синтезу. Методи хімічного синтезу є відомими в даній галузі техніки та є комерційно доступними. Наприклад, анти-B7-H3 поліпептиди можуть бути одержані при використанні автоматизованого синтезатора поліпептидів за допомогою методу твердих фаз.

IV. Способи скринінгу поліпептидів та моноклональних антитіл

Деякі методи можуть бути використані для скринінгу поліпептидів та моноклональних антитіл, які зв'язуються з B7-H3. Є зрозумілим, що термін "зв'язування" відноситься до біологічно або імунологічно релевантного специфічного зв'язування, та не відноситься до неспецифічного зв'язування, яке може виникати, наприклад, тоді, коли імуноглобулін використовується при дуже високій концентрації проти неспецифічної мішені. В одному втіленні моноклональні антитіла піддаються скринінгу на зв'язування з B7-H3 при використанні стандартних методів скринінгу. Таким чином було отримане анти-B7-H3 моноклональне антитіло. Бажаними гібридомами згідно з даним винаходом є такі, що продукують антитіла BRCA69D, BRCA84D або PRCA157.

Можуть бути ідентифіковані додаткові моноклональні антитіла, які зв'язуються з B7-H3. З цією метою моноклональні антитіла піддаються скринінгу на їх диференціальну здатність

зв'язуватися з раковою тканини, але не з нераковими клітинами. В одному втіленні відбирають моноклональні антитіла, які зв'язуються з B7-H3, та такі є перехресно реактивними в людських ракових клітинах або тканинах, але не в нормальних тканинах клітин або тканинах у такій самій мірі. Один з методів, які можуть використовуватися для скринінгу, являє собою імуногістохімію (ІНС). Стандартні імуногістохімічні методи є відомими середньому спеціалісту у даній галузі техніки. Див., наприклад, *ANIMAL CELL CULTURE METHODS* (J.P. Mather та D. Barnes, ред., Academic Press, NY, том 57, глави 18 та 19, стор. 314-350, 1998). Біологічні зразки (наприклад, тканини) можуть бути отримані з біопсії, аутопсії або з розтину. Щоб з'ясувати, чи є B7-H3 присутнім тільки на ракових клітинах, анти-B7-H3 антитіла можуть бути використані для виявлення присутності B7-H3 на тканинах індивідумів з раком, у той час, як інші неракові тканини від індивідумів, які страждають на рак, або тканин від індивідумів без раку, використовують як контроль. Тканина може поміщатися у тверду або напівтверду речовину, яка запобігає пошкодженню при заморожуванні (наприклад, агарозний гель або OCT), після чого готують зрізи для наступного забарвлювання. Зразки раку з різних органів та на різних стадіях раку можуть бути використані для скринінгу моноклональних антитіл. Приклади тканин, які можуть бути використані для цілей скринінгу, включають, але без обмеження такими, тканини яєчників, молочної залози, легенів, передміхурової залози, товстої кишки, нирки, шкіри, щитовидної залози, головного мозку, серця, печінки, шлунку, нервів, кровоносних судин, кісток, верхніх відділів травного тракту та підшлункової залози. Приклади різних типів раку, які можуть бути використані для цілей скринінгу, включають, але без обмеження такими, карциноми, аденокарциноми, саркоми, аденосаркоми, лімфоми та лейкемії.

Ще в одному альтернативному втіленні лінії ракових клітин, такі, як HMEC (BioWhittaker CC-2251), HUVEC (первинні ендотеліальні клітини), BT-474 (ATCC# HTB-20), MCF7 (ATCC# HTB22), MDA-MB-175-VII (ATCC# HB-25), MDA-MB-361 (ATCC# HB-27), SKBR3 (ATCC# HTB-30), A549 (ATCC# CCL-185), Calu-3 (ATCC# HTB-55), SKMES-I (ATCC# HTB-58), ES-2 (ATCC# CRL-1978), SKOV3 (ATCC# HTB-77), Panc-1 (ATCC# CRL-1469), AsPC-I (ATCC# CRL-1682), HPAF-II (ATCC# CRL-1997), Hs700T (ATCC# HTB-174), Colo205 (ATCC# CCL-222), HT-29 (ATCC# HTB-38), SW480 (ATCC# CCL-228), SW948 (ATCC# CCL-237), 293 (ATCC # CRL-1573), 786-O (ATCC# CRL-1932), A498 (ATCC# HTB-44), Caki-2 (ATCC# HTB-47), COS-7 (ATCC# CRL-1651), RL-65 (ATCC # CRL-10345), SV-T2 (ATCC# CCL-163.1), 22RV1 (ATCC# CRL-2505), DU145 (ATCC# HTB-81), LNCaP (ATCC# CRL-1740), PC-3 (ATCC# CRL-1435), HT29 (ATCC# HTB-38), Hs746T (ATCC# HTB-135), NCI-N87 (ATCC# CRL-5822) та нормальні клітини з відповідних тканин можуть використовуватися для скринінгу на моноклональні антитіла, які є специфічними для ракової тканини. Первинні клітинні культури або такі з невисокою кількістю пасажів, які походять від нормальних тканин з різних органів, включаючи, але без обмеження, культури клітин нирок, яєчників, молочної залози, легенів, передміхурової залози, товстої кишки, нирок, шкіри, щитовидної залози, гладких м'язів аорти, та ендотеліальних клітин, можна використовувати як негативні контролю. Ракові або неракові клітини можуть вирощуватися на предметних або покривних скельцях, або на пластикових поверхнях, або можуть одержані у пристрої CellArray™, як описано у WO01/43869, та піддаватися скринінгу на зв'язування антитіла при використанні ІНС, як описано вище для тканин. Альтернативно, клітини можуть бути видалені з поверхні росту при використанні непротеолітичних засобів, після чого їх піддають центрифугуванню з одержанням осаду, який потім поміщають у парафін та обробляють як тканини для ІНС аналізу, як описано вище. Клітини можуть бути введені імунодефіцитним тваринам, при цьому пухлину залишають для росту, потім цю пухлину можуть вилучати, поміщати у парафін та використовувати як джерело тканини для ІНС аналізу. В іншій альтернативі одиничні клітини можуть піддаватися скринінгу шляхом інкубації з первинним антитілом, вторинним "репортерним" антитілом, зв'язаним з люмінесцентними молекулами та потім аналізуватися при використанні пристрою для здійснення сортування флуоресцентно активованих клітин (FACS).

Будь-яка з декількох різних систем визначення може використовуватися для виявлення зв'язування антитіл на зрізах тканини. Як правило, імуногістохімія передбачає зв'язування первинного антитіла з тканиною, а потім вторинне антитіло, реактивне стосовно видів, з яких одержують первинне антитіло, піддають кон'югації зі здатним до визначення маркером (наприклад, пероксидазою хрому, HRP або діамінобензидином, DAB). Один з альтернативних методів, які можуть бути використані, являє собою поліклональні комплементарні антитіла дзеркального зображення або polyMICA™ (polyclonal Mirror Image Complementary Antibodies; The Binding Site Limited, Birmingham, UK; Mangham, D.C. та ін. (1999) "A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies (MICA)," *Histopathology* 35(2): 129-33). Техніка PolyMICA™ може використовуватися для аналізу зв'язування первинних антитіл (наприклад, анти-B7-H3 антитіл) з нормальною та раковою

тканиною. Кілька видів polyMICA™ комплектів для виявлення є комерційно доступними: продукт під номером HK004.D являє собою polyMICA™ набір для визначення, що використовує DAB хромоген; продукт під номером HK004.A являє собою polyMICA™ набір для визначення, що використовує AEC хромоген. Альтернативно, первинне антитіло може піддаватися

безпосередньому міченню за допомогою здатного до визначення маркера.

Перший етап у скринінгу ІНС для вибору прийняттого антитіла являє собою зв'язування первинних антитіл, які утворилися у мишей (наприклад, анти-B7-H3 антитіл), з одним або більше імуногенами (наприклад, клітин або зразків тканини). В одному втіленні зразок тканини являє собою зрізи замороженої тканини з різних органів. Зразки клітин або тканини можуть бути як раковими, так і не раковими.

Одержують заморожені тканини, готують зрізи, з або без фіксації, та здійснюють ІНС за допомогою будь-якого зі способів, які є відомими спеціалісту у даній галузі техніки (див., наприклад, Stephan *ma in.* (1999) "*Distribution And Function Of The Adhesion Molecule BEN During Rat Development*," Dev. Biol. 212: 264-277 та Stephan *ma in.* (1999) "*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation*," Endocrinology 140: 5841-5854).

V. Способи характеристики анти-B7-H3 антитіл

Будь-який з декількох методів може бути використаний для характеристики анти-B7-H3 антитіл. Один з методів полягає у визначенні епітопа, з яким воно зв'язується. Картування епітопів є комерційно доступним з різних джерел, Наприклад, Pepscan системи (Lelystad, Нідерланди). Картування епітопів може використовуватися для визначення послідовності, з якою зв'язується анти-B7-H3 антитіло. Епітоп може бути лінійним епітопом, тобто міститися у стрічці амінокислот, або конформаційним епітопом, який утворюється за допомогою просторових взаємодій амінокислот, які не обов'язково можуть розміщуватися в одній стрічці.

Пептиди різної довжини (наприклад, переважно такі, що мають довжину принаймні 4-6 амінокислот) можуть бути синтезовані або ізольовані (наприклад, рекомбінантно) та використовуються для зв'язування з анти-B7-H3 антитілом. Епітоп, з яким зв'язується анти-B7-H3 антитіло, може бути визначений шляхом систематичного скринінгу при використанні пептидів, що перекриваються, отриманих з позаклітинної послідовності, та визначення його зв'язування анти-B7-H3 антитілом.

Ще один спосіб, який може використовуватися для характеристики анти-B7-H3 антитіла, являє собою використання конкурентних аналізів з іншими відомими антитілами, які є відомими як такі, що зв'язуються з тим самим антигеном, тобто, B7-H3, для того, щоб визначити, чи зв'язується анти-B7-H3 антитіло з тим самим епітопом інших антитіл. Приклади комерційно доступних антитіл до B7-H3 може бути комерційно доступними та можуть бути ідентифіковані при використанні аналізів зв'язування, як описується в даній заявці. Конкурентні аналізи є добре відомими спеціалістам у даній галузі, та такі процедури та ілюстративні дані докладно будуть описані далі у прикладах. Анти-B7-H3 антитіла можуть бути додатково охарактеризовані тканинами, типами раку або типами пухлини, з якими вони зв'язуються.

Інший спосіб характеристики анти-B7-H3 антитіл являє собою антиген, з яким вони зв'язуються. Анти-B7-H3 антитіла використовувалися у Вестерн-блотах лізатів клітин, одержаних з різних видів раку людини. Як відомо спеціалістові у даній галузі, Вестерн-блоттинг може включати в себе пропускання клітинних лізатів та/або фракцій клітин через денатуруючий або неденатуруючий гель, перенос білків на нітроцелюлозний фільтр, а потім зондування блоту з антитілом (наприклад, анти-B7-H3 антитілом), щоб побачити, які білки зв'язуються антитілом. B7-H3 асоціюється з різними видами раку людини з різних тканин, включаючи, але без обмеження, такими товстої кишки, молочної залози, яєчників, підшлункової залози та легенів.

VI. Способи діагностики раку при використанні анти-B7-H3 антитіл та B7-H3 модуляторів

Моноклональні антитіла до B7-H3, одержані за допомогою способів, описаних в даній заявці, можуть бути використані для визначення наявності або відсутності ракових клітин в різних тканинах, включаючи, але не обмежуючись, такі яєчників, молочної залози, легенів, передміхурової залози, товстої кишки, нирок, підшлункової залози, шкіри, щитовидної залози, головного мозку, серця, печінки, шлунка, нервів, кровоносних судин, кісток та верхніх відділів травного тракту, для цілей діагностики. Моноклональні антитіла до B7-H3, одержані за допомогою способів, описаних в даній заявці, можуть бути також використані для визначення наявності або відсутності ракових клітин або визначення їх рівня у циркулюючій крові після вивільнення із солідних пухлин. Такі циркулюючі антигени може являти собою інтактний B7-H3 антиген або фрагмент його, який зберігає здатність до виявлення у відповідності із методами, описаними в даній заявці. Таке визначення може бути здійснено шляхом FACS аналізу при використанні стандартних методів, які зазвичай використовуються в даній галузі техніки.

Такі використання може втягувати утворення комплексу між B7-H3 та антитілом, яке специфічно зв'язується з B7-H3. Приклади таких антитіл включаються, але без обмеження такими, анти-B7-H3 моноклональні антитіла, що продукуються гібридомами BRCA84D, BRCA69D та PRCA157. Формування такого комплексу може здійснюватися *in vitro* або *in vivo*. Не

5 вдаючись у теорію, моноклональне антитіло анти-B7-H3 може зв'язуватися з B7-H3 за допомогою позаклітинного домену B7-H3 та потім може інтерналізуватися.

У бажаному втіленні методів діагностики згідно з даним винаходом антитіло несе здатну до визначення мітку. Приклади мітки, що може використовуватися, включають радіоактивний агент або флуорофор, такий, як фікоеритрин або ізотіоціанат флуоресцеїну (також відомий як

10 фторізотіоціанат або FITC).

Як і для інших відомих антитіл, що використовуються в комерційних цілях для діагностики та з терапевтичною метою, цільовий антиген згідно з даним винаходом широко експресується в нормальних тканинах. Він також піддається підвищувальній регуляції в деяких пухлинах. Таким чином, конкретні дози та способи доставки антитіл згідно з даним винаходом, які

15 використовуються як діагностичні або терапевтичні агенти, будуть визначатися з урахуванням конкретної пухлини або стану, а також від конкретних індивідумів, яких піддають лікуванню.

Один зі способів використання антитіл для діагностики являє собою одержання зображень *in vivo*, шляхом зв'язування антитіла з радіоактивним або рентгеноконтрастним агентом, введення антитіла індивідуму та використання рентгенівських променів або інших пристроїв

20 для одержання зображень для візуалізацію локалізації міченого антитіла на поверхні ракових клітин, які експресують антиген. Антитіло вводять в концентрації, яка сприяє зв'язуванню при фізіологічних умовах.

In vitro методики для визначення B7-H3 є звичайними у галузі техніки та включають твердофазні імуноферментні аналізи (ELISA), імунопреципітацію, імунофлуоресценцію,

25 імуноферментний аналіз (EIA), радіоімуноаналіз (RIA) та Вестерн-блоттінг аналіз.

В аспектах згідно з даним винаходом способи одержання радіозображення пухлин або новоутворень або вимірювання ефективності методу лікування при використанні міченого антитіла включають стадію введення міченого, специфічного для пухлини антитіла індивідуму у відповідності з практикою згідно з даним винаходом. Мічене антитіло може бути

30 моноклональним або поліклональним антитілом, що включає радіоактивну мітку, бажано вибрану з групи, що складається з технецію-99m, індію-111, йоду-131, ренію-186, ренію-188, самарію-153, лютецію-177, міді-64, скандію-47, ітрію-90. Моноклональні антитіла, мічені при використанні терапевтичних радіонуклідів, таких, як йод-131, реній-188, гольмій-166, самарій-153 та скандій-47, які не знижують імунореактивності антитіл та не руйнуються в *in vivo*, є особливо бажаними. Спеціалістові у даній галузі техніки є зрозумілим, що є відомими інші

35 радіоактивні ізотопи, вони також можуть бути придатними для специфічних застосувань. Одержання радіозображення може бути проведене при використанні однофотонної емісійної комп'ютерної томографії (SPECT), позиційної емісійної томографії (PET), комп'ютерної томографії (CT) або магнітно-резонансної томографії (MPI). Також передбачається одержання

40 кореляційного зображення, що дозволяє одержати краще анатомічне визначення розташування метастазів при використанні радіоімунозображення.

В інших методах ракові клітин видаляються, та тканину готують для імуногістохімічних методів, добре відомих в даній галузі (наприклад, шляхом поміщення у заморожені сполуки, заморожування та одержання зрізів, з фіксацією або без фіксації, фіксації та заключення у

45 парафін при використанні різних способів виявлення антигену та контрастного забарвлювання, або без їх застосування). Моноклональні антитіла також можуть використовуватися для ідентифікації ракових клітин на різних стадіях розвитку. Антитіла також можуть використовуватися для визначення, які пухлини індивідумів експресують антиген на своїй поверхні на заздалегідь визначеному рівні та, таким чином, є кандидатами на проведення

50 імунотерапії при використанні антитіл, направлених проти вказаного антигену. Антитіла можуть впізнавати як первинний рак, так і метастазуючий рак, що експресує B7-H3. Як використовується в даній заявці, виявлення може включати якісне та/або кількісне визначення та може включати порівняння визначеного рівня з таким у нормальній клітині для визначення підвищеного рівня експресії B7-H3 у ракових клітинах.

55 Винахід також забезпечує способи сприяння діагностиці раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують B7-H3, у індивідумів при використанні будь-якого антитіла, яке зв'язується з B7-H3, та будь-які інші способи, які можуть бути використані для визначення рівня експресії B7-H3. Як використовується в даній заявці, способи для "сприяння діагностиці" означають, що ці способи надають допомогу у проведенні клінічного визначення,

60 що стосуються класифікації, або природи, раку, та можуть бути або можуть не бути

переконливим щодо остаточного діагнозу. У відповідності із цим, спосіб сприяння діагностиці раку може включати етап визначення рівня В7-Н3 в біологічному зразку, одержаному від індивідуума, та/або визначення рівня експресії В7-Н3 у зразку. Антитіла, що впізнають антиген або його частину, також можуть використовуватися для створення діагностичних імуноаналізів для виявлення антигену, що вивільняється або секретується із живих або мертвих ракових клітин в рідинах організму, включаючи, але не обмежуючись такими, кров, слину, сечу, легенеvu рідину або асцитну рідину.

Не усі клітини у конкретній пухлині, що представляє інтерес, будуть експресувати В7-Н3, ракові клітини в інших тканинах можуть експресувати В7-Н3, таким чином, індивідууми повинні піддаватися скринінгу на наявність або відсутність В7-Н3 на ракових клітинах для визначення корисності імунотерапії у індивідуумів. Анти-В7-Н3 антитіла, одержані за допомогою способів, описаних у даній заявці, можуть бути використані для визначення, чи буде індивідуум, діагностований як такий, що має рак, вважатися кандидатом на проведення імунотерапії при використанні антитіл, спрямованих проти В7-Н3. В одному втіленні ракова пухлина або зразки біопсії можуть бути перевірені на експресію В7-Н3 при використанні антитіл, спрямованих проти В7-Н3. Індивідууми з раковими клітинами, що експресують В7-Н3, є придатними кандидатами для імунотерапії при використанні антитіл, спрямованих проти В7-Н3. Забарвлювання анти-В7-Н3 антитіла може також використовуватися для того, щоб відрізнити ракові тканини від нормальних тканин.

Способи застосування анти-В7-Н3 антитіл для діагностичних цілей можуть бути використані як до, так після здійснення будь-якої форми протиракового лікування, наприклад, хіміотерапії або променевої терапії, для визначення, які пухлини найбільш ймовірно є чутливими до даного лікування, прогнозу індивідуума, хворого на рак, підтипу пухлини або походження метастатичного захворювання та прогресування захворювання або відповіді на лікування.

Композиції згідно з даним винаходом також є придатними для діагностики станів захворювання, відмінного від раку, при використанні способів, які в загальному вигляді є описаними вище у заявці, з іншими хворими (нераковими) клітинами. Стани захворювання, придатні для використання у способах згідно з даним винаходом, включають, але без обмеження такими, захворювання або розлади, пов'язані із запальними або аутоімуними реакціями у індивідуумів. Методи, описані вище, можуть використовуватися для модуляції запальних або аутоімуних реакцій у індивідуумів. Захворювання та стани, причиною яких є запальні та аутоімуні захворювання, що можуть піддаватися діагностиці та/або лікуванню при використанні композицій та способів згідно з винаходом, включають, як приклад та без обмеження такими, розсіяний склероз, менінгіт, енцефаліт, інсульт, інші церебральні травми, запальні захворювання кишечника, включаючи виразковий коліт та хворобу Крона, міастенію, вовчак, ревматоїдний артрит, бронхіальну астму, гострий ювенільний діабет, СНІД-деменцію, атеросклероз, нефрит, ретиніт, atopічний дерматит, псоріаз, ішемію міокарда та гостре пошкодження легень, опосередковане лейкоцитами.

Інші показання для діагностичного та/або терапевтичного використання антитіл та інших терапевтичних агентів згідно з винаходом включають введення їх індивідуумам, які мають ризик відторгнення органа або трансплантата. За останні роки відбулося значне покращення ефективності хірургічних методів пересадки тканин та органів, таких, як шкіра, нирки, печінка, серце, легені, підшлункова залоза та кістковий мозок. Можливо, основною невирішеною проблемою при цьому є відсутність задовільних агентів для стимулювання імунологічної толерантності у реципієнта пересаджуваного алотрансплантату або органу. Коли аlogenні клітини або органи пересаджують у хазяйський організм (тобто донорів та реципієнт є різними індивідуумами того самого виду), імунна система хазяїна, ймовірно, буде розвивати імунну відповідь на чужорідні антигени у трансплантаті (захворювання хазяїн-проти-трансплантата), що приводить до руйнування пересадженої тканини.

Застосування анти-В7-Н3 антитіл, описаних будь-де у даній заявці, також охоплює застосування інших В7-Н3 агоністів, антагоністів та модуляторів, як описано в даній заявці. У таких втіленнях В7-Н3 агоніст, антагоніст або інший модулятор, відмінний від антитіла, замінюється на В7-Н3 антитіло на описаних етапах, та такі зміни у межах компетенції кваліфікованого спеціаліста звичайно здійснюють для адаптації способу до заміни композиції модулятора В7-Н3.

Моноклональні антитіла до В7-Н3, одержані за допомогою способів, описаних у даній заявці, можуть бути використані для визначення наявності або відсутності ракових стовбурових клітин людини в різних тканинах. Ракові стовбурові клітини (CSC), як було передбачено, грають певну роль у рості пухлини та метастазах (Ghotra, V.P. *та ін.* (2009) "The Cancer Stem Cell Microenvironment And Anti-Cancer Therapy," *Int. J. Radiat. Biol.* 85(11): 955-962; Gupta, P.B. *та ін.*

(2009) "Cancer Stem Cells: Mirage Or Reality?" Nat. Med. 15(9): 1010-1012; Lawson, J.C. *ma in.* (2009) "Cancer Stem Cells In Breast Cancer And Metastasis," Breast Cancer Res. Treat. 118(2): 241-254; Hermann, P.C. *ma in.* (2009) "Pancreatic Cancer Stem Cells--Insights And Perspectives," Expert Opin. Biol. Ther. 9(10): 1271-1278; Schatton, T. *ma in.* (2009) "Identification And Targeting Of Cancer Stem Cells," Bioessays 31(10): 1038-1049; Mittal, S. *ma in.* (2009) "Cancer Stem Cells: The Other Face Of Janus," Amer. J. Med. Sci. 338(2): 107-112; Alison, M.R. *ma in.* (2009) "Stem Cells And Lung Cancer: Future Therapeutic Targets?" Expert Opin. Biol. Ther. 9(9): 1127-1141; Charafe-Jauffret, E. *ma in.* (2009) "Breast Cancer Stem Cells: Tools And Models To Rely On," BMC Cancer 9: 202; Scopelliti, A. *ma in.* (2009) "Therapeutic Implications Of Cancer Initiating Cells," Expert Opin. Biol. Ther. 9(8): 1005-1016; публікація PCT WO 2008/091908). Відповідно до цієї гіпотези CSC забезпечують невелику, відмінну підмножину клітин в кожній пухлині, які є здатними до необмеженого самовідтворення та розвиваються в більш дорослу(і) пухлинну(і) клітину(и), що є відносно обмеженими у своїй здатності до реплікації. Була висловлена гіпотеза, що ці ракові стовбурові клітини можуть бути більш стійкими до хіміотерапевтичних агентів, радіаційних або інших токсичних умов, та, таким чином, є стійкими після клінічної терапії та пізніше перетворюються у вторинні пухлини, метастази або несуть відповідальність за рецидиви. Було висловлено припущення, що CSC можуть виникати або від "нормальних" стовбурових клітин тканини, або від більш диференційованих тканинних клітин попередників.

Людські ракові стовбурові клітини мають кілька визначальних характеристик. Такі характеристики описані в публікації PCT WO 2008/091908 та включені сюди як посилання. Моноклональні антитіла до мішеней на клітинній поверхні ракових стовбурових клітин можуть використовуватися для визначення наявності або відсутності раку стовбурових клітин в різних тканинах. Моноклональні антитіла до B7-H3, одержані за допомогою способів, описаних в даній заявці, можуть також бути використані для визначення наявності або відсутності раку стовбурових клітин або рівня раку стовбурових клітин у зразку або тканині або у руслі крові після їх звільнення із солідних пухлин. Такий циркулюючий антиген може бути інтактним B7-H3 антигеном або його фрагментом, який зберігає здатність бути виявлений у відповідності із способами, розкритими у даній заявці. Таке визначення може бути проведене за допомогою FACS аналізу при використанні стандартних методів, які зазвичай використовуються в даній області. В іншому втіленні таке визначення може бути проведене за допомогою імуногістохімічного аналізу зразків тканин при використанні стандартних методик, які зазвичай використовуються в даній галузі техніки.

Такі застосування передбачають утворення комплексу між B7-H3 та антитілом, яке специфічно зв'язується з B7-H3 на ракових стовбурових клітинах. Приклади таких антитіл включають, але без обмеження, анти-B7-H3 моноклональні антитіла, що продукуються гібридомами BRCA84D, BRCA69D та PRCA157. Формування такого комплексу може здійснюватися *in vitro* або *in vivo*.

Застосування, описані у даній заявці, що поширюються на застосування анти-B7-H3 антитіл, також охоплюють застосування інших B7-H3 агоністів, антагоністів та модуляторів, як описано в даній заявці, для застосування при ідентифікації та лікування раку стовбурових клітин. У таких варіантах анти-B7-H3 антитіла та інші B7-H3 агоністи, антагоністи та модулятори використовуються для ідентифікації, діагностики або терапевтичного лікування раку стовбурових клітин при використанні способів, подібних до описаних у даній заявці, та змін у рамках компетенції звичайного кваліфікованого практикуючого спеціаліста, які зроблені для того, щоб адаптувати спосіб до ідентифікації / діагностики або лікування раку стовбурових клітин.

VII. Бажані композиції згідно з даним винаходом

Даний винахід охоплює композиції, включаючи фармацевтичні композиції, які містять анти-B7-H3 антитіла, поліпептиди, що походять від анти-B7-H3 антитіл, полінуклеотиди, що включають послідовність, яка кодує анти-B7-H3 антитіла, та інші агенти, як описується в даній заявці. Як використовується в даній заявці, композиції додатково включають одне або більше антитіл, поліпептидів та/або білків, що зв'язуються з B7-H3, B7-H3 агоністи, антагоністи, модулятори та/або один або більше полінуклеотидів, що включають послідовності, які коднують одне або більше антитіл, поліпептидів та білків, що зв'язуються з B7-H3.

Винахід додатково забезпечує кон'югати будь-якого B7-H3 пептидного агоніста, антагоніста або модулятора та додаткові хімічні структури, які підтримують визначену функцію або функції, зокрема, B7-H3 пептидного агоніста, антагоніста або модулятора.

Ці кон'югати включають B7-H3 пептидний агоніст, антагоніст або модулятор, ковалентно зв'язаний з макромолекулами такими, як будь-який нерозчинний, твердий матрикс основи, що використовуються у діагностичних процедурах, процедурах скринінгу або очистки, що

обговорюються в даній заявці. Прийнятні матриксні матеріали включають будь-яку речовину, яка є хімічно інертною, має високу пористість та велику кількість функціональних груп, здатних до утворення ковалентних зв'язків з пептидними лігандами. Приклади матриксних матеріалів та процедур для одержання кон'югатів матрикс-ліганд є описаними у Dean *ma in.* (Eds) *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, IRL Press (1985); Lowe, "An Introduction to Affinity Chromatography", у *Work ma in.* (ред.) *Laboratory Techniques in Biochemistry та Molecular Biology*, том 7, частина II, North-Holla (1979); Porath *ma in.*, "Biospecific Affinity Chromatography", у Neurath, H. *ma in.* (ред.), *The Ptroteins*, 3-є вид., том 1, стор. 95-178 (1975); та Schott, H. *Affinity Chromatography*, Macel Dekker, Inc. NY (1984).

Також у даній заявці забезпечуються кон'югати B7-H3 пептидного агоніста, антагоніста або модулятора та будь-якого репортерного залишку, що використовується у діагностичних процедурах, що обговорюються в даній заявці. Агенти, поліпептиди та білки B7-H3 пептидного агоніста, антагоніста або модулятора згідно з даним винаходом, включаючи анти-B7-H3 антитіла, додатково ідентифікують та характеризують за допомогою будь-якого (одного або більше) з наступних критеріїв:

(а) здатність до специфічного зв'язування з B7-H3 (та, зокрема B7-H3 молекулами, що експресуються на поверхні ракових клітин, включаючи, але без обмеження, ракові клітини нирки, передміхурової залози або легені);

(b) здатність до конкурентного інгібування переважного зв'язування відомого анти-B7-H3 антитіла з B7-H3, включаючи здатність до переважного зв'язування з тим самим епітопом B7-H3, з яким переважно зв'язується вихідне антитіло;

(с) здатність зв'язуватися з частиною B7-H3, що знаходиться на поверхні живої клітини, *in vitro* або *in vivo*;

(d) здатність зв'язуватися з частиною B7-H3, що знаходиться на поверхні живої ракової клітини, що експресує B7-H3;

(е) здатність до доставки хіміотерапевтичного агента до ракових клітин (таких, як ракові клітини нирки, передміхурової залози або легені), які експресують B7-H3 на своїй поверхні; та/або

(f) здатність до доставки терапевтичного агента або здатного до визначення маркера у ракові клітини (такі, як, але без обмеження, ракові клітини передміхурової залози), які експресують B7-H3 на своїй поверхні.

Бажане антитіло згідно з винаходом буде демонструвати диференціальне ІНС забарвлювання пухлинної тканини у порівнянні із нормальною, нераковою тканиною, та буде, крім того, здатним до тестування у моделях приматів (та, зокрема, мавп циномогус) ефективності антитіла. Бажані антитіла згідно з даним винаходом будуть додатково демонструвати бажані рівні афінності та антигенної специфічності. Бажані антитіла згідно з даним винаходом будуть додатково демонструвати бажані рівні імуномодуляторної активності та клітинної інтерналізації.

У деяких втіленнях антитіло згідно з винаходом являє собою антитіло, що виробляється гібридомою BRCA84D, BRCA69D або PRCA157, або їх потомством. Даний винахід також охоплює різноманітні композиції антитіл, які виробляються цими задепонованими гібридомами, та еквівалентні антитіла або поліпептидні фрагменти (наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂ Fv, Fc, etc.), химерні антитіла, одиничні ланцюги (scFv), їх мутанти, злиті білки, що включають частину антитіла, гуманізовані антитіла та будь-яку іншу модифіковану конфігурацію будь-якого з цих або еквівалентних антитіл, що включає сайт впізнання антигену (B7-H3), сайт впізнання необхідної специфічності. Винахід також забезпечує людські антитіла, які демонструють одну або більше з біологічних характеристик члена родини анти-B7-H3. Еквівалентні антитіла родини анти-B7-H3 (включаючи гуманізовані антитіла та людські антитіла), поліпептидні фрагменти та поліпептиди, що включають будь-який з цих фрагментів, ідентифікуються та характеризують за допомогою будь-якого одного (одного або більше) з п'яти критеріїв, описаних вище. Послідовності мишачого та типового гуманізованого варіабельного домену анти-B7-H3 антитіла забезпечуються у публікації PCT WO2008/066691. Такі послідовності забезпечуються тільки як ілюстрація, але не як обмеження, та різноманітні послідовності, а також фрагменти та варіанти забезпечуваної послідовності, охоплюються об'ємом згідно з даним винаходом.

BRCA84D, BRCA69D та PRCA157 являють собою переважні B7-H3 антитіла згідно з даним винаходом завдяки їх більш чітким профілям ІНС у нормальній тканині, більш сильній відмінності у пухлинному/нормальному ІНС, від помірного до сильного зв'язування (BIACORE™)/ІНС), перехресній реактивності з B7-H3 мавп циномогус та потужній активності по відношенню до універсальних DART™ молекул ("UDART™") у порівнянні із іншими антитілами. Зокрема, бажані втілення винаходу охоплюють химерні та гуманізовані варіанти цих бажаних

антитіл, а також нативні, химерні та гуманізовані варіанти цих бажаних антитіл, що мають модифіковані Fc ділянки так, як описано вище. Винахід додатково охоплює DART™ молекули, які мають епітопзв'язувальні ділянки таких антитіл, зокрема, разом з епітопзв'язувальною(ими) ділянкою(ами), що зв'язуються з рецептором Т-клітин, NKG2D рецептором або антигеном, асоційованим з пухлиною, або з гаптеном, таким, як флуоресцеїн (наприклад, флуоресцеїн ізотіоціанат (що також є відомим як фторізоціанат або FITC)).

У деяких втіленнях антитіла, поліпептиди та білки згідно з винаходом, що зв'язуються з B7-H3, являють собою антитіла, поліпептиди та білки, що конкурентно інгібують переважне зв'язування вказаного у даній заявці анти-B7-H3 антитіла з B7-H3. У деяких втіленнях антитіла, поліпептиди та білки переважно зв'язуються з тим самим епітопом на B7-H3, який переважно зв'язує ту-анти-B7-H3.

У відповідності із цим винахід забезпечує будь-який з наступних продуктів (або композицій, включаючи фармацевтичні композиції, що містять будь-яке з наступних): (а) антитіло, що виробляється хазяйською клітиною з депозитним номером, що є вказаним вище, або її потомством; (b) гуманізована форма такого антитіла; (c) антитіло, що включає одну або більше варіабельних ділянок легкого ланцюга та/або важкого ланцюга такого антитіла; (d) химерне антитіло, що включає варіабельні ділянки, гомологічні варіабельним ділянкам важкого ланцюга та легкого ланцюга такого антитіла, або такі, що походять від них, та константні ділянки, гомологічні константним ділянкам важкого ланцюга та легкого ланцюга людського антитіла, або такі, що походять від них; (e) антитіло, що включає один або більше CDR легкого ланцюга та/або важкого ланцюга (принаймні один, два, три, чотири, п'ять або шість) такого антитіла; (f) антитіло, що включає важкий та/або легкий ланцюг такого антитіла; (g) людське антитіло, що є еквівалентним такому антитілу. Гуманізована форма цього антитіла може мати або може не мати CDR, ідентичних такому вихідному антитілу, або антитілу, що виробляється хазяйською клітиною з депозитним номером, що є вказаним вище. Визначення CDR ділянок знаходиться у межах компетенції спеціаліста у даній галузі техніки. У деяких втіленнях винахід забезпечує антитіло, яке включає принаймні один CDR, який є суттєво гомологічним принаймні одному CDR, принаймні двом, принаймні трьом, принаймні чотирьом, принаймні п'яти CDR антитіла, що виробляється однією з ідентифікованих вище задепонованих гібридом (або у деяких втіленнях є суттєво гомологічним до усіх 6 CDR одного з цих антитіл, або такими, що походять від цих антитіл), або антитіло виробляється хазяйською клітиною з депозитним номером, ідентифікованим вище. Інші втілення включають антитіла, які мають принаймні два, три, чотири, п'ять або шість CDR антитіла, що продукується гібридом, задепонованою так, як ідентифіковано в даній заявці, або антитіла, які одержують з такого антитіла. При цьому є зрозумілим, що для цілей згідно з даним винаходом зв'язувальна специфічність та/або загальна активність (яка може бути у рамках доставки хіміотерапевтичного агента до або у ракові клітини для зниження росту та/або проліферації ракових клітин, для індукції апоптичної смерті ракових клітин, для затримки розвитку метастазів та/або паліативного лікування) в загальному випадку буде зберігатися, незважаючи на те, що ступінь активності може варіювати у порівнянні із антитілом, що виробляється задепонованими гібридами (може бути більшою або меншою). Винахід також забезпечує способи одержання таких антитіл. Способи одержання антитіл є відомими у галузі техніки та описуються у даній заявці.

Винахід також забезпечує поліпептиди, що включають амінокислотну послідовність антитіл згідно з даним винаходом. У деяких втіленнях поліпептид включає одну або більше варіабельних ділянок легкого ланцюга та/або важкого ланцюга антитіла. У деяких втіленнях поліпептид включає одну або більше CDR легкого ланцюга та/або важкого ланцюга антитіла. У деяких втіленнях поліпептид включає три CDR легкого ланцюга та/або важкого ланцюга антитіла. У деяких втіленнях поліпептид включає амінокислотну послідовність антитіла, що має будь-яке з наступних: принаймні 5 суміжних амінокислот послідовності вихідного антитіла, принаймні 8 суміжних амінокислот, принаймні приблизно 10 суміжних амінокислот, принаймні приблизно 15 суміжних амінокислот, принаймні приблизно 20 суміжних амінокислот, принаймні приблизно 25 суміжних амінокислот, принаймні приблизно 30 суміжних амінокислот, де принаймні 3 з цих амінокислот є такими з варіабельної ділянки антитіла. В одному втіленні варіабельні ділянки є такими з легкого ланцюга вихідного антитіла. В іншому втіленні варіабельні ділянки є такими з важкого ланцюга антитіла. В іншому втіленні 5 (або більше) суміжних амінокислот є такими з ділянки антитіла, що визначає комплементарність (CDR).

У деяких втіленнях згідно з даним винаходом клітини згідно з даним винаходом, що експресують B7-H3, частину B7-H3, анти-B7-H3 антитіла або інші поліпептиди, які зв'язують B7-H, згідно з даним винаходом, вводяться безпосередньо індивідууму для модуляції *in vivo* B7-H3 біологічної активності.

Бажані анти-B7-H3 антитіла згідно з даним винаходом являють собою BRCA84D, BRCA69D та PRCA157, які усі є мишачими реактивних антитілами стосовно молекули людського B7-H3. Амінокислотні послідовності та полінуклеотидні послідовності, що кодують варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг BRCA84D, BRCA69D та PRCA157, є представленими

5 нижче разом з відповідними CDR₁, CDR₂ та CDR₃ доменами кожного з таких ланцюгів. Спеціалісти у даній галузі техніки, таким чином, будуть здатними сконструювати антитіла, які мають такі CDR, а також їх похідні, здатні до зв'язування з епітопами, які впізнаються BRCA84D, BRCA69D та PRCA157.

A. Послідовності BRCA84D

10 (1) Послідовності легкого ланцюга BRCA84D

Амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:3):

```
DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVDTNVAWYQQKP GQSPKALIYS
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINNVSQ EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGS
GTKLEIK
```

15 Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг BRCA84D (SEQ ID NO:4):

```
gacattgcga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc
gtcacctgca aggcagtc gaattgtgat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtccctgat
cgcttcacag gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtc
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcgggctcg
gggacaaagt tggaaataaa a
```

CDR₁ варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:5): KASQNVDTNVA

20 Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₁ варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:6): aaggccagtc agaattgtga tactaatgta gcc

CDR₂ варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:7): SASYRYS

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₂ варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:8): tcggcctcct accggtacag t

25 CDR₃ варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:9): QQYNNYPFT

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₃ варіабельного легкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:10): sagcaatata acaactatcc attcacg

(2) Послідовності важкого ланцюга BRCA84D

Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:11):

30

```
DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYCYGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTTLTV SS
```

Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг BRCA84D (SEQ ID NO:12):

35

```
gatgtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg acagtagtgc catctactat
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg
gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc
tcctca
```

CDR₁ варіабельного важкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:13): FGMH

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₁ варіабельного важкого ланцюга BRCA84D

(SEQ ID NO:14): tttggaatgcac

CDR₂ варіабельного важкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:15): YISSDSSAIYYADTVK

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₂ варіабельного важкого ланцюга BRCA84D

(SEQ ID NO:16): tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

5 CDR₃ варіабельного важкого ланцюга BRCA84D (SEQ ID NO:17): GRENIYYGSRLDY

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₃ варіабельного важкого ланцюга BRCA84D

(SEQ ID NO:18): gggagggaaa acatttacta cggtagtagg ctgactac

B. Послідовності BRCA69D

(1) Послідовності легкого ланцюга BRCA69D

10 Амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:19):

DIQMTQTTSS LSASLGDRV T ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTIDNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

15 Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг BRCA69D (SEQ ID NO:20):

gatattccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aattatttaa actgggtatca gcagaaacca
gatggaaactg ttaaaactcct gatctactac acatcacgat tacactcagg agtcccatca
aggttcagtg gcagtggggc tggaacagat tattctctca ccattgacaa cctggagcaa
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttcctccgac gttcgggtgga
ggcaccaaac tggaatatcaa a

20 CDR₁ варіабельного легкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:21): RASQDISNYLN

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₁ варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

(SEQ ID NO:22): agggcaagtc aggcattag taattatta aac

CDR₂ варіабельного легкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:23): YTSRLHS

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₂ варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

(SEQ ID NO:24): tacacatcac gattacactc a

25 CDR₃ варіабельного легкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:25): QQGNTLPPT

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₃ варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

(SEQ ID NO:26): саасagggta atacgcttcc tccgacg

(2) Послідовності важкого ланцюга BRCA69D

Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:27):

QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT
IYPGDG DTRY TQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARRG
30 IPRLWYFDVW GAGTTVTVSS

Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг BRCA69D (SEQ ID NO:28):

caggttcagc tccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg
tcttgcaagg ctcttggtca cacctttact agctactgga tgcagtggtg aaaacagagg
cctggacagg gtctggaatg gattgggact atttatcctg gagatggtga tactaggtag
actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac
atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcgggtct attactgtgc aagaagaggg
attccacggc tttggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca

35 CDR₁ варіабельного важкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:29): SYWMQ

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₁ варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

(SEQ ID NO:30): agctactgga tgca

CDR₂ варіабельного важкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:31): TIYPGDGDTR YTQKFKG

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₂ варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

(SEQ ID NO:32): actatttact ctggagatgg tgactactag tacactcag aagttcaagg gc

CDR₃ варіабельного важкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:33): RGIPRLWYFD V
 Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₃ варіабельного важкого ланцюга BRCA69D (SEQ ID NO:34): agagggattc cacggctttg gtacttcgat gtc
 С. Послідовності PRCA157

5 (1) Послідовності легкого ланцюга PRCA157

Амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:35):

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN
 TKTLPEGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLOP EDFGRYYCQH HYGTPPWTFG
 GGTNLEIK

Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг PRCA157 (SEQ ID NO:36):

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga
 aactgtcacc attacatgtc gagcaagtga gagtatttac agttatttag
 catggatatca gcagaaacag ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat
 acaaaaacct taccagaggg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc
 aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct gaagattttg
 ggagatatta ctgtcaacat cattatggta ctctccgtg gacgttcggt
 ggagggcacca acctggaaat caaa

10

CDR₁ варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:37): RASESIYSYLA

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₁ варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:38): scagcaagt agagtattta cagttattta gca

CDR₂ варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:39): NTKTLPE

15

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₂ варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:40): aatacaaaa cttaccaga g

CDR₃ варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:41): QHHYGTTPPW

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₃ варіабельного легкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:42): saacatcatt atggactcc tccgtgg

20

(2) Послідовності важкого ланцюга PRCA157

Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:43):

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT
 INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYICARHD
 GGAMDYWGQG TSVTVSS

25

Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг PRCA157 (SEQ ID NO:44):

gaggtgcagc aggtggagtc ggggggagac ttagtgaagc ctggagggtc
 cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tcctatggca
 tgtcttgggt tcgccagact ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc
 attaatagtg gtggaagtaa cacctactat ccagacagtt tgaaggggag
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctttac ctgcaaatgc
 gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgac
 gggggagcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc cctctcctc a

30

CDR₁ варіабельного важкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:45): SYGMS

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₁ варіабельного важкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:46): tcctatggca tgtct

CDR₂ варіабельного важкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:47): VATINSGGSN TYYPDSLKG

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₂ варіабельного важкого ланцюга PRCA157

(SEQ ID NO:48): gtcgcaacca ttaatagtg tggaagtaac acctactatc cagacagttt gaagggg

CDR₃ варіабельного важкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:49): HDGGAMDY

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR₃ варіабельного важкого ланцюга PRCA157 (SEQ ID NO:50): catgacgggg gagctatgga ctac

5 D. Fc-сконструйовані B7-H3 антитіла

При традиційній імунній функції взаємодія комплексів антитіло-антиген з клітинами імунної системи приводить до широкої різноманітності відповідей, що коливаються від ефекторних функцій, таких, як залежна від антитіл цитотоксичність, втрата зернистості мастоцитами та фагоцитоз у відповідь на імуномодуляторні сигнали, такі, як регуляція лімфоцитарної проліферації та секреція антитіл. Усі ці взаємодії ініціюються шляхом зв'язування Fc домену антитіла або імунних комплексів із спеціалізованими рецепторами на поверхні клітин на гематопоетичних клітинах. Різноманітність клітинних відповідей, що запускається антитілами та імунними комплексами, походить від структурної гетерогенності трьох Fc рецепторів: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) та FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) та FcγRIII (CD16) являють собою активувальні рецептори (тобто такі, що стимулюють імунну систему); FcγRIIB (CD32B) є інгібувальним рецептором (тобто таким, що інгібує імунну систему). Амінокислотна послідовність Fc ділянки IgG1 є представленою нижче (як SEQ ID NO:51, нумерація у відповідності із Kabat *ma in.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^е вид. Public Health Service, NIH, MD (1991), що чітко є введеною у дану заяву як посилання, та далі називається як "Kabat EU"):

SEQ ID NO:51

PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
230	240	250	260	270
DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP
280	290	300	310	320
APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV
330	340	350	360	370
EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH
380	390	400	410	420
EALHNHYTQK	SLSLSPGK			
430	440			

25 Залишки 230-341 являють собою Fc CH2 ділянку. Залишки 342-447 являють собою Fc CH3 ділянку.

Даний винахід включає антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H3, що включають варіант Fc ділянки, що має одну або більше амінокислотних модифікацій (наприклад, замін, делецій, інсерцій) в одній або більше частинах, де модифікації підвищують афінність та авідність варіанта Fc ділянки для FcγR (включаючи активацію та інгібування FcγRs). У деяких втіленнях вказані одна або більше амінокислотні модифікації підвищують афінність варіанта Fc ділянки для FcγRIIA та/або FcγRII. В іншому втіленні варіант Fc ділянки додатково специфічно зв'язує FcγRIIB з більш низькою афінністю, ніж така для Fc ділянки порівнюваного вихідного антитіла (тобто антитіла, що має таку саму амінокислотну послідовність, що й антитіло згідно з винаходом, за винятком однієї або більше амінокислотних модифікацій у Fc ділянці). У деяких втіленнях такі модифікації підвищують афінність варіанта Fc ділянки для FcγRIIA та/або FcγRII та також підвищують афінність варіанта Fc ділянки для FcγRIIB у порівнянні із вихідним антитілом. В інших втіленнях вказані одна або більше амінокислотні модифікації підвищують афінність варіанта Fc ділянки для FcγRIIA та/або FcγRII, але не змінюють афінність варіанта Fc ділянки для FcγRIIB у порівнянні із Fc ділянкою вихідного антитіла. В іншому втіленні вказані одна або більше амінокислотних модифікацій підвищують афінність варіанта Fc ділянки для FcγRIIA та FcγRII, але знижують афінність для FcγRIIB порівнянні із вихідним антитілом. Підвищена афінність та/або авідність приводить до здатного до визначення зв'язування з FcγR або пов'язаної з FcγR активності у клітинах, що експресують низькі рівні FcγR, коли зв'язувальна афінність вихідної молекули (без модифікованої Fc ділянки) не може визначатися у клітині. В інших втіленнях модифіковані молекули демонструють здатне до визначення зв'язування у

клітинах, які експресують цільові антигени, відмінні від Fc γ R рецептора, при щільності від 30000 до 20000 молекул/клітина, при щільності від 20000 до 10000 молекул/клітина, при щільності від 10000 до 5000 молекул/клітина, при щільності від 5000 до 1000 молекул/клітина, при щільності від 1000 до 200 молекул/клітина або при щільності 200 молекул/клітина або менше (але

5 принаймні 10, 50, 100 або 150 молекул/клітина).

В іншому втіленні вказані одна або більше модифікацій амінокислот Fc ділянки знижують афінність та авідність антитіла для одного або більше Fc γ R рецепторів. У специфічному втіленні винахід охоплює антитіла, що включають варіантну Fc ділянку, де вказана варіантна Fc ділянка включає принаймні одну амінокислотну модифікацію у порівнянні із Fc ділянкою дикого

10 типу, де варіантна Fc ділянка зв'язує тільки Fc γ R, і де вказаний Fc γ R являє собою Fc γ R11A. В іншому специфічному втіленні винахід охоплює антитіла, що включають варіантну Fc ділянку, де вказана варіантна Fc ділянка включає принаймні одну амінокислотну модифікацію у порівнянні із Fc ділянкою дикого типу, де варіантна Fc ділянка зв'язує тільки один Fc γ R, і де вказаний Fc γ R являє собою Fc γ R11A.

15 Є бажаним, коли зв'язувальні властивості молекул згідно з винаходом характеризуються *in vitro* функціональними аналізами для визначення однієї або більше Fc γ R клітинних медіаторних ефекторних функцій (Див. Розділ 5.2.7). Афінності та зв'язувальні властивості цих молекул, наприклад, антитіл згідно з винаходом для Fc γ R, можуть бути визначені при використанні *in vitro* аналізів (біохімічних та імунологічних аналізів), які є відомими у галузі техніки для визначення

20 взаємодій антитіло-антиген або Fc-Fc γ R, тобто специфічного зв'язування антигену з антитілом або специфічного зв'язування Fc ділянки з Fc γ R, відповідно, включаючи, але без обмеження такими, ELISA аналіз, аналіз на основі поверхневого плазмонного резонансу, аналізи преципітації. У найбільш бажаних втіленнях молекули згідно з винаходом мають подібні зв'язувальні властивості у *in vivo* моделях (таких, як ті, що є розкритими в даній заявці) та

25 такими, одержаними в аналізах *in vitro*. Проте даний винахід не виключає молекул згідно з винаходом, які не демонструють бажаного фенотипу в аналізах *in vitro*, проте демонструють бажаний фенотип в аналізах *in vivo*.

У деяких втіленнях молекули згідно з винаходом, що включають варіантну Fc ділянку, включають принаймні одну амінокислотну модифікацію (наприклад, мають 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

30 або більше амінокислотних модифікацій) у CH3 домені Fc ділянки, яка визначається як подовження амінокислот 342-447. В інших втіленнях молекули згідно з винаходом, що включають варіантну Fc ділянку, включають принаймні одну амінокислотну модифікацію (наприклад, мають 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше амінокислотних модифікацій) у CH2 домені Fc ділянки, яка визначається як подовження амінокислот 231-341. У деяких втіленнях молекули

35 згідно з винаходом, що включають варіантну Fc ділянку, включають принаймні одну амінокислотну модифікацію (наприклад, мають 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше амінокислотних модифікацій), де принаймні одна така модифікація знаходиться у CH3 ділянці та принаймні одна така модифікація знаходиться у CH2 ділянці. Винахід додатково охоплює амінокислотні модифікації у шарнірній ділянці. В окремому втіленні винахід охоплює амінокислотну

40 модифікацію у CH1 домені Fc ділянки, яка визначається як подовження амінокислот 216-230.

В особливо бажаних втіленнях винахід охоплює молекули, що включають варіантну Fc ділянку, де вказаний варіант забезпечує або має підвищену ADCC активність та/або підвищене зв'язування з Fc γ R11A (CD32A), як вимірюється при використанні способів, що є відомими

45 спеціалістові у даній галузі техніки та приведені у даній заявці. Аналізи ADCC, що використовуються у відповідності із способами згідно з винаходом, можуть бути NK залежними або залежними від макрофагів.

В особливо бажаних втіленнях винахід охоплює молекули, що включають варіантну Fc ділянку, де вказаний варіант забезпечує або має підвищену ADCC активність та/або підвищене зв'язування з Fc γ R11A (CD16A), як вимірюється при використанні способів, що є відомими

50 спеціалістові у даній галузі техніки та приведені у даній заявці. Аналізи ADCC, що використовуються у відповідності із способами згідно з винаходом, можуть бути NK залежними або залежними від макрофагів.

Fc варіанти даного винаходу можуть поєднуватися з іншими Fc модифікаціями, такими, як ті, що є розкритими у патентах США №№ 7,632,497; 7,521,542; 7,425,619; 7,416,727; 7,371,826; 7,355,008; 7,335,742; 7,332,581; 7,183,387; 7,122,637; та 6,737,056; у публікаціях PCT WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; та у WO 04/063351; та у Presta, L.G. *ma in.* (2002) "Engineering therapeutic antibodies for improved function," Biochem. Soc. Trans. 30(4): 487-490; Shields, R.L. *ma in.* (2002) "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding

60 to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity," J. Biol. Chem. 26;277(30): 26733-

26740 та Shields, R.L. *ma in.* (2001) "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R," J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604). Винахід охоплює поєднання Fc варіанту згідно з винаходом з іншими Fc модифікаціями для забезпечення адитивних, синергетичних або нових властивостей модифікованого антитіла.

Є бажаним, коли Fc варіанти згідно з винаходом поліпшують фенотип модифікації, з якою вони поєднуються. Наприклад, якщо Fc варіант згідно з винаходом поєднують з мутантом, що є відомим як такий, який зв'язує FcγRIIIA з більш високою афінністю, ніж порівнювана Fc ділянка дикого типу; поєднання з мутантом згідно з винаходом приводить до більшої кратності підвищення афінності FcγRIIIA.

Винахід охоплює антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H3, що включають варіантну Fc ділянку, де варіантна Fc ділянка включає принаймні одну амінокислотну модифікацію (наприклад, наявність 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше амінокислотних модифікацій) у порівнянні із Fc ділянкою дикого типу, так, що молекула має поліпшену ефекторну функцію у порівнянні з молекулою, що включає Fc ділянку дикого типу, за умови, що варіантна Fc ділянка не має заміни або не є єдиною заміною в одному або більше з наступних положень 243, 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. У специфічному втіленні винахід охоплює такі антитіла, що включають варіантну Fc ділянку, де варіантна Fc ділянка включає принаймні одну амінокислотну модифікацію (наприклад, включає 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше амінокислотних модифікацій) у порівнянні із Fc ділянкою дикого типу, так, що молекула зв'язує FcγR зі зміненою афінністю у порівнянні з молекулою, що включає Fc ділянку дикого типу, за умови, що варіантна Fc ділянка не має заміни або не є єдиною заміною в одному або більше з наступних положень 243, 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 320, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 та не має аланіну у будь-якому з положень 256, 290, 298, 312, 326, 333, 334, 359, 360 або 430; аспарагіну у положенні 268; глутаміну у положенні 272; глутаміну, серину або аспарагінової кислоти у положенні 286; серину у положенні 290; метіоніну у положенні 301; метіоніну, глутаміну, глутамінової кислоти або аргініну у положенні 320; глутамінової кислоти у положенні 322; аспарагіну, серину, глутамінової кислоти або аспарагінової кислоти у положенні 326; лізину у положенні 330; глутаміну у положенні 334; глутамінової кислоти у положенні 334; метіоніну у положенні 334; гістидину у положенні 334; валіну у положенні 334; лейцину у положенні 334; глутаміну у положенні 335; лізину у положенні 335; або треоніну у положенні 339.

Винахід також охоплює антитіла, що специфічно зв'язуються з B7-H3, які включають варіантну Fc ділянку, де варіантна Fc ділянка включає модифікацію у порівнянні із Fc ділянкою дикого типу, де варіантна Fc ділянка не має заміни або не є єдиною заміною в одному або більше з наступних положень 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 320, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 або 439 та не має гістидину, глутаміну або тирозину у положенні 280; серину, гліцину, треоніну або тирозину у положенні 290, аспарагіну у положенні 294, лізину у положенні 295; проліну у положенні 296; проліну, аспарагіну, аспарагінової кислоти або валіну у положенні 298; або лейцину або ізoleyцину у положенні 300. В іншому втіленні винахід охоплює такі антитіла, що включають варіантну Fc ділянку, де варіантна Fc ділянка включає принаймні одну амінокислотну модифікацію у порівнянні із Fc ділянкою дикого типу, так, що молекула зв'язує FcγR зі зниженою афінністю у порівнянні із молекулою, що включає Fc ділянку дикого типу, за умови, що варіантна Fc ділянка не має заміни або не є єдиною заміною в одному або більше з наступних положень 243, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 або 439. Ще в одному втіленні винахід охоплює такі антитіла, що включають варіантну Fc ділянку, де варіантна Fc ділянка включає принаймні одну амінокислотну модифікацію у порівнянні із Fc ділянкою дикого типу, так, що молекула зв'язує FcγR з підвищеною афінністю у порівнянні із молекулою, що включає Fc ділянку дикого типу, за умови, що варіантна Fc ділянка не має заміни або не є єдиною заміною в одному або більше з наступних положень 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, або 430.

Винахід також охоплює антитіла, що специфічно зв'язуються з B7-H3, які включають варіантну Fc ділянку, де варіантна Fc ділянка не має заміни або не є єдиною заміною в одному або більше з наступних положень 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269 або 328,

та не має лейцину у положенні 243, аспарагіну у положенні 298, лейцину у положенні 241 та ізолейцину або аланіну у положенні 240, гістидину у положенні 244, валіну у положенні 330 або ізолейцину у положенні 328.

Винахід, зокрема, охоплює антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H3 та які включають варіантну Fc ділянку з підвищеною ефекторною функцією та/або зі зміненими афінностями для активації та/або інгібування рецепторів, де варіантна Fc ділянка включає: (а) будь-яку з 1, 2, 3, 4, 5 або 6 наступних замінів: S239D, S298A, A330L, I332E, E333A або K334A; або (b) будь-яку з комбінацій замінів: (1) S298A, E333A, та K334A; (2) S239D та I332E; або (3) S239D, A330L та I332E.

Винахід зокрема, охоплює антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H3 та які включають варіантну Fc ділянку з підвищеною ефекторною функцією та/або зі зміненими афінностями для активації та/або інгібування рецепторів, де варіантна Fc ділянка включає заміну:

(1) у положенні 288 аспарагіном, у положенні 330 серином та у положенні 396 лейцином;

(2) у положенні 334 глутаміновою кислотою, у положенні 359 аспарагіном та у положенні 366 серином;

(3) у положенні 316 аспарагіновою кислотою, у положенні 378 валіном, та у положенні 399 глутаміновою кислотою;

(4) у положенні 247 лейцином, та заміну у положенні 421 лізином;

(5) у положенні 392 треоніном, та у положенні 396 лейцином;

(6) у положенні 221 глутаміновою кислотою, у положенні 270 глутаміновою кислотою, у положенні 308 аланіном, у положенні 311 гістидином, у положенні 396 лейцином, та у положенні 402 аспарагіновою кислотою;

(7) у положенні 419 гістидином, та заміну у положенні 396 лейцином;

(8) у положенні 240 аланіном, та у положенні 396 лейцином;

(9) у положенні 410 гістидином, та у положенні 396 лейцином;

(10) у положенні 243 лейцином, у положенні 305 ізолейцином, у положенні 378 аспарагіновою кислотою, у положенні 404 серином, та у положенні 396 лейцином;

(11) у положенні 255 ізолейцином, та у положенні 396 лейцином;

(12) у положенні 370 глутаміновою кислотою та у положенні 396 лейцином;

(13) у положенні 270 глутаміновою кислотою;

або

(14) будь-яку комбінацію приведених вище замінів (1)-(12).

У специфічному втіленні винахід охоплює антитіло, яке специфічно зв'язує B7-H3, що включає варіантну Fc ділянку, яка містить заміну: F243L, R292P та Y300L. В додатковому специфічному втіленні винахід охоплює антитіло, яке специфічно зв'язує B7-H3, що включає варіантну Fc ділянку, яка включає заміну: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L. Ще в одному додатковому втіленні винахід охоплює антитіло, що специфічно зв'язує B7-H3, що включає варіантну Fc ділянку, яка включає заміну F243L, R292P, Y300L, V305I та P396L.

У додатковому специфічному втіленні винахід охоплює антитіло, яке специфічно зв'язує B7-H3, що включає варіантну Fc ділянку, яка включає заміну у положенні 396 лейцином, у положенні 270 глутаміновою кислотою та у положенні 243 лейцином. В іншому специфічному втіленні молекула додатково включає одну або більше амінокислотних модифікацій таких, як ті, що розкриті в даній заявці.

Винахід зокрема, охоплює антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H3, що включають варіантну Fc ділянку з підвищеною ефекторною функцією та/або зміненими афінностями для активації та/або інгібування рецепторів, що мають амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: 119, 125, 132, 133, 141, 142, 147, 149, 162, 166, 185, 192, 202, 205, 210, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 229, 231, 232, 233, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 258, 261, 262, 263, 268, 269, 270, 272, 274, 275, 276, 279, 280, 281, 282, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 295, 298, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 323, 326, 327, 328, 330, 333, 334, 335, 337, 339, 340, 343, 344, 345, 347, 348, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 404, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 431, 433, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 446 або 447. Бажано, коли такі мутації приводять до одержання молекул, які мають опосередковану ефекторними клітинами функцію та, необов'язково, мають змінену афінність для Fc γ R, як визначається при використанні способів, розкритих та представлених у даній заявці та які є відомими спеціалістові у даній галузі техніки.

Винахід, зокрема, охоплює антитіла, які специфічно зв'язуються з B7-H3, що включають

варіантну Fc ділянку зі зміненою ефекторною функцією та/або зміненими афінностями для активації та/або інгібування рецепторів, що мають:

(I) амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 або 330, та більш бажано одну або більше з наступних модифікацій: V240A, V240I, F241L, F243L, P244H, S298N, L328I, A330V; де такі антитіла демонструють змінену ефекторну функцію у порівнянні із антитілами, які мають Fc ділянку дикого типу, що не містить такої модифікації;

(II) амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 або 439, та більш бажано одну або більше з наступних модифікацій: D280H, D280Q, D280Y, K290G, K290S, K290T, K290Y, E294N, Q295K, Y296P, S298D, S298N, S298P, S298V, Y300I, Y300L; де такі антитіла демонструють змінену ефекторну функцію у порівнянні із антитілами, які мають Fc ділянку дикого типу, що не містить такої модифікації;

(III) амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439, та більш бажано одну або більше з наступних модифікацій: T256A, H268N, E272Q, N286D, N286Q, N286S, K290A, K290S, S298A, R301M, D312A, K320E, K320M, K320Q, K320R, K322E, K326A, K326D, K326E, K326N, K326S, A330K, A339T, E333A, K334A, K334E, K334H, K334L, K334M, K334Q, K334V, T335K, T335Q, T359A, K360A, E430A; де такі антитіла демонструють змінену ефекторну функцію у порівнянні із антитілами, які мають Fc ділянку дикого типу, що не містить такої модифікації;

(IV) амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 або 439; де такі антитіла демонструють знижену ефекторну функцію у порівнянні із антитілами, які мають Fc ділянку дикого типу, що не містить такої модифікації;

(V) амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, або 430; де такі антитіла демонструють підвищену ефекторну функцію у порівнянні із антитілами, які мають Fc ділянку дикого типу, що не містить такої модифікації;

або

(VI) амінокислотну модифікацію в одному або більше з наступних положень: R255A, T256A, E258A, S267A, H268A, H268N, E272A, E272Q, N276A, D280A, E283A, H285A, N286A, N286D, N286Q, N286S, K290A, K290S, R301M, K320E, K320M, K320Q, K320R, K322E, K326A, K326D, K326E, K326S, A330K, P331A, T335Q, S337A, E430A; де такі антитіла демонструють підвищену ефекторну функцію у порівнянні із антитілами, які мають Fc ділянку дикого типу, що не містить такої модифікації.

В інших втіленнях винахід охоплює застосування будь-якого Fc варіанта, відомого у галузі техніки, такого, як ті, що є розкритими у Jefferis, B.J. *ma in.* (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fcγ₁R: Current Models," Immunol. Lett. 82: 57-65; Presta, L.G. *ma in.* (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30: 487-90; Idusogie, E.E. *ma in.* (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166: 2571-75; Shields, R.L. *ma in.* (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc γ₁RI, Fc γ₁RII, Fc γ₁RIII, And Fcγ₁Rn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc γ₁R," J. Biol. Chem. 276: 6591-6604; Idusogie, E.E. *ma in.* (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc," J. Immunol. 164: 4178-84; Reddy, M.P. *ma in.* (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164: 1925-1933; Xu, D. *ma in.* (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200: 16-26; Armour, K.L. *ma in.* (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcγ₁ Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29: 2613-24; Jefferis, R. *ma in.* (1996) "Modulation Of Fc(γ₁)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54: 101-04; Lund, J. *ma in.* (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc γ₁ Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157: 4963-4969; Hutchins *ma in.* (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A γ₁ 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92: 11980-84; Jefferis, R. *ma in.* (1995) "Recognition

- Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44: 111-17; Lund, J. *ma in.* (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors," FASEB J. 9: 115-19; Alegre, M.L. *ma in.* (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57: 1537-1543; Lund *ma in.* (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11," Mol. Immunol. 29: 53-59; Lund *ma in.* (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147: 2657-2662; Duncan, A.R. *ma in.* (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332: 563-564; патенти США №№ 5,624,821; 5,885,573; 6,194,551; 7,276,586 та 7,317,091; та публікації PCT WO 00/42072 та WO 99/58572.

Винахід охоплює молекули, що включають варіантні Fc ділянки, що складаються з, або такі, що включають будь-яку мутацію, приведену у таблиці, що представлена нижче (Таблиця 1).

Таблиця 1							
Типові Fc модифікації							
Заміни одного сайту							
S132I	F241W	D265N	D280Q	Y296T	D312A	L328I	K334E
A162V	F241Y	D265Q	D280Y	N297D	W313F	L328K	K334H
S219Y	F241Y	D265T	G281D	N297E	N315I	L328M	K334I

Таблиця 1
Типові Fc модифікації

K222N	F243D	D265V	G281K	N297I	E318K	L328N	K334L
H224L	F243H	D265Y	G281P	N297S	K320E	L328P	K334M
T225S	F243L	V266A	G281Y	S298A	K320M	L328Q	K334N
P228E	F243L	V266I	V282M	S298D	K320Q	L328R	K334Q
P228G	F243Q	V266M	E283A	S298N	K320R	L328S	K334V
P228K	F243R	V266T	V284E	S298N	K322E	L328T	T335K
P228Y	F243W	S267A	V284L	S298N	V323I	L328V	T335Q
P230A	F243Y	H268A	V284N	S298P	N325A	L328W	I336E
P230E	P244H	H268N	V284T	S298V	N325D	L328Y	I336K
P230G	P245A	D270E	V284Y	T299A	N325E	A330I	I336Y
P230Y	P247G	P271A	H285A	T299D	N325F	A330K	S337A
A231E	P247L	P271D	N286A	T299E	N325G	A330L	A339T
A231G	P247V	P271E	N286D	T299F	N325H	A330S	M352L
A231K	K248M	P271F	N286S	T299G	N325I	A330V	T359A
A231P	R255A	P271G	K288N	T299H	N325K	A330Y	T359N
A231Y	T256A	P271H	K290A	T299I	N325L	P331A	K360A
P232E	E258A	P271I	K290G	T299K	N325M	I332A	T366N
P232G	V262A	P271K	K290S	T299L	N325P	I332D	T366S
P232K	V262E	P271L	K290T	T299M	N325R	I332E	F372Y
P232Y	V262F	P271M	K290Y	T299N	N325S	I332F	F372Y
E233D	V262I	P271N	P291D	T299P	N325T	I332G	I377F
E233G	V262T	P271Q	P291E	T299Q	N325V	I332H	I377N
L234I	V263A	P271R	P291G	T299R	N325W	I332K	V379L
L235D	V263I	P271S	P291H	T299S	N325Y	I332L	V379M
S239D	V263M	P271T	P291I	T299V	K326A	I332M	K392R
S239E	V263T	P271V	P291Q	T299W	K326D	I332N	P396H
S239N	V264A	P271W	P291T	T299Y	K326E	I332P	P396L
S239Q	V264E	P271Y	R292G	Y300I	K326E	I332Q	L398V
V240A	V264F	E272A	R292L	Y300L	K326N	I332R	S400P
V240I	V264I	E272Q	E294N	R301M	K326S	I332S	D401V
V240M	V264R	V273I	Q295K	R301M	K326T	I332T	S407I
V240T	V264T	F275L	Y296D	V302I	L328A	I332V	K414N
F241E	V264W	F275W	Y296E	S304D	L328D	I332W	E430A
V241I	D265F	F275Y	Y296H	S304H	L328E	I332Y	
F241L	D265H	N276A	Y296N	S304L	L328F	E333A	
F241R	D265I	D280A	Y296P	S304N	L328G	K334A	
F241S	D265L	D280H	Y296Q	S304T	L328H	K334E	

Заміни двох сайтів

I332E, A330L	S239N / I332Q	V279L, P395S	P396L, P217S
I332E, L328D	S239Q / I332D	V284A, F372L	P396L, P227S
I332E, L328E	S239Q / I332E	K288N, K326N	P396L, V323I
I332E, L328H	S239Q / I332N	K288N, A330S	P396L, V240A
I332E, L328I	S239Q / I332Q	K290E, L142P	P396L, L242F
I332E, L328M	V240I, V281M	K290E, P227S	P396L, P244H
I332E, L328N	F241L, E258G	K290T, G371D	P396L, T250A
I332E, L328Q	F241L / V262I	P291S, P353Q	P396L, R255L
I332E, L328T	F243L, E318K	R292P, V305I	P396L, E258D
I332E, L328V	F243I, V379L	S298A / I332E	P396L, H268D
I332E, N297D	P243L / V264I	S298N, W381R	P396L, H268N
I332E, N297E	K246T, Y319F	S298N, S407R	P396L, V303I
I332E, N297S	K246T, P396H	K317N, F423-DEL	P396L, K326I

Таблиця 1			
Типові Fc модифікації			
S166N, K409R	P247H, G285E	K326E, K320E	P396L, V305L
P232S, S304G	P247L, I377F	K326E, A330T	P396L, L358P
S239D / I332D	P247L, E389G	K326E, G385E	P396L, K370E
S239D / I332E	P247S, P396L	A330V, Q419H	P396L, S375C
S239D / I332N	P247L, L398Q	K334E, E233D	P396L, V379M
S239D / I332Q	P247L, L406F	K334N, K246I	P396L, N384K
S239E / D265N	P247L, N421K	K334E, K288M	P396L, K392T
S239E / D265Q	L251F, F372L	K334E, R292L	P396L, S400F
S239E / I332D	L251F, S415I	K334E, E308D	P396L, L410H
S239E / I332E	R255L, E318K	K334E, E380D	P396L, Q419H
S239E / I332N	R255Q, K326E	K334N, P396L	P396L, Q419L
S239E / I332Q	E258D, N384K	A339V, Q347H	P396L, V427A
S239N / I332D	V263Q, E272D	K370N, S440N	D399E, G402D
S239N / I332E	V264I / I332E	T394M, V397M	D399E, M428L
S239N / I332N	H268D, E318D	P396L, K210M	
Заміни трьох сайтів			
V185M, R292L, D399E	P217S, A378V, S408R	K218R, G281D, G385R	
S192T, M252L, R301C	P247L, I253N, K334N	P247L, A330T, S440G	
V125L, V215I, S408I	D312E, K327N, I378S	T355N, P387S, H435Q	
R292L, T359N, P396L	E216D, E345K, S375I	P247L, A431V, S442F	
F275I, K334N, V348M	K288N, A330S, P396L	A378V, N390I, V422I	
F243L, R255L, E318K	G316D, A378V, D399E	V282E, V369I, L406F	
K334E, T359N, T366S	N315I, V379M, T394M	V397M, T411A, S415N	
K288N, A330S, P396L	P247L, W313R, E388G	T223I, T256S, L406F	
F243I, V379L, G420V	R301H, K340E, D399E	K246N, P396L, Q419R	
A231V, Q386H, V412M	K326I, P396L, S408N	P217A, T359A, P396L	
E216D, K334R, S375I	K210M, K261N, P396L	V215I, K290V, P396L	
T335N, P387S, H435Q	A330V, G427M, K438R	V263Q, E272D, Q419H	
K246I, Q362H, K370E	K222E, V263Q, S298N	N276Y, T393N, W417R	
K334E, E380D, G446V	E233G, P247S, L306P	D270E, G316D, R416G	
V303I, V369F, M428L	S219T, T225K, D270E	D270E, K392T, P396L	
K246E, V284M, V308A	R292P, F243L, V305I	R255L, D270E, P396L	
E293V, Q295E, A327T	V284M, R292L, K370N	V240A, D270E, P396L	
Y319F, P352L, P396L	D270E, K370E, P396L	270E, P396L, Q419HD	
K290T, N390I, P396L	P247L, D270E, N421K	S239D, A330L, I332E	
N297D, A330Y, I332E	Y296D, N297D, I332E	S239D, A330Y, I332E	
N297D, T299L, I332E	Y296E, N297D, I332E	S239D, I332E, A330I	
N297D, T299I, I332E	Y296H, N297D, I332E	S239D, N297D, I332E	
N297D, T299L, I332E	Y296N, N297D, I332E	S239D, S298A, I332E	
N297D, T299V, I332E	Y296Q, N297I, I332E	S239D, V264I, I332E	
F243L, V262I, V264W	Y296T, N297D, I332E	S239E, N297D, I332E	
D265F, N297E, I332E	P230A, E233D, I332E	S239E, V264I, I332E	
D265Y, N297D, I332E	P244H, P245A, P247V	S239N, A330L, I332E	
V264E, N297D, I332E	V264I, A330Y, I332E	S239N, A330Y, I332E	
V264I, A330L, I332E	V264I, S298A, I332E	S239Q, V264I, I332E	
Заміни чотирьох сайтів			
A141V, H268L, K288E, P291S	T256S, V305I, K334E, N390S		
E258D, T289A, H310Y, Y407V	D280E, S354F, A431D, L441I		
K334E, T359N, T366S, Q386R	P343S, P353L, S375I, S383N		
K326Q, K334E, T359N, T366S	E269K, K290N, Q311R, H433Y		
K288R, T307A, K344E, P396L	K290E, V369A, T393A, P396L		

Таблиця 1 Типові Fc модифікації	
V273I, K326E, L328I, P396L	K210N, K222I, K320M, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L	S219T, T225K, D270E, K360R
V282L, A330V, H433Y, T436R	P243L, S254T, A330V, N361D
R255L, D270E, Y300L, P396L	F243L, D270E, K392N, P396L
R255L, D270E, R292G, P396L	F243L, R255L, D270E, P396L
V284M, S298N, K334E, R355W	S239D, D265F, N297D, I332E
D265Y, N297D, T299L, I332E	S239D, D265H, N297D, I332E
F241E, F243D, V262T, V264F	S239D, D265I, N297D, I332E
F241E, F243R, V262E, V264R	S239D, D265L, N297D, I332E
F241E, F243Y, V262T, V264R	S239D, D265T, N297D, I332E
F241L, F243L, V262I, V264I	S239D, D265V, N297D, I332E
F241R, F243D, V262T, V264R	S239D, D265Y, N297D, I332E
F241W, F243W, V262A, V264A	S239D, N297D, I332E, A330Y
F241Y, F243Y, V262T, V264T	S239D, N297D, I332E, K326E
N297D, I332E, S239D, A330L	S239D, N297D, I332E, L235D
N297D, S298A, A330Y, I332E	S239D, V264I, A330L, I332E
S239D, A330Y, I332E, K326E	S239D, V264I, S298A, I332E
S239D, A330Y, I332E, K326T	S239E, V264I, A330Y, I332E
S239D, A330Y, I332E, L234I	S239D, A330Y, I332E, V264T
S239D, A330Y, I332E, L235D	S239D, A330Y, I332E, V266I
S239D, A330Y, I332E, V240I	
Заміни п'яти сайтів	
V284M, S298N, K334E, R355W, R416T	K147T, Y202M, F275I, K334N, V348M
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	T335N, K370E, A378V, T394M, S424L
F243L, V305I, A378D, P396L, F404S	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M	P244A, K326I, C367R, S375I, K447T
L235P, S304G, V305I, V323I, V382M	C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V
F241E, F243D, V262T, V264E, I332E	F241R, F243Q, V262T, V264R, I332E
F241E, F243R, V262E, V264R, I332E	S239E, V264I, S298A, A330Y, I332E
F241E, F243Y, V262T, V264R, I332E	
Заміни більше, ніж п'яти сайтів	
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L	
F241Y, F243Y, V262T, V264T, N297D, I332E	
N297D, T299F, I332E, N297D, T299H, I332E	
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L	
S239D, N297D, I332E, A330Y, F241S, F243H, V262T, V264T	
K133M, F149Y, K205E, R214I, K218E, S383N, N384K, T256N, V262L	

У специфічних втіленнях варіантна Fc ділянка таких анти-B7-H3 антитіл має:

- 5 (1) лейцин у положенні 247, лізин у положенні 421 та глутамінову кислоту у положенні 270;
- (2) треонін у положенні 392, лейцин у положенні 396, глутамінову кислоту у положенні 270 та лейцин у положенні 243
- (3) гістидин у положенні 419, лейцин у положенні 396 та глутамінову кислоту у положенні 270;
- 10 (4) гістидин у положенні 419, лейцин у положенні 396, глутамінову кислоту у положенні 270 та лейцин у положенні 243;
- (5) аланін у положенні 240, лейцин у положенні 396 та глутамінову кислоту у положенні 270;
- (6) лізин у положенні 255 та лейцину у положенні 396;
- (7) лізин у положенні 255, лейцин у положенні 396 та глутамінову кислоту у положенні 270;
- (8) лізин у положенні 255, лейцин у положенні 396, глутамінову кислоту у положенні 270 та
- 15 лізин у положенні 300;
- (9) лізин у положенні 255, лейцин у положенні 396, глутамінову кислоту у положенні 270 та гліцин у положенні 292;
- (10) лізин у положенні 255, лейцин у положенні 396, глутамінову кислоту у положенні 270 та лейцин у положенні 243;

(11) глутамінова кислота у положенні 370, лейцин у положенні 396 та глутамінову кислоту у положенні 270;

(12) глутамінова кислота у положенні 270, аспарагінову кислоту у положенні 316 та гліцин у положенні 416;

5 (13) лейцин у положенні 243, пролін у положенні 292, ізолейцин у положенні 305 та лейцин у положенні 396;

(14) лейцин у положенні 243, глутамінову кислоту у положенні 270, аспарагін у положенні 392 та лейцин у положенні 396;

10 (15) лейцину у положенні 243, лейцин у положенні 255, глутамінову кислоту у положенні 270 та лейцин у положенні 396;

(16) глутамін у положенні 297;

або

(17) будь-яку комбінацію вказаних вище замінів (1)-(16).

У деяких втіленнях молекули згідно з винаходом додатково включають один або більше сайтів глікозилювання, так, що один або більше вуглеводневих залишків є ковалентно приєднаними до цих молекул. Бажаним є, коли молекули згідно з винаходом з одним або більше сайтами глікозилювання та/або однією або більше модифікаціями у Fc ділянці надають або мають поліпшену опосередковану антитілом ефекторну функцію, наприклад, підвищену ADCC активність у порівнянні з вихідним антитілом. У деяких втіленнях винахід додатково включає молекули, що мають одну або більше модифікацій амінокислот, що є безпосередньо або опосередковано відомими як такі, що взаємодіють з вуглеводневим залишком антитіла, включаючи, але без обмеження, амінокислоти у положеннях 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 та 301. Амінокислоти, які можуть безпосередньо або опосередковано взаємодіяти із залишком вуглеводу антитіла, є відомими у галузі техніки, див., наприклад, Jefferis *та ін.*, 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7, що є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

В іншому втіленні винахід охоплює молекули, що були модифіковані шляхом введення одного або більше сайтів глікозилювання в один або більше сайтів молекул, бажано без зміни функціональностей молекули, наприклад, зв'язувальної активності стосовно цільового антигену або Fc γ R. Сайти глікозилювання можуть бути введені у варіабельні та/або константні ділянки молекул згідно з винаходом. Як використовується в даній заявці, "сайти глікозилювання" включають будь-яку специфічну амінокислотну послідовність в антитілі, до якої олігосахарид (тобто, вуглеводи, що містять два або більше прості сахари, є з'єднаними разом) буде специфічно та ковалентно приєднуватися. Бічні ланцюги олігосахариду є типово сполученими зі скелетом антитіла за допомогою або N- або O-зв'язків. N-зв'язане глікозилювання відноситься до приєднання олігосахаридного залишку до бічного ланцюга залишку аспарагіну. O-зв'язане глікозилювання відноситься до приєднання олігосахаридного залишку до гідроксіамінокислоти, наприклад, серину, треоніну. Молекули згідно з винаходом можуть включати один або більше сайтів глікозилювання, включаючи N-зв'язані та O-зв'язані сайти глікозилювання. Будь-який сайт глікозилювання для N-зв'язаного або O-зв'язаного глікозилювання, що є відомим у галузі техніки, може використовуватися у відповідності із даним винаходом. Типовий N-зв'язаний сайт глікозилювання, що є корисним у відповідності із способами згідно з даним винаходом, являє собою амінокислотну послідовність: Asn-X-Thr/Ser, де X може являти собою будь-яку амінокислоту, та Thr/Ser позначає треонін або серин. Такий сайт або сайти можуть вводитися у молекулу згідно з винаходом при використанні способів, які є відомими у галузі техніки, до якої відноситься даний винахід див., наприклад, *In vitro* Mutagenesis, Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, *та ін.* W.H. Freeman та Company, New York, 1983, глава 8, стор. 106-116, що є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності. Типовий спосіб для введення сайту глікозилювання у молекулу згідно з винаходом може включати: модифікацію або мутацію амінокислотної послідовності молекули, так, що одержують бажану послідовність Asn-X-Thr/Ser.

У деяких втіленнях винахід охоплює способи модифікації вмісту вуглеводів молекули згідно з винаходом шляхом додання або видалення сайтів глікозилювання. Способи модифікації вмісту вуглеводів антитіла є добре відомими у галузі техніки та входять в об'єм винаходу, див., наприклад, патент США № 6,218,149; EP 0 359 096 B1; публікація США № 2002/0028486; WO 03/035835; публікація США № 2003/0115614; патент США № 6,218,149; патент США № 6,472,511; які усі є введеними у дану заявку як посилання у своїй цілісності. В інших втіленнях винахід охоплює способи модифікації вмісту вуглеводів молекули згідно з винаходом шляхом видалення одного або більше ендогенних залишків вуглеводів молекули. У специфічному втіленні винахід охоплює зсув сайту глікозилювання Fc ділянки антитіла шляхом модифікації положень, що є сусідніми до 297. У специфічному втіленні винахід охоплює модифікацію

положення 296 так, що положення 296, а не положення 297, є глікозильованим.

Ефекторна функція також може піддаватися модифікації за допомогою методик, таких, як шляхом введення одного або більше залишків цистеїну у Fc ділянку, що сприяє утворенню дисульфідного зв'язку між ланцюгами у цій ділянці і приводить до одержання гомодимерного антитіла, яке може мати поліпшену здатність до інтерналізації та/або підвищену опосередковану компліментом загибель клітин та ADCC (Caron, P.C. *ma in.* (1992) "*Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies*," J. Exp. Med. 176: 1191-1195; Shopes, B. (1992) "*A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity*," J. Immunol. 148(9): 2918-2922. Гомодимерні антитіла з підвищеною протипухлинною активністю можуть також бути одержані при використанні гетеробіфункціональних перехресних лінкерів так, як описано у Wolff, E.A. *ma in.* (1993) "*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice*," Cancer Research 53: 2560-2565. Альтернативно, може бути сконструйоване антитіло, яке має подвійну Fc ділянку, та може, таким чином, мати поліпшену здатність до залежного від компліменту лізису та ADCC (Stevenson, G.T. *ma in.* (1989) "*A Humeric Antibody With Dual Fc Region (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge*," Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230).

Е. B7-H3 DART™ (перенацілювальні реагенти з подвійною афінністю)

Як обговорювалося вище, даний винахід додатково охоплює молекули "DART™" (перенацілювальний реагент з подвійною афінністю), що включають принаймні два поліпептидні ланцюги, які утворюють принаймні два епітопзв'язувальні сайти, принаймні один з яких специфічно зв'язується з B7-H3.

У бажаних втіленнях перший поліпептидний ланцюг DART™ включає:

(i) домен (A), що включає зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного для епітопу (1);

(ii) домен (B), що включає зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного для епітопу (2); та

(iii) домен (C).

Другий поліпептидний ланцюг такого DART™ включає:

(i) домен (D), що включає зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), специфічного для епітопу (2);

(ii) домен (E), що включає зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), специфічного для епітопу (1); та

(iii) домен (F).

DART™ домени (A) та (B) не асоціюються один з одним з утворенням епітопзв'язувального сайту. Подібно до цього, DART™ домени (D) та (E) не асоціюються один з одним з утворенням епітопзв'язувального сайту. Натомість, DART™ домени (A) та (E) асоціюються з утворенням зв'язувального сайту, що зв'язує епітоп (1); вказані DART™ домени (B) та (D) асоціюються з утворенням зв'язувального сайту, що зв'язує вказаний епітоп (2). Домени (C) та (F) ковалентно асоціюються разом.

Кожний поліпептидний ланцюг DART™ молекули включає VL домен та VH домени, які є ковалентно зв'язаними так, що домени є обмеженими щодо самозборки. Взаємодія двох поліпептидних ланцюгів буде забезпечувати VL-VH парування, утворюючи два епітопзв'язувальні сайти, тобто, бівалентні молекули. Ні VH домен, ні VL домен не є обмеженим будь-яким положенням у межах поліпептидного ланцюга, тобто, обмеженим аміно- (N) або карбокси- (C) термінальним кінцем, жоден з доменів не є обмеженим стосовно їх взаємного розміщення один стосовно іншого, тобто, VL домен може бути N-термінальним стосовно VH домену та навпаки. Єдине обмеження полягає у тому, щоб був доступним комплементарний поліпептидний ланцюг для того, щоб сформувати функціональні DART™. Коли VL та VH домени мають походження від того самого антитіла, два комплементарні поліпептидні ланцюги можуть бути ідентичними. Наприклад, коли зв'язувальні домени походять від антитіла, специфічного для епітопу A (тобто, зв'язувальний домен утворюється в результаті взаємодії VL_A-VH_A), при цьому кожен поліпептид буде включати VH_A та VL_A. Гомодимеризація двох поліпептидних ланцюгів антитіла буде приводити до утворення двох VL_A-VH_A сайтів зв'язування, що, у свою чергу, приводить до утворення бівалентного моноспецифічного антитіла. Якщо VL та VH домени мають походження від антитіл, специфічних для різних антигенів, утворення функціонально біспецифічного DART™ потребує взаємодії двох різних поліпептидних ланцюгів, тобто, утворення гетеродимера. Наприклад, для біспецифічного DART™ один поліпептидний ланцюг буде включати VL_A та VL_B; гомодимеризація вказаного ланцюга буде приводити до утворення двох VL_A-VH_B сайтів зв'язування, або до відсутності зв'язування або нездатного до прогнозування зв'язування. На противагу до цього, коли два відмінні поліпептидні ланцюги

можуть вільно взаємодіяти, наприклад, у рекомбінантній експресійній системі, один, що включає VL_A та VH_B , та інший, що включає VL_B та VH_A , будуть утворювати два різні сайти зв'язування: VL_A-VH_A та VL_B-VH_B . Для усіх DART™ пар поліпептидних ланцюгів, можливість неспівпадання або неправильного зв'язування двох ланцюгів є можливою, тобто, взаємодія VL-VL або VH-VH доменів; проте очищення функціональних діатіл легко досягається на основі імуноспецифічності правильно димеризованого сайту зв'язування при використанні будь-якого із способів, що базуються на афінності, які є відомими у галузі техніки або є представленими у даній заявці, наприклад, методу афінної хроматографії

Один або більше поліпептидних ланцюгів DART™ можуть необов'язково включати Fc домен або його частину (наприклад, CH2 домен або CH3 домен). Fc домен або його частина можуть мати походження від будь-якого ізотипу або алотипу імунoglobулін, включаючи, але без обмеження такими, IgA, IgD, IgG, IgE та IgM. У бажаних втіленнях Fc домен (або його частина) мають походження від IgG. У специфічних втіленнях IgG ізотип являє собою IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 або його алотип. В одному втіленні молекули діатіла включають Fc домен, де цей Fc домен включає CH2 домен та CH3 домен, які є незалежно вибраними з будь-якого ізотипу імунoglobуліну (тобто, Fc домен, що включає CH2 домен, походить від IgG, а CH3 домен походить від IgE, або CH2 домен походить від IgG1, а CH3 домен походить від IgG2, тощо). Fc домен може бути введений у поліпептидний ланцюг, що включає молекулу діатіла згідно з винаходом у будь-якому положенні стосовно інших доменів або частин вказаного поліпептидного ланцюга (наприклад, Fc домен або його частина можуть розміщуватися С-термінально по відношенню до обох VL та VH доменів поліпептидного ланцюга; можуть бути N-термінальними по відношенню до обох VL та VH доменів; або можуть бути N-термінальними по відношенню до одного домену та С-термінальними по відношенню до іншого (тобто знаходитися між двома доменами поліпептидного ланцюга)).

Fc домени у поліпептидних ланцюгах DART™ молекули переважно димеризуються, що приводить до утворення DART™ молекул, які демонструють властивості, подібні до таких імунoglobуліну, наприклад, Fc-FcγR, взаємодії. Діатіла що включають Fc, можуть бути димерами, наприклад, включають два поліпептидні ланцюги, кожний з яких включає VH домен, VL домен та Fc домен. Димеризація вказаних поліпептидних ланцюгів приводить до утворення бівалентних DART™, що включають Fc домен, хоча і зі структурою, що відрізняється від такої для немодифікованого бівалентного антитіла. Такі молекули DART™ будуть демонструвати змінені фенотипи у порівнянні з імунoglobуліном дикого типу, наприклад, змінений період напіврозпаду у сироватці, зв'язувальні властивості, тощо В інших втіленнях DART™ молекули, що включають Fc домени, можуть являти собою тетрамери. Такі тетрамери включають два 'більш важкі' поліпептидні ланцюги, тобто, поліпептидні ланцюги, що включають VL, VH та Fc домени, та два 'більш легкі' поліпептидні ланцюги, тобто, поліпептидні ланцюги, що включають VL та VH. Більш легкі та більш важкі ланцюги взаємодіють з утворенням мономера, та вказані мономери взаємодіють за допомогою своїх непарних Fc доменів з утворенням Ig-подібних молекул. Такий Ig-подібний DART™ є тетравалентним та може бути моноспецифічним, біспецифічним або тетраспецифічним.

Утворення молекули тетраспецифічного антитіла, як описується вище, вимагає взаємодії чотирьох різних поліпептидних ланцюгів. Такі взаємодії є складними для досягнення ефективності у межах одноклітинної рекомбінантної продукційної системи з причини наявності багатьох варіантів потенційного неправильного спарювання. Один із шляхів вирішення для підвищення ймовірності неправильного спарювання полягає у конструюванні мутацій типу "виступ-у-западинку" у бажаних парах поліпептидних ланцюгів. Такі мутації сприяють гетеродимеризації, а не гомодимеризації. Наприклад, що стосується взаємодій Fc-Fc, то амінокислотна заміна (бажано, заміна амінокислотами, що включають велику бічну групу, яка утворює 'виступ', наприклад, триптофан) може вбудовуватися у CH2 або CH3 домен, так, що стерична взаємодія буде запобігати взаємодії між доменом, мутованим подібним чином, та буде змушувати мутований домен паруватися з доменом, до якого він є комплементарним, або може конструюватися пристосовувальна мутація, тобто 'западинка' (наприклад, здійснюють заміну при використанні гліцину). Такий набір мутацій може бути введений у будь-яку пару поліпептидів, що включають молекули діатіла, та, крім того, може бути введений у будь-яку частину поліпептидних ланцюгів вказаної пари. Способи конструювання білка для сприяння гомодимеризації, а не гомодимеризації, є добре відомими у галузі техніки, зокрема, стосовно сконструйованих молекул, подібних до імунoglobуліну, та охоплюються даною заявкою (див., наприклад, Ridgway *ma in.* (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9: 617-621, Atwell *ma in.* (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display

Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, та Xie *ma in.* (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296: 95-101; кожна з яких є введеною у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

Винахід також охоплює молекули діатала, що включають варіант Fc або варіант шарнір-Fc домен (або його частина), де варіантний Fc домен включає принаймні одну амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну, вставку, делецію) по відношенню до порівнюваного Fc домену дикого типу або шарнір-Fc домену (або його частини). Молекули, що включають варіантні Fc домени або шарнір-Fc домени (або їх частину) (наприклад, антитіла), зазвичай мають змінені фенотипи по відношенню до молекул, що включають Fc домени дикого типу або шарнір-Fc домени або їх частини. Варіантні фенотипи можуть виражатися як змінений період напіврозпаду у сироватці, зміна стабільності, зміна чутливості до клітинних ферментів або змінені ефекторні функції, які піддається аналізу у залежному від NK або макрофагів аналізі. Модифікації Fc домену, ідентифіковані як зміна ефекторної функції, описуються вище.

Даний винахід також охоплює молекули, що включають шарнірний домен. Шарнірний домен може бути отриманий з будь-якого ізотипу або алотипу імуноглобуліну, включаючи IgA, IgD, IgG, IgE та IgM. У бажаних втіленнях шарнірний домен походить від IgG, де IgG ізотипи являють собою IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4, або їх алотипи. Вказаний шарнірний домен може бути сконструйований у поліпептидний ланцюг, що включає молекулу діатіла разом з Fc доменом, так, що молекула діатіла включає шарнір-Fc домен. У деяких варіантах шарнірна ділянка та Fc домен є незалежно вибраними з будь-якого ізотипу імуноглобуліну, що є відомими в даній галузі, або є приведеним у даній заявці. В інших варіантах шарнірна ділянка та Fc домен розділяються принаймні одним доменом поліпептидного ланцюга, наприклад, VL доменом. Шарнірний домен або необов'язково шарнір-Fc домен, можуть бути введені у поліпептид згідно з винаходи в будь-якому положенні по відношенню до інших доменів або частини вказаного поліпептидного ланцюга. У деяких варіантах поліпептидний ланцюг згідно з винаходи включає шарнірний домен, де шарнірний домен знаходиться на С-кінці ланцюга поліпептиду, де зазначений поліпептидний ланцюг не включає Fc домену. В інших варіантах поліпептидний ланцюг згідно з винаходом включає шарнірну ділянку - Fc домен, де шарнірна ділянка - Fc домен знаходиться на С-кінці поліпептидного ланцюга. В інших варіантах поліпептидний ланцюг згідно з винаходом включає шарнірну ділянку - Fc домен, де шарнірна ділянка - Fc домен знаходиться на N-кінці поліпептидного ланцюга.

Кожний домен поліпептидного ланцюга DART™, тобто VL, VH та Fc домен можуть бути розділені за допомогою пептидного лінкера. Пептидний лінкер може мати довжину 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 амінокислот. У деяких втіленнях амінокислотна послідовність лінкера являє собою GGSGGGG (SEQ ID NO:52), що кодується послідовністю нуклеїнової кислоти ggagggcgat ccggagggcg aggс (SEQ ID NO:53). Поліпептидні ланцюги DART™ молекул можуть бути сконструйовані для включення принаймні одного залишку цистеїну, який буде взаємодіяти із залишком цистеїну другого поліпептидного ланцюга DART™ з утворення дисульфідного зв'язку між ланцюгами. Такі міжланцюгові дисульфідні взаємодії служать для стабілізації молекул DART™, поліпшуючи таким чином експресію та виділення з рекомбінантних систем, що приводить до стабільної та послідовної композиції та поліпшує стабільність ізолюваного та/або очищеного продукту *in vivo*. Цистеїновий залишок може вводитися як одинична амінокислота або як частина більш великої амінокислотної послідовності, наприклад, шарнірного домену, у будь-яку частину поліпептидного ланцюга. У специфічному втіленні залишок цистеїну може бути введений на С-термінальному кінці поліпептидного ланцюга. У деяких втіленнях залишок цистеїну вводять у поліпептидний ланцюг у межах амінокислотної послідовності LGGC. У специфічному втіленні С-термінальний кінець поліпептидних ланцюгів, що входить до складу DART™ молекули згідно з винаходом, включає амінокислотну послідовність LGGC (SEQ ID NO:54). В іншому втіленні залишок цистеїну вводять у поліпептид у межах амінокислотної послідовності, що включає шарнірний домен, наприклад, EPKSCDKTHTCPP (SEQ ID NO:55) або ESKYGPPCPS (SEQ ID NO:56). У специфічному втіленні С-термінальний кінець поліпептидного ланцюга DART™ молекули згідно з винаходом включає амінокислотну послідовність IgG шарнірного домену, наприклад, SEQ ID NO:55 або SEQ ID NO:56. В іншому втіленні С-термінальний кінець поліпептидного ланцюга DART™ молекули згідно з винаходом включає амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO:57), яка може кодуватися нуклеотидною послідовністю gttgagccsa aatcttgt (SEQ ID NO:58). В інших втіленнях залишок цистеїну вводять у поліпептидний ланцюг у межах амінокислотної послідовності LGGCFNRGEC (SEQ ID NO:59), яка може кодуватися нуклеотидною послідовністю ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt (SEQ ID NO:60). У специфічному втіленні С-термінальний кінець поліпептидного ланцюга, що входить до складу DART™ згідно з винаходом, включає амінокислотну послідовність LGGCFNRGEC (SEQ

ID NO:59). Ще в інших втіленнях залишок цистеїну вводять у поліпептидний ланцюг у межах амінокислотної послідовності FNRGEC (SEQ ID NO:61), яка може кодуватися нуклеотидною послідовністю tcaacaggg gagagtgt (SEQ ID NO:62). У специфічному втіленні С-термінальний кінець поліпептидного ланцюга, що входить до складу DART™ згідно з винаходом, включає

5 амінокислотну послідовність FNRGEC (SEQ ID NO:61).

У деяких втіленнях молекула діатіла включає принаймні два поліпептидні ланцюги, кожний з яких включає амінокислотну послідовність LGGC (SEQ ID NO:54) та які є ковалентно зв'язаними за допомогою дисульфідного зв'язку між залишками цистеїну у послідовності LGGC (SEQ ID NO:54). В іншому специфічному втіленні молекула діатіла включає принаймні два поліпептидні ланцюги, один з яких включає послідовність FNRGEC (SEQ ID NO:61), у той час, як інший включає шарнірний домен (що містить принаймні один залишок цистеїну), де вказані принаймні два поліпептидні ланцюги є ковалентно зв'язаними дисульфідним зв'язком між залишком цистеїну в FNRGEC (SEQ ID NO:61) та залишком цистеїну в шарнірному домені. В конкретних аспектах залишок цистеїну, який відповідає за дисульфідний зв'язок та розміщений у шарнірному домені, являє собою Cys-128 (у відповідності із нумерацією Kabat EU; розміщений у шарнірному домені немодифікованого інтактного важкого ланцюга IgG), а відповідний залишок цистеїну у послідовності SEQ ID NO:23 являє собою Cys-214 (у відповідності із нумерацією Kabat EU; розміщений на С-термінальному кінці немодифікованого інтактного легкого ланцюга IgG) (Elkabetz *ma in.* (2005) "Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains," J. Biol. Chem. 280: 14402-14412). Ще в інших втіленнях принаймні один залишок цистеїну вводять в N-термінальний кінець амінокислотного ланцюга. Ще в інших втіленнях принаймні один залишок цистеїну вводять у лінкерну частину поліпептидного ланцюга молекули діатіла. У додаткових втіленнях VH або VL домени конструюють для включення принаймні однієї амінокислотної модифікації у порівнянні із вихідним VH або VL доменом, так, що вказана амінокислотна модифікація включає заміну вихідної амінокислоти на цистеїн.

Ще в одному аспекті цього втілення домен (C) першого поліпептидного ланцюга включає амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO:57), що походить від шарнірного домену людського IgG, та яка може кодуватися нуклеотидною послідовністю gttgagccca aatcttgt (SEQ ID NO:58). В іншому аспекті цього втілення домен (F) другого поліпептидного ланцюга включає амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO:57). В деяких аспектах цього втілення домен (C) першого поліпептидного ланцюга включає 6 С-термінальних амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO:61); та домен (F) другого поліпептидного ланцюга включає амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO:57) або шарнірний домен. В інших аспектах цього втілення домен (F) другого поліпептидного ланцюга включає 6 С-термінальних амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO:61); та домен (C) першого поліпептидного ланцюга включає амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO:57) або шарнірний домен.

Як можна оцінити, виходячи із зазначено вище, індивідуальні поліпептиди біспецифічного DART™ можуть утворювати два види гомодимерів та один вид гетеродимера. В одному втіленні згідно з даним винаходом заряджені поліпептиди можуть додаватися до С-термінального кінця одного або більше, або більш бажано, обох DART™ поліпептидів. Шляхом відбору заряджених поліпептидів протилежного заряду для індивідуальних поліпептидів біспецифічних DART™ включення таких заряджених поліпептидів сприяє утворенню гетеродимерів та знижує утворення гомодимерів. Є бажаним, коли позитивно заряджений поліпептид буде мати суттєвий вміст аргініну, глутаміну, гістидину та/або лізину (або сумішей таких амінокислот), а негативно заряджені поліпептиди будуть мати суттєвий вміст аспартату та глутамату (або сумішей таких амінокислот). Позитивно заряджені поліпептиди, що мають суттєвий вміст лізину, та негативно заряджені поліпептиди, що мають суттєвий вміст глутамату, є особливо бажаними. Для того щоб максимізувати електростатичне притягування між такими протилежно зарядженими поліпептидами, є бажаним використовувати поліпептиди, які є здатними до спонтанного набуття спіральної конформації.

Таким чином, у бажаному втіленні позитивно заряджена "Е-спіраль" буде приєднуватися до одного із поліпептидів, що використовуються для утворення біспецифічних DART™, а негативно заряджена "К-спіраль" буде приєднуватися до другого з DART™ поліпептидів. Особливо бажана Е-спіраль буде мати послідовність: (EVAALEK)₄ [тобто, (SEQ ID NO:63) EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]. Особливо бажана К-спіраль буде мати послідовність: (KVAALKE)₄ [тобто (SEQ ID NO:64) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE].

Бажаний DART™ поліпептид, який має таку Е-спіраль, буде мати загальну послідовність: [VL домен]—[GGGSGGGG]—[VH домен]—[(EVAALEK)₄—GGGNS, де VL являє собою варіабельний легкий Ig домен DART™ послідовності GGGSGGGG, що представлена у SEQ ID

NO:52, VH являє собою варіабельний легкий Ig домен DART™ послідовності (EVAALEK)₄, що представлена SEQ ID NO:63, та послідовності GGGNS, що представлена SEQ ID NO:65. Бажаний DART™ поліпептид, який має К-спіраль, буде мати загальну послідовність: [VL домен]—[GGGSGGGG]—[VH домен]—[(KVAALKE)₄]—GGGNS, де VL являє собою варіабельний легкий Ig домен DART™ послідовності GGGSGGGG, що представлена SEQ ID NO:52, а VH являє собою варіабельний легкий Ig домен DART™ послідовності (KVAALKE)₄, що представлена SEQ ID NO:64, та GGGNS, що представлена SEQ ID NO:65.

У додаткових втіленнях Fc-ділянки можуть бути зв'язаними з Е та/або К спіралями Е-спіральними або К-спіральними DART™. Сприяння розділенню між Fc ділянками та DART™ VH доменами DART™, що містять Fc, є бажаним у випадках, коли розміщення з меншим відокремленням таких доменів приводить до зменшеної взаємодії між такими доменами та лігандами, що їх зв'язують, або іншим чином перешкоджає зборці DART™. Незважаючи на те, що можуть використовуватися будь-які сепаратори амінокислотної послідовності, є бажаним використовувати сепаратори, які утворюють α спіраль-клубок, для того, щоб максимально подовжити та спроектувати Fc домен на віддалі від варіабельних доменів. Оскільки описані вище спіралізовані поліпептиди протилежного заряду додатково функціонують для сприяння утворенню гетеродимеру, такі молекули являють собою, зокрема, бажані сепаратори. Такі молекули Fc-DART™, що містять спіраль, забезпечують переваги, подібних до тих Fc-DART™, що мають поліпшений період напіврозпаду у сироватці, та підвищену ефекторну функцію. Описані вище Е- та К-спіралізовані поліпептиди є, зокрема, бажаними для вирішення цієї задачі. Таким чином, у бажаному втіленні DART™, що містять Е-спіралізовані Fc, будуть мати загальну послідовність: [VL домен]—[GGGSGGGG]—[VH домен]—[(EVAALEK)₄]—GGG—Fc домен, починаючи від D234 (нумерація Kabat), де VL являє собою Ig варіабельний легкий домен DART™ послідовності GGGSGGGG, що представлена SEQ ID NO:52, VH являє собою варіабельний легкий Ig домен DART™ та (EVAALEK)₄, що представлена SEQ ID NO:63. Подібно до цього, у бажаному втіленні DART™, що містять К-спіралізовані Fc, будуть мати загальну послідовність: [VL домен]—[GGGSGGGG]—[VH домен]—[(KVAALKE)₄]—GGG—Fc домен, починаючи від D234 (нумерація Kabat), де VL являє собою Ig варіабельний легкий домен DART™ послідовності GGGSGGGG, що представлена SEQ ID NO:51, VH являє собою варіабельний легкий Ig домен DART™ та (KVAALKE)₄, що представлена SEQ ID NO:64.

Як зазначено вище, DART™ молекули, що містять спіраль, або DART™ молекули, що містять спіралізовані Fc, можуть містити тільки один такий сепаратор, або вони можуть містити більше ніж один такий сепаратор (наприклад, два сепаратори, бажано протилежного заряду, один з яких є зв'язаним з кожним VH доменом DART™ поліпептидів). Шляхом зв'язування Fc ділянки с такою(ими) молекулою(ами) підвищується здатність до створення бівалентних, тетравалентних і т.д. варіантів Fc-DART™ молекул шляхом заміни ланцюгів. Fc-DART™ молекули можуть, таким чином, бути одержані так, що утворюють мономери або димери у залежності від того, чи є Fc домен зв'язаним з одним або обома VH доменами DART™.

1. Адаптивність та гнучкість молекул B7-H3 DART™

Біспецифічні DART™ згідно з винаходом можуть одночасно зв'язувати два окремі та відмінні епітопи. У деяких втіленнях епітопи мають походження від того самого антигену. В інших втіленнях ці епітопи походять від різних антигенів. У бажаних втіленнях принаймні один епітопзв'язувальний сайт є специфічним для детермінанти, що експресується на імунній ефекторній клітині (наприклад, CD3, CD16, CD32, CD64, Т-клітинний рецептор, тощо), зокрема, такої, що експресуються на Т лімфоцитах, клітинах природних кілерів (NK) або інших моноклеарних клітинах. В одному втіленні DART™ молекули зв'язуються з детермінантною ефекторної клітини та також активують вказану ефекторну клітину. У зв'язку із цим, DART™ молекули згідно з винаходом можуть демонструвати Ig-подібну функціональність, яка є незалежною від того, чи будуть вони додатково включати Fc домен (наприклад, як піддається аналізу у будь-якому аналізі ефекторної функції, що є відомим у даній галузі техніки або є представленими у даній заявці (наприклад, ADCC аналіз). У деяких втіленнях біспецифічні DART™ згідно з винаходом зв'язують як раковий антиген на пухлинній клітині, так і детермінанту ефекторної клітини, при активації вказаної клітини. В альтернативних втіленнях біспецифічні DART™ або молекули DART™ згідно з винаходом можуть інгібувати активацію мішені, наприклад, клітини ефектора шляхом одночасного зв'язування активувального та інгібувального рецептора на тій самій клітині (наприклад, зв'язують як CD32A, так і CD32B, як BCR, так і CD32B, або як IgERI, так і CD32B), як описується вище (див., розділ Передумови створення винаходу). У додатковому аспекті цього втілення біспецифічні DART™ можуть демонструвати противірусні активності шляхом одночасного зв'язування двох нейтралізуючих епітопів на вірусі (наприклад, RSV епітопів; WNV епітопів, таких, як E16 та E53).

2. Універсальні B7-H3 DART™ молекули

В одному втіленні біспецифічні DART™ молекули згідно з винаходом можуть бути створені для включення одного епітопзв'язувального домену, що специфічно зв'язується з B7-H3, та другого епітопзв'язувального домену, що специфічно зв'язує гаптен, наприклад, флуоресцеїн ізотіоціанат (який є також відомим як фторізотіоціанат або FITC). Такі DART™ служать як універсальний адаптор ("UDART™"), що є здатним до сумісного лігування B7-H3 з молекулами, які взаємодіють з партнерами зв'язування, кон'югованими з флуоресцеїном. Наприклад, FITC-реактивне плече DART™ може використовуватися для зв'язування міченого FITC антитіла, яке зв'язується з мішенню, відмінною від B7-H3, втягнуеною у міжклітинну кластеризацію, міжклітинне залучення, неклітинне залучення, множинні мішені, тощо. Химерний варіант мишача Fv/людська Fc анти-флуоресцеїн MAb, 4420 можуть використовуватися як джерело специфічних для FITC CDR доменів (Gruber, M. *ma in.* (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antimicrobe Expressed In Escherichia coli," J. Immunol. 152(11): 5368-5374).

3. B7-H3 DART™ молекули, специфічні для клітинних мішеней

Біспецифічні DART™ молекули згідно з винаходом надають унікальні можливості для націлювання на специфічні типи клітин. Наприклад, біспецифічні DART™ або DART™ молекули можуть бути сконструйовані для включення комбінації епітопзв'язувальних сайтів, що впізнають набір антигенів, унікальних для цільової клітини або типу тканини. Крім того, якщо один або обидва індивідуальні антигени є досить поширеними окремо в іншій тканині та/або типах клітин, домени з низькою зв'язувальною афінністю можуть використовуватися для конструювання DART™ або DART™ молекул. Такі домени з низькою зв'язувальною афінністю будуть нездатними до зв'язування з індивідуальним епітопом або антигеном з достатньою авідністю для терапевтичних цілей. Проте, якщо обидва епітопи або антигени є присутніми на одній цільовій клітині або тканині, авідність DART™ або молекули DART™ для клітини або тканини, у порівнянні із клітиною або тканиною, що експресує тільки один з антигенів, буде підвищуватися так, що вказана клітина або тканина може ефективно являти собою мішень у відповідності з винаходом. Така біспецифічна молекула може демонструвати підвищене зв'язування з одним або обома її цільовими антигенами на клітинах, що експресують обидва із вказаних антигенів, у порівнянні із моноспецифічними DART™ або антитілом, що має специфічність тільки до одного з цих антигенів.

Наприклад, специфічні для B7-H3 DART™ згідно з даним винаходом можуть бути сконструйованими для включення домену, який являє собою зв'язувальний ліганд для рецептора групи природного кілера 2D (NKG2D). NKG2D рецептор експресується на усіх людських (та іншого ссавця) клітинах природного кілера Bauer, S. *ma in.* (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA," Science 285(5428): 727-729; Jamieson, A.M. *ma in.* (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing," Immunity 17(1): 19-29, а також на усіх CD8⁺ Т клітинах (Groh, V. *ma in.* (2001) "Costimulation Of CD8αβ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells," Nat. Immunol. 2(3): 255-260; Jamieson, A.M. *ma in.* (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing," Immunity 17(1):19-29). Такі зв'язувальні ліганди та, зокрема, ті, що не експресуються на нормальних клітинах, включають молекули гістосумісності 60 (H60), продукт ретиноевої кислоти раннього індукційного гена-1 (RAE-1) та мишачий подібний до білка транскрипт 1, що зв'язує UL16 (MULT1) (Raulet D.H. (2003) "Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands," Nature Rev. Immunol. 3: 781-790; Coudert, J.D. *ma in.* (2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells," Blood 106: 1711-1717). Додаткові ліганди, що є реактивними стосовно людського NKG2D, включають споріднені з ланцюгами молекули MICA та MICB поліморфного MHC класу I (Diefenbach, A. *ma in.* (1999) "Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In," Curr. Biol. 9(22): R851-R8533; Bauer, S. *ma in.* (1999) "Activation Of NK Cells And T-Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA," Science 285(5428): 727-729; Stephens, H.A. (2001) "M MICA And MICB Genes: Can The Enigma Of Their Polymorphism Be Resolved?" Trends Immunol. 22: 378-385. Послідовність MICA є представленою SEQ ID NO:66:

MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
 LDGQPFLRCD RQKCRAPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
 AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW
 TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
 LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
 QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
 LVLQSHWQTF HVSAAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAG PELVSLQVLD
 QHPVGTS DHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

Послідовність MICB є представленою SEQ ID NO:67:

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
 DVLGAKTWDT ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED
 SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
 KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
 LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
 SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
 AAEGP

5

Альтернативно, DART™ молекули можуть бути сконструйовані для включення домену, що є зв'язувальним лігандом для рецептора Т-клітини ("TCR") або для CD3 (ко-рецептор Т-клітини). TCR нативно експресується CD4+ або CD8+ Т-клітинами та дозволяє цим клітинам впізнавати антигенні пептиди, що є зв'язаними та представленими білками клітин, що презентують антиген, класу I або класу II МНС. Впізнання рМНС (пептид-МНС) комплексу за допомогою TCR ініціює поширення клітинної імунної відповіді, що веде до продукції цитокінів та лізису клітин, які презентують антиген (див., наприклад, Armstrong, K.M. *ma in.* (2008) "Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes," Biochem. J. 415(Pt 2): 183-196; Willemssen, R. (2008) "Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy" Cytometry A. 73(11): 1093-1099; Beier, K.C. *ma in.* (2007) "Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation" Eur. Respir. J. 29: 804-812; Mallone, R. *ma in.* (2005) "Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes," Am. J. Ther. 12(6): 534-550). CD3 являє собою рецептор, що зв'язується з TCR (Thomas, S. *ma in.* (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer," Immunology 129(2): 170-177; Guy, C.S. *ma in.* (2009) "Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex," Immunol. Rev. 232(1): 7-21; St. Clair, E.W. (Epub 2009 Oct 12) "Novel Targeted Therapies For Autoimmunity," Curr. Opin. Immunol. 21(6): 648-657; Baeuerle, P.A. *ma in.* (Epub 2009 Jun 9) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12): 4941-4944; Smith-Garvin, J.E. *ma in.* (2009) "T Cell Activation" Annu. Rev. Immunol. 27: 591-619; Renders, L. *ma in.* (2003) "Engineered CD3 Antibodies For Immunosuppression," Clin. Exp. Immunol. 133(3): 307-309).

Шляхом конструювання таких DART™ молекул для додаткового включення принаймні одного епітопзв'язувального домену, здатного до зв'язування, наприклад, з рецептором, присутнім на поверхні цільової клітини, такі DART™ молекули будуть являти собою DART™ молекули та, таким чином, будуть здатними до зв'язування з цільовими клітинами та будуть змушувати цільові клітини демонструвати зв'язувальний ліганд для рецептора групи природних кілерів 2D (NKG2D) або для TCR (саме той, який є присутнім на цільових клітинах, які зв'язуються з DART™) (див., наприклад, Germain, C. *ma in.* (2008) "Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein" Prot. Engineer. Design Selection 21(11): 665-672). Такі DART™ можуть використовуватися для перенацілювання будь-якої бажаної цільової клітини на клітину, яка є мішенню для опосередкованого NK клітинами лізису або опосередкованої Т-клітинами цитотоксичності. В одному втіленні епітопзв'язувальний домен DART™, здатний до зв'язування з рецептором, який є присутнім на поверхні цільової клітини, являє собою епітоп, що зв'язується з асоційованим з пухлиною антигеном так, що

40

здійснює зміну націлювання на такі ракові клітини на націлювання на субстрати для опосередкованого NK клітинами лізису або опосередкованої Т-клітинами цитотоксичності. Особливий інтерес являють собою асоційовані з пухлиною антигени, такі, як антиген раку молочної залози, антиген раку яєчника, антиген раку передміхурової залози, антиген раку шийки матки, антиген карциноми підшлункової залози, антиген раку легенів, антиген раку жовчного міхура, антиген раку товстого кишечника, антиген раку яєчок, раковий антиген гліобластоми, антиген, асоційований зі злоякісністю В-клітин, антиген, асоційований із множинною мієломою, антиген, асоційований з лімфомою не-Ходжкіна, або антиген, асоційований з хронічним лімфоцитарним лейкозом.

Прийнятні асоційовані з пухлиною антигени для такого застосування включають A33 (антиген колоректальної карциноми; Almquist, Y. 2006, *Nucl Med Biol.* Nov; 33(8): 991-998); B1 (Egloff, A.M. *ma in.* 2006, *Cancer Res.* 66(1): 6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6): 577-84); бета-катенін (Prange W. *ma in.* 2003 *J Pathol.* 201(2): 250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. *ma in.* 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3: 274-81); CD5 (Calin, G.A. *ma in.* 2006 *Semin Oncol.* 33(2): 167-73); CD19 (Troussard, X. *ma in.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4): 139-48); CD20 (Thomas, D.A. *ma in.* 2006 *Hematol Oncol Clin North Am.* 20(5): 1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 *AAPS J.* 18;8(3): E532-51); CD23 (Rosati, S. *ma in.* 2005 *Curr Top Microbiol Immunol.* 5;294: 91-107); CD25 (Troussard, X. *ma in.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4): 139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9): 1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9): 1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol.* 11(1): 31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. *ma in.* 2005 *Ann N Y Acad Sci.* 1062: 51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5): 339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9): 1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. *ma in.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4): 139-48); Chu, P.G. *ma in.* 2001 *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9(2): 97-106); CD103 (Troussard, X. *ma in.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4): 139-48); CDK4 (Lee, Y.M. *ma in.* 2006 *Cell Cycle* 5(18): 2110-4); CEA (канцероємбріональний антиген; Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8): 638-46; Tellez-Avila, F.I. *ma in.* 2005 *Rev Invest Clin.* 57(6): 814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. *ma in.* 2006 *Curr Opin Immunol.* 18(2): 206-13); EGF-R (рецептор епідермального фактора росту; Adenis, A. *ma in.* 2003 *Bull Cancer.* 90 Spec No: S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *ma in.* 2002 *Oncogene* 21(57): 8732-40; Rimon, E. *ma in.* 2004 *Int J Oncol.* 24(5): 1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *ma in.* 2006 *Int J Cancer.* 118(1): 123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. *ma in.* 2005 *Cancer Immunol Immunother.* 54(10): 1018-25); gp100 (Lotem, M. *ma in.* 2006 *J Immunother.* 29(6): 616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S. *ma in.* 2006 *Semin Oncol.* 33(4): 386-91); людський папіломавірус-Е6/людський папіломавірус-Е7 (DiMaio, D. *ma in.* 2006 *Adv Virus Res.* 66: 125-59; KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123: 157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6): 577-84); MART (Kounalakis, N. *ma in.* 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5): 377-82; MUC-1 (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8): 638-46); MUM-1 (Castelli, C. *ma in.* 2000 *J Cell Physiol.* 182(3): 323-31); N-ацетилглюкозамінілтрансфераза (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6; 1473(1): 21-34); p15 (Gil, J. *ma in.* 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9): 667-77); PSA (антиген, специфічний для передміхурової залози; Cracco, C.M. *ma in.* 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4): 301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123: 157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5): 881-91); TNF-рецептор (TNF- α рецептор, TNF- β рецептор; або TNF- γ рецептор; van Horssen, R. *ma in.* 2006 *Oncologist.* 11(4): 397-408; Gardnerova, M. *ma in.* 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4): 327-64); або VEGF рецептор (O'Dwyer, P.J. 2006 *Oncologist.* 11(9): 992-8).

Додаткові асоційовані з пухлиною антигени для такого застосування (та публікації, що розкривають специфічні реактивні антитіла для таких антигенів) включають ADAM-9 (патентна публікація США № 2006/0172350; публікація PCT WO06/084075); ALCAM (публікація PCT WO03/093443); карбоксипептидазу М (Патентна публікація США №2006/0166291); CD46 (патент США № 7,148,038; публікація PCT WO03/032814); цитокератин 8 (публікація PCT WO03/024191); ефринові рецептори (та, зокрема, EphA2 (патент США № 7,569,672; публікація PCT WO06/084226); інтегрин-альфа-V-бета-6 (публікація PCT WO03/087340); JAM-3 (публікація PCT WO 06/084078); KID3 (публікація PCT WO 05/028498); KID31 (публікація PCT WO06/076584); LUCA-2 (патентна публікація США №2006/0172349; публікація PCT WO 06/083852); онкостатин М (рецептор бета онкостатину) (патент США № 7,572,896; публікація PCT WO 06/084092); PIRA (патент США № 7,405,061; публікація PCT WO 04/043239); ROR1 (патент США № 5,843,749); та трансфериновий рецептор (патент США № 7,572,895; публікація PCT WO 05/121179).

Також представляють інтерес антигени, специфічні для конкретних інфекційних агентів, наприклад, вірусних агентів, включаючи, але без обмеження такими, вірус імунодефіциту людини (HIV), вірус гепатиту В (HBV), грипу, людський папіломавірус (HPV), вірус ящуру (віруси Коксакі), вірус сказу, вірус простого герпесу (HSV), та агенти, що викликають гастроентерит,

включаючи ротавіруси, аденовіруси, каліцивіруси, астровіруси та вірус Норуолк; бактеріальні агенти, включаючи, але без обмеження такими, *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* та *Streptococcus pneumoniae*, грибові агенти та паразити, такі, як *Giardi*.

У деяких втіленнях молекули згідно з винаходом конструюють для включення зміненої моделі глікозилювання зміненої глікоформи по відношенню до порівнюваної частини матричної молекули. Сконструйовані глікоформи можуть бути корисними для різноманітних цілей, включаючи, але без обмеження такими, посилення ефекторної функції. Сконструйовані глікоформи можуть бути одержані за допомогою будь-якого способу, відомого спеціалісту у даній галузі техніки, наприклад, при використанні сконструйованого штаму або штамів, які мають варіант експресії, шляхом ко-експресії з одним або більше ферментами, наприклад, *DI N*-ацетилглюкозамінілтрансферазою III (*GnTI11*), шляхом експресії *DART*[™] згідно з винаходом у різних організмах або лініях клітин з різних організмів, або шляхом модифікації вуглевода(ів) після того, як *DART*[™] були експресовані та очищені. Способи одержання сконструйованих глікоформ є відомими у галузі техніки та включають, але без обмеження такими, ті, що розкриті у *Umana ma in.* (1999) "*Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity*," *Nat. Biotechnol* 17: 176-180; *Davies ma in.* (2001) "*Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII*," *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; *Shields ma in.* (2002) "*Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity*," *J Biol Chem* 277: 26733-26740; *Shinkawa ma in.* (2003) "*The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*," *J Biol Chem* 278: 3466-3473) *US* 6,602,684; *USSN* 10/277,370; *USSN* 10/113,929; *PCT WO* 00/61739A1; *PCT WO* 01/292246A1; *PCT WO* 02/311140A1; *PCT WO* 02/30954A1; *Potillegent*[™] методики (*Biowa, Inc.* Princeton, NJ); *GlycoMAb*[™] методики глікозилювання (*GLYCART biotechnology AG*, Zurich, Switzerland); кожне із вказаних джерел є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності. Див. наприклад, *WO* 00061739; *EA*01229125; *US* 20030115614; *Okazaki ma in.* (2004) "*Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1 And FcGammaRIIIA*," *JMB*, 336: 1239-49, кожне із вказаних джерел є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

Винахід додатково охоплює введення неприродних амінокислот для одержання *DART*[™] згідно з винаходом. Такі способи є відомими спеціалістові у даній галузі техніки, наприклад, такі при використанні механізму природного біосинтезу для того, щоб здійснити вбудовування неприродних амінокислот у білки, див., наприклад, *Wang ma in.* (2002) "*Expanding The Genetic Code*," *Chem. Comm.* 1: 1-11; *Wang ma in.* (2001) "*Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli*," *Science*, 292: 498-500; *van Hest ma in.* (2001) "*Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control*," *Chem. Comm.* 19: 1897-1904, кожне із вказаних джерел є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності. Альтернативні стратегії фокусуються на ферментах, які відповідають за біосинтез аміноацил-тРНК, див., наприклад, *Tang ma in.* (2001) "*Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein, Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host*," *J. Am. Chem. Soc.* 123(44): 11089-11090; *Kiick ma in.* (2001) "*Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli*," *FEBS Lett.* 502(1-2): 25-30; кожне із вказаних джерел є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності. У деяких втіленнях винахід охоплює способи ідентифікації *VL*, *VH* або *Fc* доменів молекули згідно з винаходом шляхом додання або видалення сайту глікозилювання. Способи модифікації вуглеводів білків є добре відомими у галузі техніки та охоплюються об'ємом даного винаходу, див., наприклад, патент США № 6,218,149; *EP* 0 359 096 B1; публікацію США № 2002/0028486; *WO* 03/035835; публікацію США № 2003/0115614; патент США № 6,218,149; патент США № 6,472,511; які усі є введеними у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

VIII. Способи використання *B7-H3* модуляторів та анти-*B7-H3* антитіл для терапевтичних цілей

Моноклональні антитіла до *B7-H3* можуть використовуватися для терапевтичних цілей у індивідуумів з раком або іншими захворюваннями. Терапія при використанні анти-*B7-H3* антитіл може передбачати утворення комплексів як *in vitro*, так і *in vivo*, як описано вище. В одному втіленні моноклональне антитіло анти-*B7-H3* може зв'язуватися з раковими клітинами для зменшення їх проліферації. При цьому є зрозумілим, що антитіло вводиться при концентрації, яка сприяє зв'язуванню при фізіологічних (наприклад, *in vivo*) умовах. В іншому втіленні

моноклональні антитіла до B7-H3 можуть використовуватися для імунотерапії, направленої на ракові клітини різних тканин, таких, як товстий кишечник, легені, молочна залоза, передміхурова залоза, яєчник, підшлункова залоза, нирки та інших типів раку, таких, як саркома. В іншому втіленні моноклональне антитіло анти-B7-H3, узятє окремо, може зв'язуватися для зниження клітинного поділу у раковій клітині. В іншому втіленні моноклональне антитіло анти-B7-H3 може зв'язуватися з раковими клітинами та затримувати розвиток метастазів. Ще в одному втіленні індивідуум з раком одержує паліативне лікування при використанні анти-B7-H3 антитіла. Паліативне лікування раку у індивідуумів передбачає лікування або зменшення шкідливих симптомів захворювання, або ятрогенних симптомів, що є результатом інших способів лікування, яким піддається захворювання без безпосереднього впливу на розвиток раку. Таке лікування включає способи лікування для полегшення болю, для здійснення парентерального живлення, вирішення сексуальних проблем, психологічних страждань, депресії, втомлюваності, психіатричних розладів, нудоти, блювання та інших.

У таких ситуаціях анти-B7-H3 антитіло може вводитися з агентами, які поліпшують власну імунну відповідь індивідуума або направляють її, такими, як агент, що посилює ADCC.

Ще в одному втіленні анти-B7-H3 антитіло кон'югують або сполучають з радіоактивними молекулами, токсинами (наприклад, каліхеаміцином), хіміотерапевтичними молекулами, ліпосомами або іншими носіями, що містять хіміотерапевтичні сполуки та вводяться індивідууму, який потребує такого лікування, для націлювання цих сполук на ракові клітини, що містять антиген, який упізнається антитілом та, таким чином, знищує ракові або хворі клітини. Не маючи наміру обмежуватися будь-якою конкретною теорією, можна сказати, що анти-B7-H3 антитіло інтерналізується клітиною, яка несе B7-H3 на своїй поверхні, доставляючи таким чином, кон'югований залишок до клітини для індукції терапевтичного ефекту. Ще в одному втіленні антитіло може використовуватися як допоміжна терапія при хірургічному видаленні раку, що експресує антиген, для того, щоб відстрочити розвиток метастазів. Антитіло може також вводитися до хірургічного втручання (неоад'ювантна терапія) у індивідуума з пухлиною, яка експресує антиген, для того, щоб зменшити розмір пухлини та, таким чином, дозволити спростити хірургію, зберегти тканину при хірургії та/або зменшити фізичний недолік, який виникає в результаті цього.

Дозування у відповідності із клітинним циклом передбачається практикою згідно з даним винаходом. У таких втіленнях хіміотерапевтичний агент використовується для синхронізації клітинного циклу пухлини або інших цільових хворих клітин на попередньо визначеній стадії. У відповідності із цим, здійснюють введення анти-B7-H3 антитіла згідно з даним винаходом (узятю окремо або з додатковим терапевтичним залишком). В альтернативних втіленнях анти-B7-H3 антитіло використовується для синхронізації клітинного циклу та зменшення ділення клітин перед призначенням другого циклу лікування; другий цикл може являти собою введення анти-B7-H3 антитіла та/або додаткового терапевтичного залишку.

Хіміотерапевтичні агенти включають радіоактивні молекули, токсини, що також називаються цитотоксинами або цитотоксичними агентами, які включають будь-який агент, же такий агент є руйнівним для життєздатності ракових клітин, агенти та ліпосоми або інші носії, що містять хіміотерапевтичні сполуки. Приклади прийнятих хіміотерапевтичних агентів включають, але без обмеження такими, 1-дегідротестостерон, 5-фторурацил, декарбазин, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, актиноміцин D, адриаміцин, альдеслейкін, алкілувальні агенти, алопуринол натрію, альтретамін, аміфостин, анастрозол, антраміцин (AMC), анти-мітотичні агенти, цис-дихлородіамін (II) платини (DDP) (цисплатин), діамінодихлорплатину, антрацикліни, антибіотики, антиметаболіти, аспарагіназу, BCG живу (інтравезикулярну), бетаметазон натрію фосфат та бетаметазон ацетат, бікалутамід, блеоміцин сульфат, бусульфат, лейковорин кальцію, каліхеаміцин, капецитабін, карбоплатин, ломустин (CCNU), кармустин (BSNU), хлорамбуцил, цисплатин, кладрибін, колхіцин, кон'юговані естрогени, циклофосфамід, циклотосфамід, цитарабін, цитохалазин, цитоксан, дакарбазин, дактиноміцин, дактиноміцин (раніше актиноміцин), даунірубін HCL, даунорубін цитрат, денілейкін діфтитокс, дексразоксан, дибромоманітол, дигідроксіантрацидін, доцетаксел, доласетрон мезилат, доксорубіцин HCL, дронабінол, L-аспарагіназу *E. coli*, еметин, епоетин альфа, L-аспарагіназу Erwinia, етерифіковані естрогени, естрадіол, естрамустин фосфат натрію, бромід етидію, етинілестрадіол, етидронат, етопозид цитророрум фактор, етопозид фосфат, філграстим, флоксуридин, флуконазол, флударабін фосфат, фторурацил, флутамід, фолієву кислоту, гемцитабін HCL, глюкокортикоїди, гозереліну ацетат, граміцидин D, гранісетрон HCL, гідрокси сечовину, ідарубіцин HCL, іфосфамід, інтерферон альфа-2b, іринотекан HCL, летрозол, лейковорин кальцію, лейпролід ацетат, левамизол HCL, лідокаїн, ломустин, мейтансиноїд, мехлоретамін HCL, медроксипрогестерон ацетат, мегестрол, мелфалан HCL, меркаптопурин,

месна, метотрексат, метилтестостерон, мітраміцин, мітоміцин С, мітотан, мітоксантрон, нілутамід, октреотид ацетат, ондансетрон HCL, паклітаксел, памідронат динатрію, пентостатин, пілокарпін HCL, пліміцин, поліфепросан 20 (з імплантатом кармустину), порфімер натрію, новокаїн, прокарбазин HCL, пропранолол, ритуксимаб, сарграмостим, стрептозотоцин, тамоксифен, таксол, теніпозид, тенопозид, тестолактон, тетракаїн, тіотепа хлорамбуцил, тіогуанін, тіотепа, топотекан HCL, тореміфен цитрат, трастузумаб, третиноїн, валрубіцин, вінбластин сульфат, вінкрестин сульфат та вінорелбін тартрат.

У бажаному втіленні цитотоксин є особливо ефективним у клітинах, що діляться, або у клітинах, що активно діляться, так, що клітини, які не діляться, є відносно позбавленими такого впливу.

Антитіла згідно з винаходом можуть бути інтерналізованими хворими клітинами або клітинами карциноми, з якими вони зв'язуються, та є, таким чином, зокрема, корисними для терапевтичних застосувань, наприклад, доставки у клітини токсинів, які повинні бути інтерналізовані для виявлення їх шкідливої активності. Приклади таких токсинів включають, але без обмеження такими, сапорин, каліхеаміцин, ауристин та майтансиноїд.

Антитіла або поліпептиди згідно з винаходом можуть бути асоційовані (включаючи кон'юговані або зв'язані) з радіоактивними молекулами, токсином або іншими терапевтичними агентами, або ліпосомами, або іншими носіями, що містять терапевтичні агенти, ковалентно або нековалентно, безпосередньо або опосередковано. Антитіло може бути зв'язаним з радіоактивною молекулою, токсином або хіміотерапевтичною молекулою при будь-якій локалізації уздовж антитіла за умови, що антитіло є здатним до зв'язування своєї мішені B7-H3.

Токсин або хіміотерапевтичний агент можуть вводитися паралельно (перед, після або під час введення) або як сполучені (наприклад, ковалентно зв'язані) з прийнятим моноклональним антитілом або безпосередньо, або опосередковано (наприклад, за допомогою лінкерної групи, або, альтернативно, при використанні зв'язувальної молекули з прийнятим сайтом для приєднання, такої, як молекула носія, як описується у патенті США № 5,552,391). Токсин та хіміотерапевтичний агент згідно з даним винаходом можуть бути злитими безпосередньо з конкретними націлювальними білками при використанні способів, відомих у галузі техніки. Наприклад, безпосередня реакція між агентом та антитілом є можливою тоді, коли кожна з них має замісник, здатний до реакції один з одним. Наприклад, нуклеофільна група, така, як аміногрупа або сульфгідрильна група, на одному з партнерів може бути здатною до реакції з групою, що містить карбоніл, такий, як ангідрид або кислотний галід, або з алкільною групою, що містить прийнятну групу, яка відходить (наприклад, наприклад, галід) на іншому.

Антитіла або поліпептиди можуть також бути зв'язаними з хіміотерапевтичним агентом за допомогою мікроносія. Термін "мікроносій" відноситься до здатної до біорозкладання або не здатної до біорозкладання частинки, яка є нерозчинною у воді, та яка має розмір, менше ніж приблизно 150 мкм, 120 мкм або 100 мкм, більш типово, менший, ніж приблизно 50-60 мкм, бажано, менший, ніж приблизно 10, 5, 2,5, 2 або 1,5 мкм. Мікроносії включають "наноносії", які є мікроносіями, які мають розмір, менший ніж приблизно 1 мкм, бажано менший ніж приблизно 500 нм. Такі частинки є відомими у галузі техніки. Твердофазні мікроносії можуть являти собою частинки, утворені з біосумісних природних, синтетичних полімерів або синтетичних співполімерів, які можуть включати або виключати мікроносії, утворені з агарози або перехресно зшиті агарози, а також інші здатні до біорозкладання матеріали, відомі у галузі техніки. Здатні до біорозкладання твердофазні мікроносії можуть бути утворені з полімерів, які є здатними до розкладання (наприклад, полі(молочна кислота), полі(гліколева кислота) та їх співполімери) або здатними до руйнування (наприклад, полі(ортоестери), такі, як 3,9-діетиліден-2,4,8,10-тетраоксоспіро[5.5]ундекан (DETOSU) або полі(ангідриди), такі, як полі(ангідриди) себацинової кислоти) при фізіологічних умовах, характерних для ссавців. Мікроносії можуть також являти собою рідку фазу (наприклад, таку на основі олії або масла), наприклад, ліпосоми, іскоми (імуностимулювальні комплекси, які являють собою стабільні комплекси холестеролу, фосфоліпиду та активного як ад'ювант сапоніну) без антигену, або краплі або міцели, що знаходяться в емульсіях типу масло-у-воді або вода-у-маслі, за умови, що мікроносії на основі рідкої фази є здатними до біорозкладання. Здатні до біорозкладання мікроносії на основі рідкої фази типово містять здатні до біорозкладання олії, велика кількість яких є відомою у галузі техніки, включаючи сквален та рослинні олії. Мікроносії типово є сферичними за формою, проте мікроносії, форма яких відрізняється від сферичної, є також прийнятними (наприклад, еліпсоїдні, паличкоподібні, тощо). Завдяки свої нерозчинній природі (по відношенню до води), мікроносії піддаються фільтруванню з води та розчинів на основі води (водних).

Кон'югати антитіла або поліпептидів згідно з даним винаходом можуть включати біфункціональний лінкер, що містить як групу, здатну до злиття з токсичним агентом або

хіміотерапевтичним агентом, так і групу, здатну до злиття з антитілом. Лінкер може функціонувати як спейсер для розміщення антитіла на відстані від агента для того, щоб уникнути взаємних перешкод у зв'язувальній здатності. Лінкер може бути здатним до розщеплення або не здатним до розщеплення. Лінкер може також служити для підвищення хімічної реактивності замісника на агенті або на антитілі та, таким чином, підвищувати ефективність зв'язування. Підвищення хімічної реактивності може також сприяти використанню агентів або функціональних груп на агентах, що в іншому випадку не було б можливим. Біфункціональний лінкер може бути злитий з антитілом при використанні засобів, що є відомими у галузі техніки. Наприклад, лінкер, що містить активний залишок естеру, такого, як N-гідроксисукцинімідний естер, може використовуватися для злиття із залишком лізину в антитілі за допомогою амідного зв'язку. В іншому прикладі лінкер, що містить залишок нуклеофільного аміну або гідразину, може бути злитий з альдегідними групами, які утворюються за допомогою гліколітичного окиснення залишків вуглеводів антитіла. На доповнення до цих безпосередніх способів злиття, лінкер може опосередковано зливатися з антитілом за допомогою проміжного носія, такого, як амінодекстран. У цих втіленнях модифікований зв'язок здійснюється або за допомогою лізину, вуглеводу або проміжного носія. В одному втіленні лінкер селективно до сайту зливають з вільними залишками тіолу у білках. Залишки, що є прийнятними для селективного злиття з групами тіолу на білках, є добре відомими у галузі техніки. Приклади включають дисульфідні сполуки, сполуки на основі α -галокарбонілу та α -галокарбоксила та малеїміди. Коли група нуклеофільного аміну є присутньою у тій самій молекулі, що й α -галокарбоніл або карбоксил, існує потенціал для здійснення циклізації за рахунок внутрішньомолекулярного алкілювання аміну. Методи запобігання виникнення цієї проблеми є добре відомими середньому спеціалістові у даній галузі техніки, наприклад, шляхом одержання молекул, в яких амін та α -гало є розділеними негнучкими групами, такими, як арильні групи або транс-алкени, що робить небажану циклізацію стереохімічно не вигідною. Див., наприклад, патент США № 6,441,163 для одержання кон'югатів майтансиноїдів та антитіла за допомогою дисульфідного залишку.

Один зі здатних до розщеплення лінкерів, які можуть використовуватися для одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб, являє собою кислотолабільний лінкер на основі цис-аконітової кислоти, що користується перевагою кислотного оточення різних внутрішньоклітинних компартментів таких, як ендосоми, що виявляються під час опосередкованого рецептором ендоцитозу, та лізосоми. Див., наприклад, Shen, W.C. *ma in.* (1981) ("cis-Aconityl Spacer Between Daunomycin And Macromolecular Carriers: A Model Of pH-Sensitive Linkage Releasing Drug From A Lysosomotropic Conjugate," Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1048-1054 (1981)) для одержання кон'югатів даунорубіцину з макромолекулярними носіями; Yang *ma in.* (1988) ("Pharmacokinetics And Mechanism Of Action Of A Doxorubicin-Monoclonal Antibody 9.2.27 Conjugate Directed To A Human Melanoma Proteoglycan," J. Natl. Canc. Inst. 80: 1154-1159) для одержання кон'югатів даунорубіцину з антимеланомним антитілом; Dillman *ma in.* (1988) ("Superiority Of An Acid-Labile Daunorubicin-Monoclonal Antibody Immunoconjugate Compared To Free Drug," Cancer Res. 48: 6097-6102) для використання лабільного стосовно кислоти лінкера так само, як одержують кон'югати даунорубіцину з антитілами до Т-клітин; та Trouet *ma in.* (1982) "A Covalent Linkage Between Daunorubicin And Proteins That Is Stable In Serum And Reversible By Lysosomal Hydrolases, As Required For A Lysosomotropic Drug-Carrier Conjugate: In Vitro And In Vivo Studies," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 79: 626-629) для зв'язування даунорубіцину з антитілом за допомогою пептидної спейсерної "ніжки".

Антитіло (або поліпептид) згідно з даним винаходом може бути кон'югованим (зв'язаним) з радіоактивною молекулою або токсином за допомогою будь-якого способу, відомого у галузі техніки. Для обговорення способів одержання радіоактивно міченого антитіла див. Cancer Therapy with Monoclonal Antibodies, D.M. Goldenberg (Ed.) CRC Press, Boca Raton, 1995. Прийнятні токсини включають таксани, майтансиноїди, ауристатини (наприклад, монометил ауристатин (ММАЕ), монометил ауристатин F (ММАF), ауристатин Е (АЕ), тощо) (такі, як ті, що є розкритими патентах США № 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,441,163; 6,596,757; 7,276,497; 7,585,857; або 7,851,432), каліхеаміцин, антрацикліни (наприклад, доксорубіцин), СС-1065 аналог, доцетаксел, катепсин В або Е; рицин, гелонін, екзотоксин *Pseudomonas*, дифтерійний токсин, та РНКаз; тійксетан або токсичний радіоізотоп (такий, як ^{90}Y , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , тощо).

Альтернативно, антитіло може бути кон'югованим з другим антитілом з утворенням гетерокон'югату антитіла, як описано у патенті США № 4,676,980. Утворення перехресно зв'язаних антитіл може націлювати імунну систему на специфічні типи клітин, наприклад, ракові

або хворі клітин, що експресують B7-H3.

Даний винахід також забезпечує затримку розвитку метастазів у індивідуума з раком (включаючи, але без обмеження, рак передміхурової залози, легенів або нирки) при використанні анти-B7-H3 антитіла або інших втілень, які зв'язуються з B7-H3, у комбінації з хіміотерапевтичним агентом, або таких, які є зв'язаними з хіміотерапевтичним агентом. У деяких втіленнях антитіло являє собою гуманізовану або химерну форму не-людського анти-B7-H3 антитіла.

Ще в одному втіленні антитіло може використовуватися як допоміжна терапія під час хірургічного видалення раку, що експресує антиген, для того, щоб затримати розвиток метастазів. Антитіло може також вводитися додатково до хірургічного втручання (неoad'ювантна терапія) у індивідуума з пухлиною, яка експресує антиген, для того, щоб зменшити розмір пухлини та, таким чином, дозволити спростити хірургію, зберегти тканину при хірургії та/або зменшити фізичний недолік, який виникає в результаті цього.

Ще в одному втіленні будь-яка з композицій, що зв'язують B7-H3, описані в даній заявці, буде зв'язуватися з раковими клітинами, що експресують B7-H3, та індукувати активну імунну відповідь проти ракових клітин, що експресують B7-H3. У деяких випадках активна імунна відповідь може викликати загибель ракових клітин (наприклад, антитіло, яке зв'язується з раковими клітинами, індукує апоптичну смерть клітин) або інгібувати ріст (наприклад, блокувати цикл розмноження клітин) ракових клітин. В інших випадках будь-яке з нових антитіл, описаних в даній заявці, буде зв'язуватися з раковими клітинами, та залежна від антитіла клітинна цитотоксичність (ADCC) може видаляти ракові клітини, з якими зв'язується анти-B7-H3. У відповідності із цим винахід забезпечує способи стимулювання імунної відповіді, що включають введення будь-якої з композицій, описаних у даній заявці.

У деяких випадках зв'язування антитіл може також активувати як клітинну, так і гуморальну імунну відповідь та залучати більше клітин природних кілерів або підвищувати продукцію цитокінів (наприклад, IL-2, IFN-гамма, IL-12, TNF-альфа, TNF-бета, тощо), що додатково активує імунну систему індивідуума для руйнування ракових клітин. Ще в одному втіленні анти-B7-H3 антитіла можуть зв'язуватися з раковими клітинами, та макрофаги або інші фагоцитарні клітини можуть опсонізувати ракові клітини.

Різні композиції анти-B7-H3 антитіл або їх фрагментів можуть використовуватися для введення. У деяких втіленнях анти-B7-H3 антитіла або їх фрагменти можуть вводитися самостійно. На доповнення до фармакологічно активного агента композиції згідно з даним винаходом можуть містити прийнятні фармацевтично допустимі носії, що включаються наповнювачі та допоміжні речовини, які є також відомими у галузі техніки та являють собою відносно інертні речовини, які полегшують введення фармакологічно ефективних речовин, або які полегшують обробку активних сполук у препарати, які можуть використовуватися фармацевтично для доставки до сайту дії. Наприклад, наповнювач може надавати форму або однорідність, або виступати як розріджувач. Прийнятні наповнювачі включають, але без обмеження такими, стабілізуювальні агенти, змочувальні та емульгуювальні агенти, солі для зміни осмолярності, інкапсулюючі агенти, буфери та агенти, що сприяють проникненню через шкіру.

Прийнятні препарати для парентерального введення включають водні розчини активних сполук у водорозчинній формі, наприклад, розчинні у воді солі. Крім того, можуть вводитися суспензії активних сполук, які є прийнятним для масляних суспензій для ін'єкцій. Прийнятні ліпофільні розчинники або транспортні засоби включаються жирні олії, наприклад, кунжутну олію, або синтетичні ефіри жирних кислот, наприклад, етилолеат або тригліцериди. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії, та включають, наприклад, карбоксиметилцелюлозу натрію, сорбіт та/або декстран. Необов'язково, суспензія може також містити стабілізатори. Ліпосоми можуть бути також використовуватися для інкапсуляції агента для доставки в клітину.

Фармацевтична композиція для системного введення відповідно до винаходу може бути рецептована для ентерального, парентерального або місцевого застосування. Дійсно, всі три види препарату можуть бути використані одночасно для досягнення системного введення активного інгредієнта. Допоміжні речовини, а також препарати для парентеральної та непарентеральної доставки лікарських засобів приведені у Remington: The Science And Practice Of Pharmacy, 21-е видання, Lippincott Williams & Wilkins Publishing (2005). Прийнятні препарати для перорального введення включають жорсткі або м'які желатинові капсули, пігулки, таблетки, включаючи таблетки з покриттям, еліксири, суспензії, сиропи або препарати для інгаляції та форми контрольованого вивільнення. Як правило, ці агенти є рецептованими для введення шляхом ін'єкції (наприклад, інтраперитонеально, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово і т.д.), хоча можуть використовуватися інші форми введення (наприклад,

пероральне, через слизові оболонки і т.д.). У відповідності із цим анти-B7-H3 антитіла є бажаними у поєднанні з фармацевтично прийнятними носіями, такими, як фізіологічний розчин, розчин Рінгера, розчин декстрази та подібні до них.

Конкретний режим дозування, тобто, дози, строки та повторення, буде залежати від конкретного індивідуума та історії хвороби такого індивідуума. Як правило, вводять дозу принаймні приблизно 100 мкг/кг маси тіла, більш бажаною є доза принаймні приблизно 250 мкг/кг маси тіла, ще більш бажаною є доза принаймні приблизно 750 мкг/кг маси тіла, ще більш бажаною є доза принаймні приблизно 3 мг/кг маси тіла, ще більш бажаною є доза принаймні приблизно 5 мг/кг маси тіла, ще більш бажаною є доза принаймні приблизно 10 мг/кг маси тіла.

Емпіричні міркування, такі, як період напіврозпаду, як правило, будуть сприяти визначенню дози. Антитіла, які є сумісними з імунною системою людини, такі, як гуманізовані антитіла або повністю людські антитіла, можуть бути використані для подовження періоду напіврозпаду антитіла та запобігання атаці антитіла імунною системою хазяїна. Частота введення може бути визначена та скоригована в процесі терапії та може базуватися на зменшенні кількості ракових клітин, підтриманні скорочення кількості ракових клітин, зниженні проліферації ракових клітин або затримці розвитку метастазів. Альтернативно, довготривале, безперервне вивільнення анти-B7-H3 антитіл може бути доцільним. Різні композиції та пристрої для досягнення довготривалого вивільнення є відомими у галузі техніки.

В одному втіленні дозування для анти-B7-H3 антитіл може бути визначене емпірично у індивідуумів, які одержували одне або більше введення(введень). Індивідууми можуть одержувати дози анти-B7-H3 антитіла, що підвищуються. Для оцінки ефективності анти-B7-H3 антитіл може використовуватися маркер конкретного стану ракового захворювання. Такі способи включають безпосереднє вимірювання розмірів пухлини за допомогою пальпації або візуального спостереження, опосередковані вимірювання розмірів пухлини за допомогою рентгенографії або інші методи візуалізації поліпшення за оцінками прямої біопсії пухлини та мікроскопічного дослідження зразка пухлини; вимірювання непрямих пухлинних маркерів (наприклад, PSA для раку передміхурової залози), зменшення болю або паралічу, поліпшення мови, зору, дихання або інших порушень, пов'язаних з пухлиною, підвищення апетиту або підвищення якості життя, як вимірюється за допомогою прийнятих аналізів, або подовження строку виживання. Для фахівця в даній галузі техніки буде очевидним, що дозування будуть варіювати в залежності від індивідуума, типу раку, стадії раку, чи почав рак метастазувати в інші місця у індивідуума, способів лікування, які використовувалися раніше, та способів паралельного лікування, яке використовується.

Інші препарати, що включають прийнятні форми доставки відомі у галузі техніки, включаючи, але не обмежуючись, носії, такі, як ліпосоми. Див., наприклад, Mahato *ma in.* (1997) "Cationic Lipid-Based Gene Delivery Systems: Pharmaceutical Perspectives," Pharm. Res. 14: 853-859. Ліпосомні препарати включають, але без обмеження такими, цитофектини, багатошарові везикули та одношарові везикули.

У деяких втіленнях може бути присутнім більше одного антитіла. Антитіла можуть бути моноклональними або поліклональними. Такі композиції можуть містити принаймні одне, принаймні два, принаймні три, принаймні чотири, принаймні п'ять різних антитіл, що є реактивними проти раку, аденокарциноми, саркоми або аденосаркоми. Анти-B7-H3 антитіло може бути змішане з одним або більше антитілами, реактивних проти раку, аденокарциноми, саркоми або аденосаркоми в органах включаючи, але без обмеження такими, яєчники, молочну залозу, легені, передміхурову залозу, товсту кишку, нирки, шкіру, щитовидну залозу, кістки, верхній відділ травного тракту та підшлункову залозу. В одному втіленні використовується суміш різних анти-B7-H3 антитіл. Суміш антитіл, як вони часто позначаються в галузі техніки, також може бути особливо корисною при лікуванні широкої популяції індивідуумів.

Описавши у загальних рисах даний винахід, усе це можна буде легше зрозуміти за допомогою посилань на наступні приклади, які забезпечуються як ілюстрація та не є призначеними для обмеження даного винаходу, якщо не вказано інше.

Приклад 1

Оцінка імуногістосумісності

Панель з 49 моноклональних антитіл одержували при використанні імунізацій пухлинними клітинами / мбріональними клітинами попередниками. Антитіла оцінювали на їх здатність проявляти диференціальне ІНС забарвлення пухлинної тканини у порівнянні з нормальними, не раковими тканинами, можливість застосування у моделях приматів (та, зокрема, у мавпи циномолгус) ефективності антитіла, рівня афінності, антигенної специфічності та рівня імуномодуляторної активності та інтерналізації клітинами. 21 моноклональне антитіло було спочатку ідентифіковано за допомогою MS аналізу та/або зв'язуванням з B7-H3-CHO клітинами.

Решта 28 моноклональних антитіл були ідентифіковані шляхом повторного скринінгу бібліотеки за допомогою ELISA при використанні B7-H3 білка. Характеристики 46 з 49 членів групи представлені у Таблиці 2.

Таблиця 2

Назва	Ізотип	IHC	ATCC аналіз	Інтерна- лізація	U-DART™	BIACORE™ аналіз	Зв'язування B7- H3 циномоглуса
BRCA84D	IgG1/k	2a	2	+	+	+	++
TDH6	IgG1/k	2a	1	+	+	+/-	+
TES7	IgG1/k	2a	1	+	+	+	-
BRCA68D	IgG1/k	2b	3	+	+	++	++
BRCA69D	IgG1/k	2b	3	+	+	++	++
GB8	IgG1/k	2b	3	+	+	+	++
SG27	IgG2b/k	2b	1		+	+	+
OVCA22	IgG1/k	2c	3	+	+	+/-	+
PRCA157	IgG1/k	2c	2	+	+		++
BLA8	IgG1/k	2c		+/-	+	++	++
KID35	IgG1/k	2c	2				++
LUCA50	IgG2a/k	2c	1			+	++
OVCA21	IgG1/k	2c	1		+	+	+
PRCA135	IgG1/k	2c	3		+		++
SG24	IgG2a/k	2c	3			++	++
TDH5	IgG1/k	2c	3		+	++	++
BCCA66	IgG1/k	2c	2		+		-
RECA13	IgG1/k	2c	3		+		-
RECA9	IgG1/k	2c	3		+		-
PRCA123	IgG1/k	2c/3	3		+		++
BRCA126	IgG1/k	3/F					
BRCA192	IgG1/k	3/F					
BRCA34	IgG1/k	3/F					
KID1	IgG1/k	3/F	Н/В	+	+		+
KID13	IgG2a/k	3/F	3				++
LU14	IgG2b/k	3/F					-
LUCA1	IgG1/k	3/F	1	+	+	++	++
MCLY42	IgG2a/k	3/F					++
MCLY46	IgG1/k	3/F					++
OVCA40	IgG1/k	3/F					++
PA20	IgG1/k	3/F		+		++	-
PA40	IgG2b/k	3/F	3				-
PA41	IgG1/k	3/F	3				
PRO6	IgG1/k	3/F	2				-
RECA22	IgG1/k	3/F	3		-		+
SAL3	IgG2a/k	3/F			+++		++
SG20	IgG1/k	3/F					+
SG29	IgG1/k	3/F					++
SKIN2	IgG1/k	3/F	3		+++		++
STO5	IgG2b/k	3/F	3		++		+
TDH36	IgG1/k	3/F	2				++
TDH37	IgG1/k	3/F	3				+
TDH4	IgG1/k	3/F			+++	++	++
TDH40	IgG2b/k	3/F	3				++
TDH44	IgG2b/k	3/F					++
OVCA25	IgG1/k	3/F	3				+

5

IHC забарвлення підтвердило, що панель включає антитіла, які мають сильну відмінність у зв'язуванні між пухлинними та нормальними тканинами у багатьох із ідентифікованих антитіл,

що продемонстрували спектр зв'язувальних властивостей при використанні BIACORE™ аналізу, що демонструє реактивність спектру епітопів, які перекриваються, та епітопів, які не перекриваються, та продемонстрували спектр специфічності до 4Ig проти 2Ig B7-H3. Характеристики дев'яти найкращих кандидатів наведені у Таблиці 3 та Таблиці 4.

5

Таблиця 3					
Назва	Нормальна тканина	Рак товстого кишечника	Рак легень	Рак передміхурової залози	Рак молочної залози
BRCA84D	Кишечник 1+ Легеня 1+ Печінка 1+	1231 *	1130	112	1111
TDH6	Кишечник 1+ Підшл. зал. 1+ Нирка 1+ Легеня 1+ Печінка 1+	1110 *	1010	111	1011
TES7		1,5	1,75	3	3
BRCA68D	Підшл. зал. 1+ Нирка 1+ Легеня 1+ Печінка 2+	2321 *	3332	333	3333
BRCA69D	Кишечник 1+ Підшл. зал. 1+ Нирка 1+ Печінка 1+	2231 *	3231	333	3333
GB8					
SG27	Кишечник 1+ Підшл. зал. 1+ Нирка 1+ Печінка 1+	1221 *	1120	222	1122
OVCA22	Кишечник 2+ Підшл. зал. 2+ Печінка 2+	1122	3131 **	222	3233
PRCA157	Кишечник 2+ Печінка 2+ Шкіра 2+	2231 *	3231	333	2333
* + сил. також; ** сил. 3+					

Таблиця 4		
Назва	2Ig/4Ig специфічність	Група епітопа
BRCA84D	4Ig/2Ig	1
TDH6	4Ig/2Ig	2
TES7	4Ig	3
BRCA68D	4Ig/2Ig	4
BRCA69D	4Ig/2Ig	4
GB8	4Ig/2Ig	5
SG27	4Ig/2Ig	6
OVCA22	4Ig	7
PRCA157	4Ig/2Ig	8

Таблиця 5 забезпечує короткий виклад профілів активності цих антитіл.

Таблиця 5							
Назва	Забарвл. норм. тканини	Відмінність пухлинна/ нормальна	Пухлина Тканина Позитив.	Перехресна реактивність циномолгус	ІНС*	Зв'язування BIACORE™	Активність UDART™
BRCA84D	1	1	Пухлина Строма bv	Позитивн. (не 1:1)	78	++	++
TES7	1	1	Пухлина Строма bv	Негативн.	1250	+	++
BRCA68D	3	3	Пухлина	Позитивн. (1:1)	20	+++	++
BRCA69D	3	3	Пухлина Строма	Позитивн. (1:1)	20	+++	++
GB8	2/3 (наднирк. н/в)	3/4	Пухлина Строма	н/в, + рекомб.	625	+	+
SG27	2/3	н/в	н/в	Н/в, + рекомб.	20000	+	+
OVCA22	1	1	Пухлина Строма	Негативн. + рекомб.	2500	+	++
PRCA157	2	3	Пухлина Строма bv	Позитивн. (1:1)	20	Н/в	++
* Оптимальна конц. у нг/мл; н/в, не визначали							

Аналіз активностей антитіл, показаний у Таблиці 6, виявив, що їх відносні профілі відрізняються та що кожне антитіло було пов'язаним як з перевагами, так і з недоліками стосовно одне одного (Таблиця 6).

Таблиця 6		
Антитіло	Переваги	Недоліки
BRCA84D	#1 забарвлювання нормальної тканини #1 відмінність пухлинна/нормальна забарвлювання пухлини, стромы, BV середня афінність, унікальний сайт зв'язування (здатне до титрування зв'язування)	Перехресна реактивність з циномолгус не 1:1
BRCA68D	#3 забарвлювання нормальної тканини #3 відмінність пухлинна/нормальна перехресна реактивність з циномолгус 1:1 висока афінність потужна UDART™ активність	Забарвлювання тільки пухлини
BRCA69D	#3 забарвлювання нормальної тканини #3 відмінність пухлинна/нормальна перехресна реактивність з циномолгус 1:1 забарвлювання пухлини, стромы висока афінність потужна UDART™ активність	
PRCA157	#2 забарвлювання нормальної тканини #3 відмінність пухлинна/нормальна перехресна реактивність з циномолгус 1:1 забарвлювання пухлини, стромы, BV потужна UDART™ активність	BIACORE™
TES7	#1/2 нормальна тканина забарвлювання #1/2 відмінність пухлинна/нормальна	Відсутність перехресної реактивності з циномолгус

Таблиця 6		
Антитіло	Переваги	Недоліки
	забарвлювання пухлини, стромы, BV 4Ig специфічне потужна UDART™ активність	Низька афінність
OVCA22	#1/2 забарвлювання нормальної тканини #1/2 відмінність пухлинна/нормальна низька афінність забарвлювання пухлини, стромы 4Ig специфічне потужна UDART™ активність	Відсутність перехресної реактивності з циномоглус низька афінність
GB8	#2/3 забарвлювання нормальної тканини (надниркові залози не визначали) #3/4 відмінність пухлинна/нормальна забарвлювання пухлини, стромы помірна UDART™ активність	Перехресну реактивності з циномоглус не визначали низька афінність
SG27	#2/3 забарвлювання нормальної тканини відмінність пухлинна/нормальна не визначали помірна UDART™ активність	Перехресну реактивності з циномоглус не визначали низька афінність

Оскільки BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D та PRCA157 демонстрували більш чіткі ІНС профілі нормальної тканини, більш сильну відмінність ІНС пухлинна/нормальна, від середнього до сильного зв'язування (BIACORE™ / ІНС), перехресну реактивність з B7-H3 мавп циномоглус та потужну UDART™ активність, ці види антитіл відбирали для подальшої розробки. Ці антитіла відрізнялися від TES7 та OVCA22, які демонстрували низьку афінність (у BIACORE™ аналізі) та відсутність перехресної реактивності з B7-H3 мавп циномоглус. Ці антитіла відрізнялися від SG27, яке демонструвало низьку афінність (у BIACORE™ аналізі), слабку імуногістохімічну поведінку (слабке зв'язування) та більш низьку UDART™ активність. Ці антитіла відрізнялися від GB8, яке демонструвало низьку афінність (у BIACORE™ аналізі), слабку відмінність ІНС пухлина/нормальна тканина та більш низьку UDART™ активність.

При використанні Sakі-2 та Hs700T клітин позитивного контролю ІНС дослідження виявили, що кожне з цих антитіл демонструє відмінну оптимальну концентрацію та відмінну диференціальну концентрацію у порівнянні одне з одним (Таблиця 7).

Таблиця 7		
Антитіло	Оптимальна ІНС концентрація	Диференціальна ІНС концентрація
BRCA84D	0,625 мкг/мл	0,078 мкг/мл
BRCA68D	0,156 мкг/мл	0,0195 мкг/мл
BRCA69D	0,156 мкг/мл	0,0195 мкг/мл
PRCA157	0,078 мкг/мл	0,0195 мкг/мл
TES7	5 мкг/мл	1,25 мкг/мл
OVCA22	10 мкг/мл	2,5 мкг/мл *
GB8	1,25 мкг/мл	0,625 мкг/мл
SG27	20 мкг/мл	Не визначали**
TDH6	20 мкг/мл	Не визначали***
<p>* OVCA22 продемонструвало зв'язування тільки з sakі2 клітинами, не показало зв'язування з Hs700T клітинами. Рішення оптимізації базувалося на зв'язуванні sakі2 клітин.</p> <p>** Оскільки SG27 не показало послідовних результатів аналізу титрування між двома операторами, низьку афінність та відмінність концентрації не визначали.</p> <p>*** TDH6 дослідження не проводили з причини дуже низької афінності стосовно клітин позитивного контролю</p>		

20

При використанні оптимальної та диференціальної концентрацій, зазначених у Таблиці 7,

визначали ІНС відповіді В7-Н3 антитіл в людських тканинах. Результати цих аналізів для надниркової залози, печінки, підшлункової залози, нирки, легені та кишечника є показаними у Таблицях 8А-8В та Таблицях 9А-9В (усі антитіла демонстрували негативні ІНС відповіді для тканини серця).

5

Таблиця 8А

ІНС В7Н3 моноклональних антитіл при оптимальній концентрації у людських тканинах

Моноклональне антитіло	Надниркова залоза	Печінка	Підшлункова залоза
BRCA84D 0,625 мкг/мл	Негативн.	Синусоїдальні клітини вистилки ++ Гепатоцити +, 5-10%	Епітелій + 5% Волокна ++
BRCA68D 0,156 мкг/мл	Кора +++	Синусоїдальні клітини вистилки ++ Гепатоцити ++ (m)	Епітелій + Волокна ++
BRCA69D 0,156 мкг/мл	Кора +++	Гепатоцити ++ (m)	Епітелій + Волокна ++
TES7 5 мкг/мл	Кора +	Синусоїдальні клітини вистилки +	Епітелій + 5% Волокна ++
OVCA22 10 мкг/мл	Кора +	Синусоїдальні клітини вистилки ++ Гепатоцити + (m)	Епітелій + 5% Волокна ++
PRCA157 0,078 мкг/мл	Кора ++	Синусоїдальні клітини вистилки ++ Гепатоцити + (m)	Епітелій + 5% Волокна ++
GB8 1,25 мкг/мл	Не визначали	Синусоїдальні клітини вистилки ++ Гепатоцити + (m)	Епітелій + Волокна ++

Таблиця 8В

ІНС В7Н3 моноклональних антитіл при оптимальній концентрації у людських тканинах

Моноклональне антитіло	Нирка	Легеня	Кишечник
BRCA84D 0,625 мкг/мл	Негативн.	Епітелій + (5-10%)	Епітелій +
BRCA68D 0,156 мкг/мл	Фібробласт +, рідко	Епітелій +	Слизова оболонка ++
BRCA69D 0,156 мкг/мл	Фібробласт +, рідко	Епітелій +	Слизова оболонка +
TES7 5 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Епітелій +
OVCA22 10 мкг/мл	Фібробласт +	Негативн.	Епітелій +
PRCA157 0,078 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Слизова оболонка +
GB8 1,25 мкг/мл	Негативн.	Епітелій +	Слизова оболонка +

Таблиця 9А

ІНС В7Н3 моноклональних антитіл при диференціальній концентрації у людських тканинах

Моноклональне антитіло	Надниркова залоза	Печінка	Підшлункова залоза
BRCA84D 0,078 мкг/мл	Негативн.	Синусоїдальні клітини вистилки +	Волокна + (рідко)
BRCA68D 0,0195 мкг/мл	Кора ++	Гепатоцити + (m)	Волокна +
BRCA69D 0,0195 мкг/мл	Кора ++	Гепатоцити + (m)	Волокна +
TES7 1,25 мкг/мл	Фібробласт +	Синусоїдальні клітини вистилки +	Епітелій +, 5% Волокна ++
OVCA22 2,5 мкг/мл	Фібробласт +	Синусоїдальні клітини вистилки +	Волокна +
PRCA157 0,0195 мкг/мл	Не визначали	Синусоїдальні клітини вистилки + Гепатоцити + (m)	Волокна +
GB8 0,625 мкг/мл	Не визначали	Синусоїдальні клітини вистилки ++ Гепатоцити + (m)	Волокна +

Таблиця 9В

ІНС В7Н3 моноклональних антитіл при диференціальній концентрації у людських тканинах

Моноклональне антитіло	Нирка	Легеня	Кишечник
BRCA84D 0,078 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Епітелій +
BRCA68D 0,0195 мкг/мл	Негативн.	Фібрин + (рідко)	Слизова оболонка +
BRCA69D 0,0195 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Слизова оболонка +
TES7 1,25 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Епітелій +
OVCA22 2,5 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Епітелій +
PRCA157 0,0195 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Слизова оболонка +
GB8 0,625 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Слизова оболонка +

- 5 ІНС дослідження, які проводили при використанні шматочків раку, показали, що В7-Н3 антитіла даного винаходу можуть використовуватися для ідентифікації та діагностики раку з різних джерел тканини (Таблиця 10). У Таблиці 10 номери показують кількість позитивних симптомів (1 = +, 2 = ++, 3 = +++); кожний номер відноситься до відмінного зразка, який піддавали аналізу.

Таблиця 10

Моноклональне антитіло	мкг/мл	Рак передміхурової залози	Рак молочної залози	Рак легень	Рак кишечника
BRCA84D	0,625 мкг/мл	2, 2, 1	3, 3, 3, 3	2, 3, 2 (строма), 1 (b.v.)	2 (строма), 3, 3, 3 (строма)
	0,078 мкг/мл	0, 2, 3, 2	1 (строма), 1 (строма), 1 (строма), 2, 3	1, 1, 0, 1	2, 2(строма), 1(строма), 2(строма)
BRCA68D	0,156 мкг/мл	2, 3, 3, 3	2, 3, 3, 3, 3	3, 3, 2, 2	3, 3, 3, 3
	0,0195 мкг/мл	0, 1, 1, 1	0, 0, 2, 2, 1	0, 1, 1, 0	1, 1, 1, 1
BRCA69D	0,156 мкг/мл	3, 3, 3	3, 3, 3, 3, 3	3, 3, 2, 2 (строма)	3, 3, 3, 3
		0, 1, 2, 1	1, 2, 1, 1	1, 1, 0, 1	1 (b.v.), 2 (строма), 1, 1
GB8	1,25 мкг/мл	2, 3, 1	2, 2, 1, 2	3, 3, 0, 0	2 (строма), 2, 2, 2
	0,625 мкг/мл	0, 1, 1	0, 0, 0, 0, 1	1, 0, 0, 0	1 (строма), 1 (строма), 0, 0
TES7	5 мкг/мл	2, 3, 2, 3	1 (строма), 3, 3, 3, 2	3, 2, 1 (строма), 1 (b.v.)	3, 3, 2, 2
	1,25 мкг/мл	1, 2, 2, 3	1 (строма), 2, 3, 3, 2	3, 1, 1 (строма), 1 (b.v.)	3, 2 (строма), 2 (строма), 2
OVCA22	10 мкг/мл	3, 2, 2, 1	1 (строма), 2, 2, 3, 3	3, 2, 1 (строма), 0	1 (строма), 1, 1, 2 (строма)
	2,5 мкг/мл	1, 1, 3, 1	1 (строма), 1 (строма), 1 (строма), 3, 2, 2	2, 1, 0, 0	1, 0, 2 (строма), 0
PRCA157	0,078 мкг/мл	2, 2, 2, 3	1, 2, 2, 3, 3	2, 2, 1 (строма), 1 (b.v.)	3, 3, 2 (строма), 2 (строма)
	0,0195 мкг/мл	0, 1, 2, 1	1 (строма), 0, 2, 1 (строма)	0, 1, 0, 0	1, 1, 1 (строма), 1 (строма)

Ракові клітини передміхурової залози, молочної залози, кишечника та легень обробляли при використанні B7-H3 антитіла BRCA84D, забарвлювання пухлинних зразків було присутнім у пухлинних клітинах та стромальних клітинах, включаючи пухлинну кровеносну систему. У деяких зразках пухлини стромальне забарвлювання було набагато сильнішим, ніж у пухлинних клітинах. Коли BRCA84D моноклональне антитіло титрували до більш низької концентрації, деякі випадки показали зменшене забарвлювання у пухлинних клітинах, проте все ще підтримували сильне стромальне забарвлювання. При забарвлюванні з використанням BRCA84D при концентрації 0,625 мкг/мл клітини раку передміхурової залози демонстрували IHC 3/3+; клітини раку молочної залози демонстрували IHC 4/4+; клітини раку кишечника демонстрували IHC 4/4+ та клітини раку легень демонстрували IHC 4/4+. При забарвлюванні з використанням BRCA84D при концентрації 0,078 мкг/мл, клітини раку передміхурової залози демонстрували IHC 3/4+; клітини раку молочної залози демонстрували IHC 5/5+; клітини раку кишечника демонстрували IHC 4/4+ та клітини раку легень демонстрували IHC 3/4+.

Нормальну печінку обробляли при використанні B7-H3 антитіла BRCA68D та спостерігали забарвлювання у гепатоцитах та синусоїдальних клітинах вистилки. Нормальні підшлункові залози, забарвлені при використанні B7-H3 антитіла BRCA68D, демонстрували мультифокальне забарвлювання у колагенових волокнах та епітелії. Клітини надниркової залози, оброблені при використанні B7-H3 антитіла BRCA68D, демонстрували забарвлювання у корі. При забарвлюванні з використанням BRCA68D при концентрації 0,156 мкг/мл клітини кишечника, нирок та яєчників усі демонстрували IHC 5/5+.

Додатковий аналіз ІНС забарвлювання проводили на зразках ракової тканини кишечника, нирки та яєчника. Результати цих аналізів є представленими у Таблиці 12. У Таблиці 11 номери показують кількість позитивних симптомів (1 = +, 2 = ++, 3 = +++); кожний номер відноситься до відмінного зразка, який піддавали аналізу.

5

Таблиця 11

Моноклональне антитіло	мкг/мл	Рак кишечника	Рак нирки	Рак яєчника
BRCA84D	0,625 мкг/мл	2,1,2,2,2	1,2,1,1,1	0,3,1,2,2
	0,078 мкг/мл	1,0,0,1,0	0,1,0,1,0,1	0,2,0,1,1
BRCA68D	0,156 мкг/мл	3,2,3,3,3	3,3,2,3,3,3	2,3,3,2,2
	0,0195 мкг/мл	2,1,2,1,1	2,2,2,2,2,2	1,2,2,1,1
OVCA22	10 мкг/мл	3,1,3,1,1	3,1,2,3,0,2	2,3,2,1,1
	2,5 мкг/мл	2,0,2,1,0	2,1,1,2,0,1	1,2,1,0,1
TES7	5 мкг/мл	2,1,3,2,1	2,3,1,2,2,1	1,3,1,2,2
	1,25 мкг/мл	2,0,2,1,1	2,2,1,1,1,1	1,3,1,2,2

Підсумовуючи усе зазначене вище, можна сказати, що усі моноклональні антитіла показали різні ступені інтенсивності забарвлювання у нормальній печінці, підшлунковій залозі, кишечнику та легенях. Фігура 1А показує результати ІНС досліджень, проведених при використанні зразків тканини нормальних підшлункової залози, печінки, легень та кишечника при використанні BRCA84D при концентрації 0,625 мкг/мл та 0,078 мкг/мл. Забарвлювання печінки було відносно обмеженим у синусоїдальних клітинах вистилки (фібробласти та купферовські клітини) при використанні BRCA84D та TES7. OVCA22 показало забарвлювання мембрани гепатоцитів додатково до синусоїдальних клітин вистилки при оптимальній концентрації. Проте забарвлювання у гепатоцитах зникало при диференціальній концентрації. Усі ці моноклональні антитіла продемонстрували забарвлювання у гепатоцитах, включаючи забарвлювання або мембрани, або цитоплазми, як при оптимальній, так і при диференціальній концентраціях. Забарвлювання підшлункової залози в основному спостерігали у колагенових волокнах, та в меншій мірі для епітелію (ацинарні клітини та/або клітини вставної протоки). Забарвлювання в епітелії зменшувалося або зникало при диференціальній концентрації. Забарвлювання кишечника було відносно обмеженим в апікальній мембрані криптичного епітелію та у фібробластах слизової оболонки. Ніякого зв'язування не спостерігали у лімфатичних вузлах кишечника. Легеня показала дуже слабке та неоднорідне забарвлювання в епітелії при використанні BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D та GB8. Проте забарвлювання зникало при диференціальній концентрації. Ніякого забарвлювання не спостерігали у легенях при використанні TES7, OVCA22 та PRCA157 при обох концентраціях. Забарвлювання кори надниркових залоз спостерігали при використанні майже усіх моноклональних при оптимальній концентрації, за винятком BRCA84D. Забарвлювання у наднирковій залозі очевидним чином зменшувалося при використанні TES7 та OVCA22 при диференціальній концентрації. Серце та нирки не показали очевидного забарвлювання при використанні усіх антитіл (Фігура 1В). З огляду на ці властивості BRCA84D розглядали як найкраще з усіх моноклональних антитіл, за ним йшли (2) TES7, (3) OVCA22, (4) група BRCA68D, BRCA69D та PRCA157 та останнє (5) GB8.

Усі ці моноклональні антитіла, включені у дослідження, показали позитивне забарвлювання у 4 типах раку при оптимальній концентрації. При диференціальній концентрації BRCA84D все ще підтримувало добре забарвлювання у клітинах раку передміхурової залози, раку молочної залози та раку кишечника. TES7 продемонструвало добре забарвлювання у 4 досліджуваних типах раку. Інші моноклональні антитіла показали різні інтенсивності забарвлювання у різних типах пухлини. Забарвлювання пухлинних зразків спостерігали у пухлинних клітинах та стромальних клітинах, включаючи судинну систему. Деякі пухлинні зразки показали позитивне забарвлювання тільки у судинній системі, тобто BRCA84D, BRCA69D, TES7 та PRCA157. Деякі пухлини показали більш сильне стромальне забарвлювання, ніж забарвлювання пухлинних клітин. Коли моноклональні антитіла титрували до більш низької концентрації на цих зразках, деякі зразки показали зменшене забарвлювання або відсутність забарвлювання у пухлинних клітинах, проте все ще підтримували сильне стромальне забарвлювання. В загальному випадку, стосовно експресії у нормальних тканинах людини та диференціальної експресії в нормальних тканинах у порівнянні із пухлинними тканинами, порядок моноклональних антитіл від такого з найкращою ІНС поведінкою до такого з найгіршою поведінкою був наступним: (1) BRCA84D, (2) TES7, (3) OVCA22, (4) група BRCA68D, BRCA69D та PRCA157, та останнє (5)

GB8. Таблиця 12 та Фігура 2 показують результати для антитіла BRCA84D.

Таблиця 12

Тип ракової тканини	BRCA84D 0,625 мкг/мл	BRCA84D 0,078 мкг/мл
Передміхурова залоза	3/3+	3/4+
Молочна залоза	4/4+	5/5+
Кишечник	4/4+	4/4+
Легеня	4/4+	3/4+

Приклад 2

5 Перехресна реактивність з B7-H3 мавп циномолгус

Послідовність мавп циномолгус B7-H3 має приблизно 90% гомології з її людським аналогом, що дає змогу передбачити, що мавпи циномолгус являють собою відмінну модель для взаємодій людського B7-H3. Проводили дослідження для оцінки перехресної реактивності B7H3 кандидатів BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D, TES7, OVCA22 та PRCA157 при використанні надниркової залози, печінки, нирки, підшлункової залози та легені, а також у випадку плаценти повного строку мавпи циномолгус, для того, щоб порівняти будь-яку перехресну реактивність з інтенсивністю забарвлювання та моделями забарвлювання, які спостерігали для людських тканин.

Концентрація забарвлювання для кожного досліджуваного моноклонального антитіла є оптимальною концентрацією, яку визначали у Caki-2 та Hs700T клітинах позитивного контролю (див. Таблицю 8). Комерційне козяче анти-людське B7-H3 (перехресно реактивне з циномолгус) відбирали як антитіло позитивного контролю для забарвлювання плацентарної тканини циномолгуса. Контролі відповідного ізо типу використовували у кожному циклі експериментів. Результати цих досліджень є представленими у Таблиці 13.

Таблиця 13

Моноклона- льне антитіло	Надниркова залоза (2)	Печінка (2)	Підшлунк. залоза (2)	Нирка (2)	Легеня (2)	Плацента (1)
BRCA84D 0,625 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.	1/2 Епітелій 1+	Децидуальні клітини 2+ мезенхімальні клітин негативн.
BRCA68D 0,156 мкг/мл	Кора 3+	2/2 Гепатоцити 1+ (м) Синусоїдальн і клітини вистилки 1+	1/2 Волокна 2+ Епітелій 1+	Фібробласт 1+	Негативн.	Децидуальні клітини, ворсинки, мезенхімальні клітини 3+
BRCA69D 0.156 мкг/мл	Кора 2+	1/2 Гепатоцити 1+ (м)	1/2 Епітелій 1+	Фібробласт 1+ рідко	Негативн.	Децидуальні клітини, ворсинки 2+, мезенхімальні клітини 2+
TES7 5 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.

Продовження таблиці 13

Моноклональне антитіло	Наднироква залоза (2)	Печінка (2)	Підшлунк. залоза (2)	Нирка (2)	Легеня (2)	Плацента (1)
OVCA22 10 мкг/мл	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.
PRCA157 0.078 мкг/мл	Кора 1+	1/2 Гепатоцити 1+ (m)	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Децидуальні клітини 2+, ворсинки, мезенхімальні клітини 1+

Примітка: BRCA84D показав негативне забарвлювання у печінці та підшлунковій залозі при концентрації аж до 5 мкг/мл. Незважаючи на те, що OVCA22 не зв'язувався із тканиною циномогуса у ІНС, помірне зв'язування спостерігали з рекомбінантним B7H3 циномогуса на CHO клітинах. ІНС показник у нормальних тканинах є негативним, система балів 1+, 2+ та 3+ 4; m=мембрана; 2/2= 2 з 2 випадків, 1/2= 1 з 2 випадків

Дослідження BRCA84D (0,625 мкг/мл) ІНС забарвлювання у плаценті циномогуса продемонструвало забарвлювання у децидуальних клітинах, але не у ворсинках. Ніякого забарвлювання не спостерігали печінці та підшлунковій залозі циномогуса, проте забарвлювання синусоїдальних клітин вистилки спостерігали у людській печінці, а локалізоване забарвлювання волокон та епітелію спостерігали у тканині підшлункової залози людини.

Дослідження BRCA68D (0,156 мкг/мл) ІНС забарвлювання у плаценті циномогуса продемонструвало забарвлювання у децидуальних клітинах, мезенхімальних клітинах (ендотелій та фібробласти) та ворсинках. Забарвлювання було присутнім у мембрані гепатоцитів та цитоплазмі печінкових фібробластів, а також у волокнах підшлункової залози та у цитоплазмі епітелію підшлункової залози. Таким чином, тканина печінки та підшлункової залози людини та циномогуса демонструвала подібні моделі забарвлювання при використанні BRCA68D.

Підсумовуючи, можна сказати, що BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D та PRCA157 усі показали перехресну реактивність у тканинах циномогуса. BRCA84D не показав забарвлювання у печінці та підшлунковій залозі мавп; таке забарвлювання спостерігали у тканинах печінки та підшлункової залози людини. BRCA68D та BRCA69D показали подібну інтенсивність забарвлювання та моделі забарвлювання у тканинах мавп. Незважаючи на те, що BRCA68D, BRCA69D та PRCA157 показали порівнювану модель забарвлювання з такою для людських тканин, інтенсивність забарвлювання не є ідентичною з такою для людських тканин за оптимальних умов. TES7 та OVCA22 не показали ніякого забарвлювання у тканинах мавп за оптимальних умов.

Короткий виклад порівнюваних результатів ІНС забарвлювання у тканинах циномогуса та тканинах людини забезпечується у Таблиці 14.

Таблиця 14

Моноклональне антитіло	Надпиркова залоза	Печінка	Підшлунк. залоза	Нирка	Легеня	Плацента
BRCA84D 0,625 мкг/мл Циномогус	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Негативн.	1/2 Епітелій 1+	Децидуальні клітини 2+ мезенхімальні клітини негативн.
BRCA84D 0,625 мкг/мл Людина	Негативн.	2/2 Синусоїдальні клітини вистилки 2+, Гепатоцити 1+ 5-10%	Епітелій 1+, 5%, Волокна 2+	Негативн.	Епітелій 1+, 5-10%	Децидуальні клітини 1+, ворсинки, мезенхімальні клітини 1+

Продовження таблиці 14

Монокло- нальне антитіло	Надпир- кова залоза	Печінка	Підшлунк. залоза	Нирка	Легеня	Плацента
BRCA68D 0,156 мкг/мл Циномолгус	Кора 3+	2/2 Гепатоцити 1+ (m) Синусоїдальні клітини вистилки 1+	1/2 Волокна 2+ Епітелій 1+	Фібро- бласти 1+	Негативн.	Децидуальні клітини, ворсинки, мезенхімальні клітини 3+
BRCA68D 0,156 мкг/мл Людина	Кора 3+	Синусоїдальні клітини вистилки 2+, Гепатоцити 2+ (m)	Епітелій 1+ Волокна 2+	Фібро- бласти 1+ рідко	Епітелій 1+	Децидуальні клітини 3+, ворсинки, мезенхімальні клітини 3+
BRCA69D 0,156 мкг/мл Циномолгус	Кора 2+	1/2 Гепатоцити 1+ (m)	1/2 Епітелій 1+	Фібро- бласти 1+ рідко	Негативн.	Децидуальні клітини 2+, ворсинки, мезенхімальні клітини 2+
BRCA69D 0,156 мкг/мл Людина	Кора 3+	Гепатоцити 2+ (m)	Епітелій 1+ Волокна 2+	Фібро- бласти 1+ рідко	Епітелій 1+	Децидуальні клітини 3+, ворсинки, мезенхімальні клітини 3+
PRCA157 0,078 мкг/мл Циномолгус	Кора 1+	1/2 Гепатоцити 1+ (m)	Негативн.	Негативн.	Негативн.	Децидуальні клітини 2+, ворсинки, мезенхімальні клітини 1+
PRCA157 0,078 мкг/мл Людина	Кора 2+	Синусоїдальні клітини вистилки 2+, Гепатоцити 1+ (m)	Епітелій 1+ 5% Волокна 2+	Негативн.	Негативн.	Не визначали

Приклад 3

В7-Н3 моноклональні антитіла зв'язуються з багатьма лініями ракових клітин ATCC

- 5 Антитіла згідно з даним винаходом були виявлені як такі, що є здатними до зв'язування з багатьма лініями ракових клітин, що містяться у колекціях Американської колекції типових культур. Таблиця 15 та Таблиця 16 підсумовують результати зв'язування.

Таблиця 15

Клітинні лінії	Антитіло				
	BLA08	BRCA68D	BRCA69D	BRCA84D	PRCA157
Лінії нормальних тканин людини					
HMEC	++/+++	+++	+++	++	
HUVEC	ND	++	+/+++	+/-	+/++
Лінії раку молочної залози людини					
BT474	+++	++	++/+++	+/++	++/+++
MCF7	+++	++	++/+++	+	++
MDA175	ND				
MDA361	ND	++		+/+/-	++
SKBR3	+++		++		

Продовження таблиці 15

Клітинні лінії	Антитіло				
	BLA08	BRCA68D	BRCA69D	BRCA84D	PRCA157
Лінії раку легень людини					
A549	+++	+/-	+/-		+/-
Calu3	+++	+/+	+		+/+
SKMES1	+++	++	+/+++	+/+	++
Лінії раку яєчника людини					
ES-2	+++	+/-			
SKOV3	+++	++	+/+	+/+-	++
Лінії раку підшлункової залози людини					
Підшл. зал.-1	+/+++	+/+	+/+	+/+-	+/+
AsPC-1	+++				
HPAFII	+++				
Hs700T	+++	+/+++		+++	+++
Лінії раку кишечника людини					
Colo205	ND				
HT-29	+++	+	+		+
SW480	+++	+/-		+/-	
SW948	ND	+	+		
Лінії раку нирки людини					
293	+++	++	++	+	+/+++
786-0	+++	++	++	+	+/+++
A498	+++	++	++	++	+/+++
Caki2	+++	+++	+++	++	+/+++
Не-людські лінії клітин					
Cos7	+++	+	+/+	+/-	+/+
RL65	-				
SVT2	ND				
Лінії раку передміхурової залози людини					
22Rv1	+++				
DU145	+++	+	+	+	+/+-
LNCaP	+++	++	++	+/+	+/+++
PC3	+++	+/+-	+/-	+/-	+/-
TDH	ND	+/+-	+/+-		+
Лінії раку шлунку людини					
HS746T	ND	+/+	+/+	+	++
N87	ND	+/+	+/+	+/-	+/+

Таблиця 16

Лінії клітин	Антитіло				
	TDH06	OVCA22	GB8	SG27	TES7
Лінії нормальних тканин людини					
HMEC					
HUVEC	+/+-		+/-	+/-	
Лінії раку молочної залози людини					
BT474	+/+	+	++	+/+	+/+
MCF7	+	+	++	+/+-	+
MDA175		++			
MDA361	+/+-				+
SKBR3		++			

Лінії клітин	Антитіло				
	TDH06	OVCA22	GB8	SG27	TES7
Лінії раку легень людини					
A549					
Calu3			+		
SKMES1	+/++	+/-	+/++	+	+
Лінії раку яєчника людини					
ES-2					
SKOV3	+				+/+/-
Лінії раку підшлункової залози людини					
Підшл. зал.-1	+/+/-		+	+/-	+/+/-
AsPC-1					
HPAFII		+			
Hs700T	+	+++	+++	+	+++
Лінії раку кишечника людини					
Colo205		+			
HT-29	+	+/+/-			+/+/-
SW480	+/-	+++			
SW948	+/-	+			
Лінії раку нирки людини					
293	+/+/-		+	+/+/-	+
786-0	+		+	+/-	+
A498	+		+/++		+/++
Caki2	++	+	+++	+/++	++
Не-людські лінії клітин					
Cos7	+		+/+/- *	+/-	
RL65					
SVT2					
Лінії раку передміхурової залози людини					
22Rv1		+			
DU145	+/-	+			
LNCaP	+/+/-	+	+	+/+/-	+
PC3					
TDH		+++	+/-		+/-
Лінії раку шлунку людини					
HS746T	+		+/+/-	+/-	+/-
N87		+/+/-	+/-		

Приклад 4

Перенацілене знищення при використанні B7-H3 моноклональних антитіл

- 5 Антитіла згідно з даним винаходом зв'язуються з B7-H3, що є присутнім на ракових клітинах. При використанні традиційних способів такі антитіла можуть бути мічені флуоресцеїном так, як описано вище. Коли такі мічені молекули піддають інкубації у присутності UDART™ молекул, які мають епітопзв'язувальний домен, що зв'язується з рецептором T-клітин, та епітопзв'язувальний домен, що зв'язується з флуоресцеїном ("TCR-UDART™"), вони можуть
- 10 зв'язуватися з DART™ молекулами та, таким чином, локалізувати їх на поверхні клітин, що експресують B7-H3, та викликати перенацілене знищення.

А. Перенацілене знищення A498 клітин ренальної карциноми

- Для демонстрації такого перенаціленого знищення мічені флуоресцеїном B7-H3 антитіла
- 15 піддавали інкубації з TCR-UDART™ молекулами, та оцінювали здатність молекул опосередковувати цитотоксичність A498 клітин ренальної карциноми (Таблиця 17). На основі отриманих результатів пріоритетні кандидати були наступними: RECA13, BRCA68D, BRCA69D та TDH6.

Таблиця 17

Перенацілене знищення A498 клітин ренальної карциноми

Моноклональне антитіло	Без UDART™	При використанні TCR-UDART™	FACS
	Середнє значення	Середнє значення	MFI
BCCA66	-1,04	46,39	43,30
BLA8	1,35	49,19	50
BRCA165	0	5,11	5,46
BRCA52	0	55,53	41,7
BRCA68D	0	36,89	83,7
BRCA69D	0	54,71	84,1
BRCA84D	0	72,40	30,6
GB8	4,00	42,00	17,9
KID1	0,38	52,08	18,5
KID13	26,39	58,20	
KID35	-1,68	7,62	
LUCA1	9,85	52,73	52,9
OVCA21	-0,85	47,59	6,04
OVCA22	0,36	38,66	53,9
OVCA25	-2,86	16,70	
PA40	-0,46	40,54	
PRCA123	0	56	130
PRCA135	0	55	127
PRCA157	0	39,14	58,8
RECA13	0	38,62	39,8
RECA22	-0,24	51,74	99,90
RECA9	0	62	50,1
SAL3	4,94	52,23	60,5
SG24	-2,25	42,00	
SG27	-3,98	0,21	
SKIN2	3,11	56,44	45,8
STO5	2,91	37,84	36,7
TDH36	-1,03	53,52	155,00
TDH37	0,05	65,21	47,50
TDH4	5,09	50,63	45,9
TDH40	-0,65	44,55	
TDH5	2,92	49,60	28,8
TDH6	0	70,10	19,5
TES7	6,23	52,89	17,5

Клітини A498 ренальної карциноми інкубували з різними концентраціями моноклональних антитіл, реактивних проти B7-H3, для того, щоб визначити залежне від дози перенацілене знищення, опосередковане антитілами. Результати експериментів (Фігури 3A-3B) показують, що перенацілене знищення було залежним від дози.

В. Перенацілене знищення A549 клітин раку легень

Для додаткової демонстрації такого перенаціленого знищення мічені флуоресцеїном B7-H3 антитіла інкубували з описаними вище TCR-UDART™ молекулами або з UDART™ молекулами, які мають епітопзв'язувальний домен, що зв'язується з CD16, та епітопзв'язувальний домен, що зв'язується з флуоресцеїном ("CD16-UDART™"), та оцінювали здатність молекул опосередковувати цитотоксичність A549 клітин раку легень (Таблиця 18). Результати експериментів (Фігури 3C-3D) показують, що перенацілене знищення було залежним від дози. На основі отриманих результатів пріоритетні кандидати були наступними: BLA8, BRCA68D, BRCA69D та BRCA84D.

Таблиця 18

Перенацілене знищення A549 клітин раку легень

Моноклональне антитіло	Без DART™	При використанні TCR-UDART™	При використанні CD16-UDART™	FACS
	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	MFI
BCCA66	1,89	25,17	8,22	36,1
BLA8	-7,70	10,97	3,68	34,7
BRCA52	0	27,63		37
BRCA68D	-4,42	13,45	15,95	58,3
BRCA69D	0	24,25		60,5
BRCA84D	0	15,33		25
GB8	-8,68	2,44	-4,65	17
KID1	0	22,93		41
LUCA1	0	14,65		53
OVCA21	-2,43	18,90	7,22	31,5
OVCA22	0	32,90		61
PRCA123	7,68	29,88	17,31	79,4
PRCA135	-6,58	22,72	8,14	75,6
PRCA157	0,02	18,63	18,24	44,3
PSMA	-0,70	5,58	9,94	
RECA13	0,86	17,39	11,90	34,4
RECA22	3,71	20,49	19,35	74,3
RECA9	7,01	26,89	31,80	44,3
SAL3	0	31,80		67,4
SKIN2	-0,08	8,65	9,33	41,9
STO5	-10,36	9,28	1,71	54,7
TDH36	6,79	24,12	24,08	107
TDH37	6,93	22,57	23,37	42,3
TDH4	-6,26	10,07	2,21	32,4
TDH40	4,87	22,01	24,90	53,3
TDH5	-5,08	9,35	-2,85	27,1
TDH6	0	19,09		21,3
TES7	0	19,35		15,7

С. Перенацілене знищення LNсар клітин раку передміхурової залози

- Для додаткової демонстрації такого перенаціленого знищення мічені флуоресцеїном B7-H3 антитіла інкубували з описаними вище TCR-UDART™ молекулами або з UDART™ молекулами, які мають епітопзв'язувальний домен, що зв'язується з CD16, та епітопзв'язувальний домен, що зв'язується з флуоресцеїном ("CD16-UDART™"), та оцінювали здатність молекул опосередковувати цитотоксичність LNсар A549 клітин раку передміхурової залози (Таблиця 19). На основі отриманих результатів пріоритетні кандидати були наступними: BRCA68D, BRCA69D, BRCA84D та PRCA157.

Таблиця 19

Перенацілене знищення LNsар клітин раку передміхурової залози

Моноклональне антитіло	Без DART™	При використанні TCR-UDART™	При використанні CD16-UDART™	FACS
	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	MFI
BCCA4	-2,96	13,29	2,47	5,1
BCCA66	-2,13	13,42	16,40	41
BLA8	4,32	14,97	24,00	48,4
BRCA165	3,59	57,26	12,02	7,6
BRCA183D	-4,65	43,09	35,30	7,6
BRCA52	32,34	71,23	48,28	42,5
BRCA68D	-1,40	23,00	21,91	86,9
BRCA69D	40,08	78,02	60,55	92,4
BRCA84D	20,11	78,70	41,27	16,4
GB8	-6,25	14,04	10,76	22
KID1	54,65	91,87	67,86	44,8
KID13	15,86	69,21	47,85	
KID133	27,51	45,65	47,12	120
KID24	-4,26	34,13	41,17	14,5
KID35	14,17	64,01	33,05	
KID47	11,34	39,49	15,02	10,8
KID8	16,98	58,80	34,77	5,5
LUCA1	47,40	89,31	67,15	73
LUCA17	23,18	26,90	35,87	11,1
LUCAT1	8,25	22,36	21,49	6,9
LUCAT7	26,50	38,29	44,77	8,7
MCL12	26,62	35,59	46,38	17,6
MEL2	6,57	29,90	31,40	19
OVCA21	12,07	26,81	31,30	41
OVCA22	45,09	96,50	77,30	113
OVCA25	16,14	63,26	32,39	
PA22	1,73	57,70	9,89	8,9
PA33	8,99	34,49	48,14	9,4
PA40	38,42	73,07	63,65	
PRCA123	9,96	14,39	18,38	125
PRCA135	-3,75	8,89	13,64	123
PRCA157	1,05	17,07	15,43	16,4
PSMA	11,52	31,38	34,79	
PSMA	52,82	71,19	66,04	
RECA13	5,86	22,55	15,40	37
RECA22	7,33	24,65	23,54	22,5
RECA9	27,67	52,54	45,14	5,3
SAL1	2,76	17,87	44,52	6,5
SAL2	8,71	30,68	29,17	14,5
SAL3	43,79	92,60	76,46	105
SG24	12,64	66,82	44,99	
SG27	1,37	55,30	16,96	
SKIN2	-2,04	14,81	24,23	73,8
SPL16	9,97	29,90	23,74	5,2
STO5	-1,48	21,11	24,97	61,3
TDH28	-4,23	18,55	15,04	13,3
TDH36	3,58	19,61	19,79	199
TDH37	7,90	18,78	25,22	57,3

Продовження таблиці 19

Моноклональне антитіло	Без DART™	При використанні TCR-UDART™	При використанні CD16-UDART™	FACS
	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	MFI
TDH4	14,48	37,96	54,64	45,2
TDH40	8,51	44,55	43,87	79,3
TDH5	7,35	48,71	38,15	29,1
TDH6	4,50	54,59	19,73	41,7
TES7	50,15	94,47	73,40	22,4

Приклад 5

Здатність B7-H3 моноклональних антитіл зв'язуватися з розчинним B7H3-2Ig та розчинним B7H3-4Ig

Як обговорюється вище, B7-H3 існує як у формі, яка містить 4Ig домен (B7H3-4Ig), та у формі, яка містить 2Ig домен (B7H3-2Ig). Анти-B7-H3 антитіла згідно з даним винаходом аналізували щодо їх здатності зв'язуватися з розчинним B7H3-2Ig (Фігура 4A) та розчинним B7H3-4Ig B7-H3 (Фігура 4B). Антитіла були виявлені як такі, що демонструють широкий спектр зв'язувальних характеристик. Антитіла PRCA123, TDH5, BLA8, BRCA68D та SG24 були виявлені як такі, що демонструють найсильніше зв'язування з розчинним B7H3-2Ig, а антитіла TES7, LUCA50, BRCA165, OVCA22, STO9 та PA20 були виявлені як такі, що демонструють найслабше зв'язування з розчинним B7H3-2Ig. Антитіла PRCA123, BRCA69A, BLA8 та BRCA68D були виявлені як такі, що демонструють найсильніше зв'язування з розчинним B7H3-4Ig, а антитіла TES7, OVCA21, BRCA165 та STO9 були виявлені як такі, що демонструють найслабше зв'язування з розчинним B7H3-4Ig.

Приклад 6

Зв'язувальна афінність антигенів у розчині із імобілізованими моноклональними антитілами

Для того, щоб продемонструвати зв'язувальну афінність між антигенами у розчині та імобілізованими моноклональними антитілами, антитіла захоплювали на імобілізованих IgG Fc-специфічних Fab2 фрагментах при рівні 100-200 RU. Антигени B7-H3 та B7-H3(4Ig) вводили на захоплені антитіла при концентрації 100 нМ (швидкість введення 20 мкл/хв. протягом 120 секунд та вимірювали зв'язування. Зв'язувальні відповіді нормалізували до такого самого рівня захопленого моноклонального антитіла, та зв'язувальну відповідь на контрольне m2B6 антитіло (mIgG1) віднімали як фонове значення. Результати цього аналізу (Фігури 5A-5S; безперервні лінії; B7-H3(4Ig) 100 нМ; пунктирні лінії; B7-H3, 100 нМ)) демонструють, що антитіла згідно з даним винаходом демонструють сильне зв'язування з B7-H3(4Ig).

Приклад 7

BIACORE™ аналіз: титрування B7-H3 моноклональних антитіл до імобілізованого B7-H3

Для того, щоб продемонструвати відносні зв'язувальні афінності B7-H3-2Ig та B7-H3-4Ig для антитіл згідно з даним винаходом, здійснювали BIACORE™ аналіз. B7-H3 антитіла згідно з даним винаходом зв'язували з імобілізованим B7-H3-2Ig або з B7-H3-4Ig, та титрування зв'язування оцінювали протягом періоду часу (Фігури 6A-6I). TDH5, PRCA123, BLA8, BRCA69 були виявлені як такі, що мають високу афінність як з B7-H3-2Ig, так і з B7-H3-4Ig. Проте їх епітоп(и) був(були) виявлені як такі, що головним чином є закритими у B7-H3-4Ig молекулах, при тому, що тільки деякі є доступними. OVCA22 був виявлений таким, що має низьку афінність як стосовно B7-H3-2Ig, так і B7-H3-4Ig, при цьому їх епітопи були однаково доступними на обох молекулах. Проте є ймовірним, що тільки форма B7-H3-4Ig забезпечує достатню близькість для бівалентного зв'язування антитіла (низька швидкість дисоціації), у той час як B7-H3-2Ig може зв'язуватися тільки моновалентно. TDH6 був виявлений як такий, що має надзвичайно малу афінність у цьому форматі, при цьому зв'язування з 2Ig ймовірно є неспецифічним. TES7 та PA20 були виявлені як такі, що є B7-H4-4Ig специфічними антитілами з низькою афінністю. TES7, можливо, має швидкість асоціації та більш високу швидкість дисоціації, ніж PA20. BRCA84D були виявлені як антитіла проміжної афінності з можливістю множинних сайтів зв'язування як на B7-H3-2Ig, так і на B7-H3-4Ig. На основі BIACORE™ аналізу BRCA84D завдяки своєму незвичайному сайту зв'язування розглядається як бажане антитіло. TES7 та PA20 розглядаються як кандидати для специфічного зв'язування з поверхнями, які мають високу щільність антигену, та одні з таких, що мають високу афінність та низьку специфічність антитіла

(наприклад, BRCA69D або інше).

Фігура 7 забезпечує порівняння BIACORE™ аналізу антитіл PRCA157, BRCA69D, BLA8, PA20, BRCA84D, GB8 та SG27, що ілюструє той факт, що анти-B7-H3 антитіла згідно з даним винаходом можуть демонструвати спектр зв'язувальних властивостей.

5 Фігура 8 демонструє неконкурентну специфічність деяких з анти-B7-H3 антитіл згідно з даним винаходом. У цьому експерименті молекули людського B7-H3 інкубували у присутності антитіла BRCA84D та піддавали BIACORE™ аналізу. Приблизно через 3 хвилини до реакційної суміші додавали друге анти-B7-H3 антитіло. Якщо друге антитіло конкурує з BRCA84D, воно буде шукати закриті B7-H3 сайти та не буде мати здатності зв'язуватися. Результати свідчать про те, що антитіла BRCA68D, BRCA69D та PRCA157 не конкурують з BRCA84D за зв'язування з людським B7-H3.

Приклад 8

Анти-B7-H3 моноклональні антитіла інтерналізуються на CSC та ATCC лінії клітин

15 Вивчали здатність анти-B7-H3 антитіл згідно з даним винаходом ставати інтерналізованими при зв'язуванні з раковими клітинами. Клітини CSC передміхурової залози та клітини Hs700t підшлункової залози інкубували з анти-B7-H3 антитілом. Життєздатність клітин визначали після інкубації у присутності кон'югату сапорину та анти-мишачого вторинного антитіла, який був токсичним для клітин, якщо зв'язувався з первинним антитілом та інтерналізувався. Результати цього дослідження для клітин CSC передміхурової залози (Фігура 9A) та для клітин Hs700t підшлункової залози (Фігура 9B) демонструють здатність цих антитіл згідно з даним винаходом інтерналізуватися клітинами.

Приклад 9

Зв'язування B7-H3 моноклональних антитіл та аналіз перехресного блокування за допомогою ELISA

25 Для того, щоб використовувати перехресну реактивність антитіл згідно з даним винаходом та епітопи, які впізнаються такими антитілами, вимірювали ступінь зв'язування, що виникає у присутності конкурентного B7-H3 антитіла. Результати цього аналізу є представленими на Фігурах 10A-10F, вони показують, що BRCA68D конкурує з BRCA69D. TES7 та OVCA22 також були виявлені як такі, що конкурують одне з одним, але TES7, а не OVCA22, було виявлено як
30 таке, що також конкурує як з BRCA68D, так і з BRCA69D. GB8 було виявлено як таке, яке конкурує з SG27 за зв'язування з B7-H3-2lg, але не з B7-H3-4lg. Дані є підсумовані у Таблиці 20, вони показують принаймні чотири відмінні епітопи для B7-H3-4lg (тобто, епітоп, який впізнається SG27, епітоп, який впізнається GB8, епітоп, який впізнається OVCA22 та TES7, та епітоп, який впізнається BRCA68D, BRCA69D та TES7) та принаймні два епітопи для B7-H3-2lg (тобто, епітоп, який впізнається SG27 та GB8, та епітоп, який впізнається BRCA68D та BRCA69D).

Таблиця 20

Короткий огляд аналізу ELISA перехресного блокування B7-H3 моноклональних антитіл

Конкурент-н антитіло	Антитіло (процент зв'язування проти MIgG)							
	B7-H3 4lg					B7-H3-2lg		
	GB8	BRCA 69D	BRCA 68D	TES7	OVCA 22	GB8	BRCA 69D	BRCA 68D
GB8	50,211	119,105	108,948	87,480	98,142	26,618	84,408	94,710
TES7	111,234	109,390	108,425	1,605	16,268	100,645	90,734	99,515
OVCA22	121,783	112,322	100,813	3,371	2,048	100,423	87,991	102,766
TDH6	105,591	105,065	100,494	99,839	96,701	100,089	66,086	100,728
SG27	101,266	103,021	97,763	78,331	87,789	64,421	89,927	94,225
BRCA68D	105,934	40,284	43,144	4,815	102,655	98,888	7,635	7,425
BRCA69D	102,558	66,291	71,441	4,334	96,928	94,952	17,346	17,059
MIgG	100,000	100,000	100,00	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

40 Властивості ключових анти-B7-H3 антитіл згідно з даним винаходом є представленими у Таблиці 21. На основі показаного ними диференціального забарвлювання нормальних та ракових тканин, їх здатності до зв'язування B7-H3-4lg, а також B7-H3-2lg, їх зв'язувальних афінностей, як вимірювали при використанні описаного вище BIACORE™ аналізу, та їх здатності до зв'язування з B7H3 циномогуса, антитіла BRCA68D, BRCA69D, BRCA84D та PRCA157 були визначені як найбільш бажані антитіла.

Таблиця 21

Моноклональне антитіло	BRCA 84D	TDH 6	TES7	BRCA 68D	BRCA 69D	GB8	SG 27	OVCA 22	PRCA 157
Ізотип	G1/k	G1/k	G1/k	G1/k	G1/k	G1/k	2b/k	G1/k	G1/k
IHC	2a	2a	2a	2b	2b	2b	2b	2c	2c
ATCC група	2	1	1	3	3	3	1	3	2
Нормальна тканина									
Кишечник	1+	1+			1+		1+	2+	2+
Легеня	1+	1+		1+					
Печінка	1+	1+		2+	2+		1+	2+	2+
Нирка		1+		1+	1+		1+		
Підшлунк. залоза		1+		1+			1+	2+	
Шкіра									2+
Ракова тканина									
Кишечник	1231*	1110*	1,5	2321*	2231*		1221*	1122	2231*
Легеня	1130	1010	1,75	3332	3231		1120	3131**	3231
Передміхурова залоза	112	111	3	333	333		222	222	333
Молочна залоза	1111	1011	3	3333	3333		1122	3233	2333
Інтерналізація	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U-DART™	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Специфічність	4lg 2lg	4lg 2lg	4lg	4lg 2lg	4lg 2lg	4lg 2lg	4lg 2lg	4lg	4lg 2lg
Група епітопа	A	B	C	D	D	E	F	G	H
BIACORE™	+	+/-	+	++	++	+	+	+	+/-
Зв'язування B7-Н3 циномолгуса	++	+	-	++	++	++	+	+	++

Примітки:

*показує забарвлювання строми

** забарвлювання строми 3+

Приклад 10

Гуманізовані анти-B7-Н3 антитіла

- 5 Моноклональне антитіло BRCA84D було гуманізоване для того, щоб одержати антитіла (в загальному випадку позначаються в даній заявці як "hBRCA84D"), що пропонують поліпшену терапевтичну ефективність для людини. Послідовності варіабельного легкого ланцюга та варіабельного важкого ланцюга, а також відносні амінокислотні та полінуклеотидні послідовності одержаного гуманізованого антитіла (позначається в даній заявці як "hBRCA84D-1") забезпечуються нижче:

10 Варіабельний легкий ланцюг гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:68):

```
DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSQVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK
```

- 15 Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:69):

```
gacatccagc tgaccacagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtggggcga
cagagtgcac atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctgggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc
```

gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
 tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
 ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
 ggcaccaagc tggaaatcaa g

CDR1 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:70): KASQNVDTNVA

5 Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:71): aagccagtc agaattgtga tactaatgta gcc

CDR2 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:72): SASYRYS

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:73): tcggcatcct accggtacag t

10 CDR3 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:74): QQYNNYPFT

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:75): cagcaatata acaactatcc attcacg

15 Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:80):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
 ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARGR
 ENIYYGSRLD YWGQGTITVTV SS

20 Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:81):

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
 cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
 tgcactgggt ccgccagggt ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
 atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
 gtccaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
 actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcbc cagaggccgg
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
 cgtgaccgtg tcctct

25 CDR1 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:82): FGMH

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:83): ttggaatgcac

CDR2 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D (SEQ ID NO:84): YISSDSSAIYYADTVK

30 Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:85): tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

CDR3 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:86): GRENIYYGSRLDY

Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1 (SEQ ID NO:87): gggagggaaa acatttacta cggtagtagg ctgactac

35 Фігури 11A-11B показують вирівнювання амінокислотних залишків варіабельних легких ланцюгів (Фігура 11A) або варіабельних важких ланцюгів (Фігура 11B) BRCA84D та його гуманізованої похідної, hBRCA84D.

40 Для того, щоб одержати види hBRCA84D, які демонструють поліпшену афінність для людського B7-H3, полінуклеотиди, які кодують легкі та важкі ланцюги hBRCA84D-1 (тобто, hBRCA84D-1VL або hBRCA84D-1VH, відповідно) піддавали мутагенезу, та мутовані похідні легкого ланцюга hBRCA84D-1, зокрема, hBRCA84D-2VL, hBRCA84D-3VL, hBRCA84D-4VL, hBRCA84D-5VL та hBRCA84D-6VL, та мутовані похідні легкого ланцюга hBRCA84D-1, зокрема, hBRCA84D-2VH, hBRCA84D-3VH та hBRCA84D-4VH, ізолювали та характеризували. Амінокислотні та полінуклеотидні послідовності варіабельних легкого та важкого ланцюгів цих

антитіл є представленими нижче:
hBRCA84D-2VL (SEQ ID NO:89):

DIQLTQSPSF LSASVGDRV ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSQVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

5

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-2VL (SEQ ID NO:90):

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtggggcga
cagagtgcac atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctgggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctaata ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag ggcaccaagc
tggaataca g

10

hBRCA84D-3VL (SEQ ID NO:91):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSQVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-3VL (SEQ ID NO:92):

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtggggcga
cagagtgtcc gtcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctgggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctaata ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaataca g

15

hBRCA84D-4VL (SEQ ID NO:93):

DIQLTQSPSF LSASVGDRV ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKLLIYS
ASYRYSQVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

20

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-4VL (SEQ ID NO:94):

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtggggcga
cagagtgcac atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctgggtatca gcagaagcct ggccaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctaata ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaataca g

25

hBRCA84D-5VL (SEQ ID NO:95):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-5VL (SEQ ID NO:96):

5 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggccaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctaacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

hBRCA84D-6VL (SEQ ID NO:97):

10 DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-6VL (SEQ ID NO:98):

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccgagtacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa g

15 hBRCA84D-2VH (SEQ ID NO:99):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR ENIYYGSRLD
YWGQGTITVTV SS

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-2VH (SEQ ID NO:100):

20 gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
tgactgggt cgcacaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg ggacgaggac accgcctgtg actactgcgg cagaggccgg
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg
tcctct

hBRCA84D-3VH (SEQ ID NO:101):

25

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
 ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAMYICGRGR
 ENIYYGSRLD YWGQGT TVTV SS

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-3VH (SEQ ID NO:102):

gaggtgcagc tgggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
 cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
 tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
 atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
 gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
 actccctgcg ggacgaggac accgccatgt actactgcgc cagaggcccg
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
 5 cgtgaccgtg tcctct

hBRCA84D-4VH (SEQ ID NO:103):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
 ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRSED TAVYYCARGR
 ENIYYGSRLD YWGQGT TVTV SS

10

Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-4VH (SEQ ID NO:104):

gaggtgcagc tgggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
 cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
 tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
 atctcctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
 gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
 actccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcccg
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
 cgtgaccgtg tcctct

- 15 Таблиця 22 приводить досліджені мутації варіабельного легкого ланцюга та варіабельного важкого ланцюга hBRCA84D; числа відносяться до системи нумерації Kabat, що використовуються на Фігурах 11A та 11B.

Таблиця 22

Варіабельний легкий ланцюг						Варіабельний важкий ланцюг			
Положення за Kabat	20	21	42	46	85	Положення за Kabat	84	89	93
BRCA84D	S	V	Q	A	E	BRCA84D	S	M	G
hBRCA84D-1VL	T	I	K	L	T	hBRCA84D-1VH	D	V	A
hBRCA84D-2VL	T	I	K	A	T	hBRCA84D-2VH	D	V	G
hBRCA84D-3VL	S	V	K	L	T	hBRCA84D-3VH	D	M	G
hBRCA84D-4VL	T	I	Q	L	T	hBRCA84D-4VH	S	V	A
hBRCA84D-5VL	T	I	Q	A	T				
hBRCA84D-6VL	T	I	K	L	E				

- 20 Відносні зв'язувальні афінності похідних легкого ланцюга hBRCA84D, зокрема, hBRCA84D-3VL, hBRCA84D-4VL та hBRCA84D-5VL, для людського B7-H3 визначали шляхом формування антитіл, що містять ці варіабельні ділянки легкого ланцюга та химерний важкий ланцюг

BRCA84D-1VH (Фігура 12). BRCA84D-5VL (K42Q, L46A) було виявлено як такий, що має найвищу зв'язувальну афінність досліджуваного hBRCA84D-VL. BRCA84D-5VL, таким чином, використовувався як легкий ланцюг для дослідження відносної зв'язувальної афінності важких ланцюгів hBRCA84D, зокрема, hBRCA84D-1VH, hBRCA84D-2VH, hBRCA84D-3VH та hBRCA84D-4VH, для людського B7-H3 (Фігура 13). hBRCA84D-2VH (A93G) було виявлено як такий, що має найвищу зв'язувальну афінність досліджуваного hBRCA84D-VH.

Амінокислотні та кодуєчі полінуклеотидні послідовності химерного BRCA84D-1 є наступними:

Легкий ланцюг chBRCA84D (SEQ ID NO: 105):

```
DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GQSPKALIYS
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINNVQS EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGS
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEK
```

Полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг chBRCA84D (SEQ ID NO: 106):

```
gacattgcga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga
caggggtcagc gtcacctgca aggccagtc gaatgtggat actaatgtag
cctgggtatca acagaaacca gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg
gcacacctacc ggtacagtggt agtcacctgat cgcttcacag gcagtggtac
tgaggacagat ttactctca ccatcaacaa tgtgcagtct gaagacttgg
cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg
gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag
```

Важкий ланцюг chBRCA84D (SEQ ID NO: 107):

```
DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYICGRGR
ENIYYGSRLD YWQGTTTLTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT
QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
GK
```

Полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг chBRCA84D (SEQ ID NO: 108):

```

gatgtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggaggggtc
ccggaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agcttttgaa
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac
attagtagtg acagtagtgc catctactat gcagacacag tgaagggccg
attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc ctgcaaataga
ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg
gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactgggggc aaggcaccac
tctcacagtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg
caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc
cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac
tctactcctc cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga
caagagagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt
gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca
aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt
gggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg
tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga
ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc
cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa
ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca
ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt
ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc
atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg
ggtaaataga

```

5

Порівнювали відносні зв'язувальні афінності антитіл, які містять: (1) hBRCA84D-2VL та hBRCA84D-2VH (два досліді), (2) химерні BRCA84D, (3) антитіло, що містить hBRCA84D-5VL та химерний BRCA84D-HC, та (4) антитіло, що містить hBRCA84D-5VL та hBRCA84D-2VH. Результати є показаними на Фігурі 14.

10

Приклад 11

Гуманізовані анти-B7-H3 антитіла інгібують пухлинний ріст у ксенотрансплантатах

Для того, щоб продемонструвати здатність гуманізованих анти-B7-H3 антитіл до інгібування росту пухлини *in vivo*, ріст клітин пухлини HT-1197 карциноми сечового міхура та клітин A498 ренальної карциноми досліджували у мишачих ксенотрансплантатах. Гуманізоване антитіло hBRCA84D-2 (hBRCA84D-2 VL ланцюг / hBRCA84D-2 VH ланцюг) піддавали модифікації для включення Fc ділянки, що має заміни L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L. Fc-модифіковане hBRCA84D-2 антитіло вводили мишам (при дозі 1 мкг/кг, 10 мкг/кг або 20 мкг/кг) через 7 днів, 14 днів, 21 днів та 28 днів після імплантації ракових клітин. Результати показують, що при усіх

15

дозах, що вводяться, Fc-модифіковане hBRCA84D-2 антитіло є здатним до інгібування росту пухлинних клітин HT-1197 карциноми сечового міхура (Фігура 15) та клітин A498 ренальної карциноми (Фігура 16).

Приклад 12

5 Перенацілювальний реагент з подвійною афінністю (DART™), специфічний для B7-H3 та рецептора Т-клітин, опосередковує потужне перенацілене знищення Т-клітин

Одержували перенацілювальний реагент з подвійною афінністю (DART™), специфічний для B7-H3 та рецептора Т-клітин ("TCR"), та для групи 2D рецептора природного кілера (NKG2D). Такі DART™ мали здатність локалізувати Т-клітини, що зв'язують TCR (шляхом зв'язування таких Т-клітин з TCR-зв'язувальною частиною DART™), або локалізувати NK-клітини (шляхом зв'язування таких NK клітин з NKG2D-зв'язувальною частиною DART™), або локалізувати ракові клітини (шляхом зв'язування таких ракових клітин з B7-H3-зв'язувальною частиною DART™). Локалізовані Т-клітини або NK клітини можуть потім опосередковувати знищення ракової клітини у процесі, що називається в даній заявці "перенацілене" знищення.

15 Перенацілювальний реагент з подвійною афінністю (DART™), специфічний для B7-H3 та рецептора Т-клітин ("TCR"), конструювали, маючи варіабельні домени анти-B7-H3 hBRCA84D-2 та варіабельні домени анти-TCR:

Ланцюг DART™ TCR VL x hBRCA84D VH-2-E спіраль (SEQ ID NO: 109):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPE DFATYYCQW SSNPLTFGQG
TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSSFGMHW
VRQAPGKGLE WWAYISSDSS AIYYADTVKG RFTISRDNAL NSLYLQMNSL
RDEDTAVYYC GRGRENIYYG SRLDYWGQGT TTVTVSSGGCG GGEVAALEKE
20 VAALEKEVAA LEKEVAALEK
```

Полінуклеотид, що кодує ланцюг TCR VL x hBRCA84D VH-2-E спіраль DART™ (SEQ ID NO: 110):

```
gaaatttgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttttgt ctccagggga
aagagccacc ctctcctgca gtgccacctc aagtgttaagt tacatgcact
ggtatcagca gaaaccaggg aaagccccta agcgctggat ctatgacaca
tccaaactgg cttctgggggt cccatcaagg ttcagcggca gtggatctgg
gacagaattt actctcacia tcagcagcct gcagcctgaa gattttgcaa
cttattactg tcagcagtggt agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggaacc ggcgggcgag gcgaggtgca
gctggtcgag tctggcgagg gactgggtgca gcctggcggc tccctgagac
tgtcttgccg cgctccggc ttcaccttct ccagcttcgg catgcactgg
gtccgccagg ctccaggcaa gggactggaa tgggtggcct acatctctc
cgactcctcc gccatctact acgccgacac cgtgaagggc aggttcacca
tctcccgga caacgccaag aactcctgt acctgcagat gaactccctg
cgggacgagg acaccgccgt gtactactgc ggcagaggcc gggagaatat
ctactacggc tcccggtgg attattgggg ccagggcacc accgtgaccg
tgtcctccgg aggatgtggc ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag
gttgctgctt tggagaagga ggtcgctgca cttgaaaagg aggtcgcagc
25 cctggagaaa
```

Ланцюг hBCA84DVL-2 x TCR VH – К спіраль (SEQ ID NO: 111):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
 ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
 GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCAS GYKFTSYVMH
 WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK GRVTITADKS TSTAYLQMNS
 LRSEDYAVHY CARGSYDYD GFVYWGQGTI VTVSSGGCGG GKVAALKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE

5 Полінуклеотид, що кодує ланцюг hBCA84DVL-2 x TCR VH – К спіраль (SEQ ID NO: 112):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca
 cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
 cctggatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
 gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
 tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
 ccacctaata ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
 ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgggc gaggccaggt
 tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga
 aggtctcctg caaggccagc gggtacaagt ttaccagcta cgtgatgcac
 tgggtgagac agggccctgg acaagggctt gaggtgatcg gatataatga
 tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa ggcagagtcg
 cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacctgca gatgaacagc
 ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta
 tgattacgac gggtttggtt actggggcca agggactctg gtcactgtga
 gctccggagg atgtggcggt ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt
gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt aaggaaaagg tcgcagccct
gaaagag

10 Перенацілювальний реагент з подвійною афінністю (DART™), специфічний для B7-H3 та групи 2D рецептора природного кілера (NKG2D), конструювали, маючи варіабельні домени анти-B7-H3 hBCA84D-2 та варіабельні домени анти-TCR:

Ланцюг NKG2D VL x hBCA84D VH-2-E спіраль DART™ (SEQ ID NO: 113):

QSALTQPASV SGSPGQSITI SCSGSSSNIG NNAVNWYQQI PGKAPKLLIY
 YDDLPSGVV DRFSGSKSGT SAFLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGPV
 FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF
 GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
 MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTITVTVSS GGCGGGGEVAA
LEKEVAALEKE VAALEKEVA ALEK

15

Полінуклеотид, що кодує ланцюг NKG2D VL x hBCA84D VH-2-E спіраль DART™ (SEQ ID NO: 114):

```

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc
aatcaccatc tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg
ttaactggta ccagcagctc ccaggaaagg ctcccaaact cctcatctat
tatgatgacc tactgccctc aggggtctct gaccgattct ctggctccaa
gtctggcacc tcagccttcc tggccatcag tgggctccag tctgaggatg
aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtccagtg
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggaggcgga ccggcggcgg
aggcgaggtg cagctggctg agtctggcgg aggactgggtg cagcctggcg
gctccctgag actgtcttgc gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc
ggcatgcact ggggtccgcca ggctccaggc aagggactgg aatgggtggc
ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgccgac accgtgaagg
gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag
atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg
ccgggagaat atctactacg gctcccggct ggattatttg ggccagggca
ccaccgtgac cgtgtcctcc ggaggatgtg gcgggtggaga agtggccgca
ctggagaaaag aggttgctgc tttggagaaag gaggtcgctg cacttgaaaa
ggaggtcgca gccctggaga aa

```

Ланцюг hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH – К спіраль (SEQ ID NO: 115):

5

```

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSQVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGLVKPG GSLRLSCAAS GFTFSSYGMH
WVRQAPGKGL EWVAFIRYDG SNKYYADSVK GRFTISRDNK KNTLYLQMNS
LRAEDTAVYY CAKDRGLGDG TYFDYWGQGT TTVTVSSGGCG GGKVAALKEK
VAALKEKVAA LKEKVAALKE

```

Полінуклеотид, що кодує ланцюг hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH – К спіраль (SEQ ID NO: 116):

```

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtggggcga
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg
cctgggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgggc gagggccaggt
acagctggtg gagtctgggg gaggcctggt caagcctgga gggtccttga
gactctcctg tgcagcgtct ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac
tgggtccgcc aggctccagg caaggggctg gagtgggtgg catttatacg
gtatgatgga agtaataaat actatgcaga ctccgtgaag ggccgattca
ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc
ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgcgaaag atcgagggtt
gggggatgga acctactttg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg
tctcctccgg aggatgtggc ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa
gttgctgctt tgaagagaaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc
cctgaaagag

```

Для того, щоб продемонструвати здатність DART™ опосередковувати таке перенацілене знищення ракових клітин, описані вище hBCA84D-2 / анти-TCR DART™ ("T-DART™"), hBCA84D-2, hBCA84D-2 (Fc-модифіковані: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L), та TCR-DART™ контролю інкубували при різних концентраціях з цільовими раковими клітинами (SK-MES-1 клітинами раку легень, A498 клітинами ренальної карциноми, LNCaP клітинами раку передміхурової залози або клітинами UACC-62 меланоми) та ефекторними спочиваючими PBMC (E:T співвідношення = 30:1), та визначали цитотоксичність (LDH аналіз). Результати цих досліджень є представленими на Фігурах 17A-17D, вони демонструють здатність hBCA84D-2 / анти-TCR DART™ ("T-DART™") опосередковувати перенацілене знищення ракових клітин.

Приклад 13

Фармакокінетичний профіль у вільних від пухлин мишей

Анти-B7-H3 антитіло (Mab1) вводили самцям mCD16-/-, hCD16A_FOXN1 мишей (5 мг/кг; внутрішньовенно) та аналізували сироватку (перед введенням дози та через 2, 15, 30 хвилин, а також через 1, 2, 4, 6 годин та 1, 2, 3, 6, 8, 14, 21 та 28 днів після ін'єкції). Антитіло виявляли як таке, що має $T_{1/2}$ 10,54 днів та C_{max} 43,493 мкг/мл. Концентрацію антитіла протягом періоду часу виявляли як таку, що є двофазною, вирівнюючи її у двокомпонентну модель (Фігури 18A-18B). Прогнозовані фармакокінетичні профілі, одержані при використанні двокомпаратментної моделі з параметрами від дози 5 мг/кг, є представленими на Фігурі 18C.

Приклад 14

Здатність анти-B7-H3 антитіла до зв'язування ракових клітин HT-1197 сечового міхура та запобігання або інгібування розвитку пухлини у мишачій ксенографтній моделі

Описане вище анти-B7-H3 антитіло (Mab1) оцінювали на його здатність зв'язуватися з HT-1197, лінією клітин карциноми сечового міхура людини, що експресує B7-H3. Як показано на Фігурі 19, такі клітини демонструють більш високу експресію PRCA135, ніж HER2, та, таким чином, є, зокрема, прийнятними для оцінки терапевтичного потенціалу антитіл згідно з даним винаходом у лікуванні HT-1197 пухлин. У відповідності із цим висновком, варіанти анти-B7-H3 антитіла hBCA84D були виявлені як такі, що є здатними до зв'язування з HT-1197 клітинами. Фігура 20 показує зв'язувальну афінність Mab1 антитіл стосовно HT-1197 клітин.

Мишам (mCD16-/-, hCD16A+_{FoxN1}) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 8 x 10⁶ HT-1197 клітин. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл F12 середовища Хемса, розведеного 1:1 при використанні MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 5 при використанні доз 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг (вісім самок мишей на дозу). Цетуксимаб (анти-EGFR антитіло) вводили

контрольній групі мишей при дозах 1, 5 або 15 мг/кг (вісім самок мишей на дозу). Вісім самок мишей також піддавали ін'єкції при використанні носія або 10 мг/кг IgG контролю. Вимірювання пухлин здійснювали кожні 3-4 дні. Результати експерименту (Фігура 21А) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини сечового міхура у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Фігура 21В показує результати, одержані при використанні центимаба. Порівняння Фігур 21А та 21В демонструє, що антитіла згідно з даним винаходом є більш ефективними, ніж центимаб, у запобіганні або інгібуванні розвитку пухлин сечового міхура у мишачій ксенотрансплантатній моделі. Фігура 21С порівнює результати, одержані при максимальних проаналізованих дозах.

Приклад 15

Здатність анти-B7-H3 антитіла до зв'язування ракових клітин HT-1376 сечового міхура та запобігання або інгібування розвитку пухлини у мишачій ксенографтній моделі

Описане вище анти-B7-H3 антитіло (Mab1) оцінювали на його здатність зв'язуватися з HT-1376, лінією клітин карциноми сечового міхура людини, що експресує B7-H3. Як показано на Фігурах 22А-22В, такі клітини демонструють більш високу експресію PRCA135, ніж HER2 або PMSA, та, таким чином, є, зокрема, прийнятними для оцінки терапевтичного потенціалу антитіл згідно з даним винаходом у лікуванні HT-1376 пухлин. У відповідності із цим висновком, варіанти анти-B7-H3 антитіла hBRCA84D були виявлені як такі, що є здатними до зв'язування з клітинами HT-1376. Фігури 22А-22В показують зв'язувальну афінність Mab1 антитіл стосовно HT-1376 клітин.

Мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 5 x 10⁶ HT-1376 клітин. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл F12 середовища Хемса, розведеного 1:1 при використанні MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 4 при використанні дози 1 мг/кг. Результати експерименту (Фігура 23) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини сечового міхура у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 16

Здатність анти-B7-H3 антитіла до зв'язування ракових клітин

Анти-B7-H3 антитіло BRCA84D піддавали оцінці за допомогою FACS аналізу на його здатність зв'язувати: SW480 та SW620 клітини колоректального раку; AGS клітини раку шлунку; M-14 та LOX IMVI клітини меланому; 22rv клітини раку передміхурової залози; AsPC-1 та BxPc-3 клітини раку підшлункової залози; A498 та 786-0 клітини ренального раку. Антитіло було виявлене як таке, що є здатним до зв'язування з такими клітинами.

Приклад 17

Здатність анти-B7-H3 антитіла до запобігання або інгібування розвитку пухлини шлунку у мишачій ксенографтній моделі

Мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 5 x 10⁶ AGS клітин. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 5 при використанні доз 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Результати експерименту (Фігура 24) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини шлунку у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 18

Здатність анти-B7-H3 антитіла до зв'язування клітин раку легень та запобігання або інгібування розвитку пухлини у мишачій ксенографтній моделі

Клітини A549 раку легень інкубували у присутності hBRCA84D, chBRCA84D та hBRCA84 (0264 Fc) варіантів та визначали цитотоксичний ефект цих антитіл. Результати цього експерименту є представленими на Фігурі 25, ці результати свідчать про те, що усі три антитіла є цитотоксичними по відношенню до A549 клітин.

Мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 8 x 10⁶ A549 клітин. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 4 при використанні дози 1 мг/кг. Результати експерименту (Фігура 26) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини раку легень у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

FACS аналіз проводили на CaLu3 клітинах раку легень для того, щоб визначити, чи зв'язують такі клітини анти-B7-H3 антитіла. Експеримент підтвердив, що такі клітини експресують B7-H3 та зв'язуються з антитілами згідно з даним винаходом. Для визначення, чи будуть антитіла згідно з даним винаходом ефективними для запобігання або інгібування розвитку пухлини раку легень, мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх

бокову частину тулуба 5×10^6 CaLu3 клітин. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 4 при використанні дози 0,5, 1 або 5 мг/кг. Результати експерименту (Фігура 27) показують, що Mab1 є

здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини раку легень у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 19

Здатність анти-B7-H3 антитіла до запобігання або інгібування розвитку LOX меланоми у мишачій ксенографтній моделі

Мишам (вісім самок mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба ракові клітини LOX-IMVI меланоми та потім інокулювали внутрішньовенно Q7D x 3 при використанні PBS контролю, IgG контролю (5/мг/кг), Mab1 (0,5, 1, 5 або 10 мг/кг) або інтраперитонеально BIWx2 при використанні доксетакселу (5, 10 або 20 мг/кг). Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації. Результати експерименту (Фігури 28A-28C) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток ракової пухлини меланоми у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 20

Здатність анти-B7-H3 антитіла до запобігання або інгібування розвитку пухлини UACC-62 меланоми у мишачій ксенографтній моделі

Мишам (вісім самок mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба ракові клітини UACC-62 меланоми та потім інокулювали внутрішньовенно Q7D x 5 при використанні PBS контролю, IgG контролю (5/мг/кг) або Mab1 (0,5, 1, 5 або 10 мг/кг). Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації. Результати експерименту (Фігура 29) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток ракової пухлини меланоми у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 21

Здатність анти-B7-H3 антитіла до запобігання або інгібування розвитку 22rv пухлини передміхурової залози у мишачій ксенографтній моделі

Мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 6×10^6 22rv клітин раку передміхурової залози та потім інокулювали внутрішньовенно Q7D x 4 при використанні PBS контролю, IgG контролю (10 мг/кг), Mab1 (0,5, 1, 5 або 10 мг/кг; Q7D x 5) або трастузумабу (1, 7 або 15 мг/кг). Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації. Результати експерименту (Фігури 30A-30C) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток ракової пухлини передміхурової залози у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 22

Здатність анти-B7-H3 антитіла до зв'язування клітин ренального раку та до запобігання або інгібування розвитку пухлини у мишачій ксенографтній моделі

A498 клітини ренального раку інкубували у присутності hBRCA84D, chBRCA84D та hBRCA84 (0264 Fc) варіантів та визначали цитотоксичний ефект цих антитіл. Результати цього експерименту є представленими на Фігура 31, ці результати показують, що усі три з цих антитіл є цитотоксичними стосовно A498 клітин.

ІНС аналіз A498 ксенографтної пухлинної тканини проводили при використанні біотинільованого BRCA84D антитіла (20 мкг/мл), BRCA69D (5 мкг/мл) та анти-Her2 антитіла (20 мкг/мл). BRCA84D антитіло було виявлено як таке, що зв'язує 20-40% пухлинної тканини (від слабого до помірного: + або ++); BRCA69D було виявлено як таке, що зв'язує 80-100% пухлинної тканини (від слабого до сильного: ++ або +++). BRCA84D антитіло було виявлено як таке, що слабо зв'язує 40% UMUC-3 пухлинної тканини (+); BRCA69D було виявлено як таке, що помірно або сильно зв'язує 70% такої пухлинної тканини (++ або +++); анти-Her2 антитіло було виявлено як таке, що варіабельно зв'язує 20% такої пухлинної тканини (+ -+++). Як контролі, анти-Her2 антитіло було виявлено як таке, що зв'язує SKBR-3 клітини (+++), а також BRCA84D та BRCA69D були виявлені як такі, що є здатними до зв'язування Hs 700T-клітин (+++)

Мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 5×10^6 A498 клітин ренального раку. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 5 при використанні доз 0,1,

0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Цетуксимаб (анти-EGFR антитіло) вводили контрольній групі мишей при дозах 1, 7, або 15 мг/кг. Додатковим контрольним мишам ін'єкційно вводили носій або 10 мг/кг IgG контролю. Результати експерименту (Фігура 32) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини ренального раку у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Мишам (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) альтернативно імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 5 x 10⁶ 786-0 клітин ренального раку. Пухлинні клітини вводили у 200 мкл середовища F12 Хемса, розведеного 1:1 за допомогою MATRIGEL™. Лікування за допомогою Mab1 ініціювали протягом 7 днів після імплантації шляхом внутрішньовенного введення Q7D x 5 при використанні доз 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Цетуксимаб (анти-EGFR антитіло) вводили контрольній групі мишей при дозах 1, 7, або 15 мг/кг. Додатковим контрольним мишам ін'єкційно вводили носій або 10 мг/кг IgG контролю. Результати експерименту (Фігури 33A-33B) показують, Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини ренального раку у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Активність Mab1 порівнювали з паклітакселом, мітотичним інгібітором, який використовується у раковій хіміотерапії. Групам, що складалася з восьми самок мишей (mCD16^{-/-}, hCD16A⁺_FoxN1) імплантували підшкірно в їх бокову частину тулуба 786-0 клітини ренального раку та потім вводили Mab1 шляхом внутрішньовенного введення Q7D при дозах 0,1, 0,5, 1, 5 або 10 мг/кг. Паклітаксел вводили контрольній групі, що складалася з восьми мишей, при дозі 2,5 мг/кг у день дослідження 21, 28 та 35. Додатковим контрольним мишам (сім самок на групу) ін'єкційно вводили носій або 5 мг/кг IgG контролю. Результати експерименту (Фігура 34) показують, що Mab1 є здатним запобігати або інгібувати розвиток пухлини ренального раку у мишачій ксенотрансплантатній моделі.

Приклад 23

Токсикологічне дослідження на мавпах циномолгус

Токсикологічне дослідження на мавпах циномолгус проводили для того, щоб оцінити профіль гострої токсичності після введення однієї дози Mab1, визначення фармакокінетичного профілю Mab1, встановлення залежності часу індукції цитокінів від дози, що асоціюється з активацією ефektorної клітини, та оцінки впливу лікування при використанні лікарського засобу на рівень циркулюючих лейкоцитів (наприклад, NK та Т-клітин).

Таке дослідження може здійснюватися із залученням чотирьох груп з 6 мавп (3 самці та 3 самки) та триває 7 тижнів від початку лікування до заключної некроскопії. Група 1 буде включати контрольну групу, яка буде одержувати тільки носій протягом 1 та 2 тижнів. Чотири члени групи 1 (два самці та дві самки) забиваються на тижні 3. Члени групи 1, що залишилися, будуть отримувати додатковий носій протягом тижню 3 та будуть забиватися для некроскопії на тижні 7. Групи 2-4 являють собою експериментальні групи, які будуть одержувати носій у тиждень 1, та B7-H3 антитіло (1, 30 або 100 мг/кг, відповідно) у тиждень 2. Чотири члени кожної групи (два самці та дві самки) будуть забиватися на тижні 3. Члени кожної групи, що залишилися, будуть отримувати додатковий носій на тижні 3 та будуть забиватися для некроскопії на тижні 7.

Усі інфузії добре переносилися, та не спостерігали смертності або значних змін ваги тіла, клінічних ознак або хімії сироватки крові. Спостерігали залежне від дози зниження рівня циркулюючих NK клітин, але не циркулюючих В- та Т-клітин.

Дослідження забезпечує перевірку мавп циномолгус як релевантних токсикологічних видів. При контакті з нормальної тканиною людини антитіло BRCA84D демонструвало різну ступінь інтенсивності забарвлювання у печінці, підшлунковій залозі, кишечнику, легенях та корі надниркової залози. Забарвлювання печінки було відносно обмеженим синусоїдальними клітинами вистилки (фібробласти та купферовські клітини). Забарвлювання підшлункової залози спостерігали, головним чином, у колагенових волокнах та у незначному ступені в епітелії (ацинарні клітини та/або клітини вставної протоки). Забарвлювання кишечника було відносно обмеженим апікальною мембраною крипт епітелію та фібробластами у слизовій оболонці. Легеня показала дуже слабке та неоднорідне забарвлювання в епітелії. BRCA84D показало гарну переохресну реактивність у тканинах мавп циномолгус у порівнянні із профілем людської тканини за винятком відсутності забарвлювання у печінці та підшлунковій залозі, та можливу експресію B7-H3 у клітинах гіпофізу мавп циномолгус.

Усі публікації та патенти, що згадуються у цьому описі, є введеними у дану заявку як посилання до тієї міри, якби кожна індивідуальна публікація або патентна заявка була специфічно та індивідуально зазначена для введення як посилання у свої цілісності. У той час як винахід був описаний у зв'язку із його специфічними втіленнями, буде зрозумілим, що він є здатним до додаткових модифікацій, та ця заявка є призначеною для того, щоб охоплювати будь-які варіації, застосування або адаптації згідно з винаходом у загальній відповідності із

принципами згідно з винаходом та включаючи такі відхилення від даного розкриття, що перебувають у межах знань та звичайної практики у галузі техніки, до якої відноситься винахід, та як може застосовуватися до суттєвих ознак, які були представлені вище.

PAT-3024-ukr-seq
СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> MacroGenics, Inc.
Loo, Deryk
Huang, Ling

<120> Антитіла, реактивні по відношенню до В7-Н3, їх імунологічно активні фрагменти та їх застосування

<130> 1301.0071I

<150> US 61/311,057
<151> 2010-03-05

<150> US 61/310,695
<151> 2010-03-04

<150> US 61/310,692
<151> 2010-03-04

<160> 116

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1
<211> 316
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr

<210>	2
<211>	948
<212>	ДНК
<213>	Homo sapiens

<400>	2									
atgctgcgtc	ggcggggcag	ccctggcatg	ggtgtgcatg	tgggtgcagc	cctgggagca					60
ctgtgtttct	gcctcacagg	agccctggag	gtccagggtc	ctgaagacc	agtgggtggca					120
ctggtgggca	ccgatgccac	cctgtgctgc	tccttctccc	ctgagcctgg	cttcagcctg					180
gcacagctca	acctcatctg	gcagctgaca	gataccaaac	agctgggtgca	cagctttgct					240
gagggccagg	accagggcag	cgcctatgcc	aaccgcacgg	ccctcttccc	ggacctgctg					300
gcacagggca	acgcatccct	gaggctgcag	cgcgtgctgt	tggcggagca	gggcagcttc					360
acctgcttcg	tgagcatccg	ggatttcggc	agcgtgctcg	tcagcctgca	ggtggccgct					420
ccctactcga	agcccagcat	gaccttgagg	cccaacaagg	acctgcggcc	aggggacacg					480
gtgaccatca	cgtgctccag	ctaccggggc	taccttgagg	ctgaggtggt	ctggcaggat					540
gggcagggtg	tgcccttgac	tggcaactgt	accacgtcgc	agatggccaa	cgagcagggc					600

PAT-3024-ukr-seq

ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc	660
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag	720
cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt	780
gcactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaaga tcaaacagag ctgtgaggag	840
gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag	900
cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc	948

<210> 3
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг BRCA84D

<400> 4

gacattgcga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
gtcacctgca aggccagtc gaattgtggat actaatgtag cctggatatca acagaaacca	120
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtccctgat	180

PAT-3024-ukr-seq
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactcttca ccatcaacaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gtccggctcg 300
 gggacaaagt tggaataaaa a 321

<210> 5
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> CDR1 варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 6
 aaggccagtc agaattgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 7
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 7

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 8
 tcggcatcct accggtacag t 21

<210> 9
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>

<223> CDR3 варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 9

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 10

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного легкого ланцюга BRCA84D

<400> 10

cagcaatata acaactatcc attcacg

27

<210> 11

<211> 122

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 366

<212> ДНК

PAT-3024-ukr-seq

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний ланцюг BRCA84D

<400> 12

gatgtgcagc	tggtggagtc	tggtggagtc	ttagtgcagc	ctggagggtc	ccggaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	agctttgga	tgactgggt	tcgtcaggct	120
ccagagaagg	ggctggagtg	ggtcgcatac	attagtagtg	acagtagtgc	catctactat	180
gcagacacag	tgaaggccg	attcaccatc	tccagagaca	atcccaagaa	caccctgttc	240
ctgcaaatga	ccagtctaag	gtctgaggac	acggccatgt	attactgtgg	aagagggagg	300
gaaaacattt	actacggtag	taggcttgac	tactggggcc	aaggcaccac	tctcacagtc	360
tcctca						366

<210> 13

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 13

Phe Gly Met His

1

<210> 14

<211> 12

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 14

tttggaatgc	ac	12
------------	----	----

<210> 15

<211> 16

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 15

Tyr	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 16

<211> 48

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 16
tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag 48

<210> 17
<211> 13
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 17
Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 39
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного ланцюга BRCA84D

<400> 18
gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac 39

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

<220>
<223> Амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

<400> 19
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asp Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro

85

PAT-3024-ukr-seq
90

95

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

<210> 20
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг
BRCA69D

<400> 20
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga sagagtcacc 60
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcacgat tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagt gscagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattgacaa cctggagcaa 240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttctcccgac gttcgggtgga 300
ggcaccaaac tggaatcaa a 321

<210> 21
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 22
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного легкого
ланцюга BRCA69D

<400> 22
agggcaagtc aggacattag taattattta aac 33

<210> 23
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

<400> 23

PAT-3024-ukr-seq

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 24
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

<400> 24
tacacatcac gattacactc a 21

<210> 25
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

<400> 25
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 26
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного легкого ланцюга BRCA69D

<400> 26
caacagggtat atacgcttcc tccgacg 27

<210> 27
<211> 120
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

<400> 27
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

PAT-3024-ukr-seq

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 360
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг
BRCA69D

<400> 28
caggttcagc tccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg 60
tcctgcaagg ctcttggtca cacctttact agctactgga tgcagtgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattgggact atttatcctg gagatggtga tactaggtac 180
actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagaggg 300
attccacggc tttggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacgggtcac cgtctctcta 360

<210> 29
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

<400> 29

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5

<210> 30
<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного важкого
ланцюга BRCA69D

<400> 30

agctactgga tgcag PAT-3024-ukr-seq 15

<210> 31
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

<400> 31
 Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 32
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

<400> 32
 actatttatc ctggagatgg tgatactagg tacactcaga agttcaaggg c 51

<210> 33
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

<400> 33
 Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 34
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного важкого ланцюга BRCA69D

<400> 34
 agagggattc cacggctttg gtacttcgat gtc 33

<210> 35
 <211> 108
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга PRCA157

<400> 35

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 36

<211> 324

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний легкий ланцюг PRCA157

<400> 36

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc statctgtat ctgtgggaga aactgtcacc	60
attacatgtc gagcaagtga gagtatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag	120
ggaaaatctc ctacgctcct ggtctataat acaaaaacct taccagaggg tgtgccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct	240
gaagattttg ggagatatta ctgtcaacat cattatggta ctctccgtg gacgttcggt	300
ggaggcacca acctggaaat caaa	324

<210> 37

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 варіабельного легкого ланцюга PRCA157

<400> 37

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

PAT-3024-ukr-seq

<210> 38
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного легкого ланцюга PRCA157

<400> 38
 cgagcaagtg agagtattta cagttattta gca 33

<210> 39
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 варіабельного легкого ланцюга PRCA157

<400> 39
 Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu
 1 5

<210> 40
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного легкого ланцюга PRCA157

<400> 40
 aatacaaaaa ccttaccaga g 21

<210> 41
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 варіабельного легкого ланцюга PRCA157

<400> 41
 Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Trp
 1 5

<210> 42
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного легкого ланцюга PRCA157

PAT-3024-ukr-seq

<400> 42
caacatcatt atggtactcc tccgtgg

27

<210> 43
<211> 117
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга PRCA157

<400> 43

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

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

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

Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 351
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг PRCA157

<400> 44
gaggtgcagc aggtggagtc ggggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tcctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attaatagtg gtggaagtaa cacctactat 180
ccagacagtt tgaaggggagc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctttac 240
ctgcaaatgc gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgac 300
gggggagcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc a cgtctcctc a 351

PAT-3024-ukr-seq

<210> 45
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR1 варіабельного важкого ланцюга PRCA157

<400> 45

Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 46
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного важкого ланцюга PRCA157

<400> 46
 tcctatggca tgtct 15

<210> 47
 <211> 19
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 варіабельного важкого ланцюга PRCA157

<400> 47

Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
 1 5 10 15

Leu Lys Gly

<210> 48
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного важкого ланцюга PRCA157

<400> 48
 gtcgcaacca ttaatagtg tggaagtaac acctactatc cagacagttt gaagggg 57

<210> 49
 <211> 8
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 варіабельного важкого ланцюга PRCA157

PAT-3024-ukr-seq

<400> 49

His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 50

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного важкого ланцюга PRCA157

<400> 50

catgacgggg gagctatgga ctac

24

<210> 51

<211> 218

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 51

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160

PAT-3024-ukr-seq
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 52
<211> 8
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> амінокислотна послідовність лінкера

<400> 52

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 53
<211> 24
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> полінуклеотид, що кодує амінокислотну послідовність лінкера

<400> 53
ggaggcggat ccggaggcgg aggc

24

<210> 54
<211> 4
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> С-термінальна амінокислотна послідовність DART

<400> 54

Leu Gly Gly Cys
1

<210> 55
<211> 13
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> шарнірний домен

<400> 55

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10

PAT-3024-ukr-seq

<210> 56
 <211> 10
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Шарнірний домен

<400> 56

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 1 5 10

<210> 57
 <211> 6
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> С-термінальна амінокислотна послідовність DART

<400> 57

Val Gly Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 58
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує С-термінальну послідовність DART

<400> 58
 gttgagccca aatcttgt

18

<210> 59
 <211> 10
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність DART, що містить цистеїн

<400> 59

Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5 10

<210> 60
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує Послідовність DART, що містить цистеїн

<400> 60
 ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt

30

PAT-3024-ukr-seq

<210> 61
<211> 6
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність DART, що містить цистеїн

<400> 61

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 62
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид, що кодує DART послідовність, що містить цистеїн

<400> 62
ttcaacaggg gagagtgt

18

<210> 63
<211> 28
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Амінокислотна послідовність E-спіралі DART

<400> 63

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 64
<211> 28
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Амінокислотна послідовність K-спіралі DART

<400> 64

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 65
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>

<223> лінкер

<400> 65

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 66

<211> 383

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 66

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1 5 10 15Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
20 25 30Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
35 40 45Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
50 55 60Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
65 70 75 80Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
85 90 95Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
100 105 110Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
115 120 125Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
130 135 140Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145 150 155 160Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
165 170 175Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
180 185 190Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
195 200 205

PAT-3024-ukr-seq

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
 210 215 220

Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
 225 230 235 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val
 245 250 255

Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile
 260 265 270

Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
 275 280 285

Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
 290 295 300

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
 305 310 315 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
 325 330 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
 340 345 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
 355 360 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
 370 375 380

<210> 67
 <211> 305
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 67

Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
 20 25 30

Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp
 35 40 45

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
 50 55 60

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys

PAT-3024-ukr-seq
 65 70 75 80
 Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
 85 90 95
 Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
 100 105 110
 Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
 115 120 125
 Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
 130 135 140
 Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
 145 150 155 160
 Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
 165 170 175
 Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
 180 185 190
 Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
 195 200 205
 Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
 210 215 220
 Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
 245 250 255
 His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr
 260 265 270
 Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
 275 280 285
 Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
 290 295 300
 Pro
 305

<210> 68
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>

<223> Варіабельний легкий ланцюг гуманізованого BRCA84D-1

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69

<211> 321

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний ланцюг гуманізованого BRCA84D-1

<400> 69

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca sagagtgacc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggatatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctaact ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaatcaa g 321

<210> 70

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 70

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

PAT-3024-ukr-seq

<210> 71
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 71
aaggccagtc agaatgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 72
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 72
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 73
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 73
tcggcatcct accggtacag t 21

<210> 74
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 74
Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 75
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного легкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 75
cagcaatata acaactatcc attcacg 27

PAT-3024-ukr-seq

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<211> 122

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга гуманізованого
BRCA84D-1

<400> 80

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 81

<211> 366

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>

<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельний важкий ланцюг гуманізованого BRCA84D-1

<400> 81

```

gagggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctgggtgcagc ctggcggctc cctgagactg      60
tcttgcgccg cctccggcctt cactttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac      180
gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac      240
ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg      300
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg      360
tcctct

```

<210> 82

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 82

Phe Gly Met His

1

<210> 83

<211> 12

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR1 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 83

tttggaatgc ac 12

<210> 84

<211> 16

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 84

```

Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1           5           10           15

```

<210> 85

<211> 48

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

PAT-3024-ukr-seq
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR2 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 85
 tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag 48

<210> 86
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 86
 Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 87
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотидна послідовність, що кодує CDR3 варіабельного важкого ланцюга гуманізованого BRCA84D-1

<400> 87
 gggagggaac acatttacta cggtagtagg cttgactac 39

<210> 88

<400> 88
 000

<210> 89
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hBRCA84D-2VL

<400> 89
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

PAT-3024-ukr-seq

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

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

<210> 90
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид, що кодує hBCA84D-2VL

<400> 90
gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc 60
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120
ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180
aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240
gaggacttcg ccacctaata ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggaatacaa g 321

<210> 91
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> hBCA84D-3VL

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

PAT-3024-ukr-seq

<210> 92
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує hBCA84D-3VL

<400> 92
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgtcc 60
 gtcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggatatca gcagaagcct 120
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180
 aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240
 gaggacttcg ccacctaact ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcgccag 300
 ggcaccaagc tggaatcaa g 321

<210> 93
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hBCA84D-4VL

<400> 93
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує hBCA84D-4VL

PAT-3024-ukr-seq

<400> 94
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120
ggccaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180
aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccattctccag cctgcagcct 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 95
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> hBRCA84D-5VL

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

<210> 96
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-5VL

<400> 96
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120
ggccaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180

PAT-3024-ukr-seq
 aggtttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggaatatca g 321

<210> 97
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hBRCA84D-6VL

<400> 97

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

<210> 98
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-6VL

<400> 98
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc 60
 atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggatatca gcagaagcct 120
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180
 aggtttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240
 gaggacttcg ccgagtacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggaatatca g 321

<210> 99

PAT-3024-ukr-seq

<211> 122
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> hBRCA84D-2VH

<400> 99

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100
<211> 366
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-2VH

<400> 100

gagggtgcagc tggctcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg	60
tcttgcgccg cctccggctt caccctctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac	180
gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac	240
ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgg cagaggccgg	300
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg	360
tcctct	366

<210> 101
<211> 122
<212> Білок

<213> Штучна послідовність PAT-3024-ukr-seq
 <220>
 <223> hBRCA84D-3VH
 <400> 101
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-3VH
 <400> 102
 gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60
 tcttgcgccg cctccggctt cacttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180
 gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccatgt actactgcgg cagaggccgg 300
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360
 tcctct 366

<210> 103
 <211> 122
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

PAT-3024-ukr-seq

<220>

<223> hBRCA84D-4VH

<400> 103

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104

<211> 366

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, що кодує hBRCA84D-4VH

<400> 104

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg	60
tcttgccgcc cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctctccg actcctccgc catctactac	180
gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac	240
ctgcagatga actccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgctc cagaggccgg	300
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg	360
tcctct	366

<210> 105

<211> 214

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг chBRCA84D

PAT-3024-ukr-seq

<400> 105

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 106

<211> 645

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг chBRCA84D

<400> 106

PAT-3024-ukr-seq
gacattgcga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgat actaatgtag cctggatca acagaaacca 120
gggcaatctc cttaaagcact gatttactcg gcatactacc ggtacagtgg agtcctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaaca tgtgcagtct 240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

<210> 107
<211> 452
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг chBRCA84D

<400> 107

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

PAT-3024-ukr-seq

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

PAT-3024-ukr-seq

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 108
<211> 1359
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг chBRCA84D

<400> 108
gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttgga tgcactgggt tcgtcaggct 120
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg acagtagtgc catctactat 180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg 300
gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtctgtga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaa cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720
gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaggggca gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaggctt ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt 1200
cccgctgtgg actccgacgg ctccttctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1359

PAT-3024-ukr-seq

<210> 109
 <211> 270
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Ланцюг TCR VL x hBCA84D VH-2-E спіраль DART

<400> 109

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 130 135 140

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 165 170 175

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 180 185 190

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 195 200 205

Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly

225 230 PAT-3024-ukr-seq 235 240

Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
245 250 255

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

<210> 110
<211> 810
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид, що кодує ланцюг TCR VL x hBCRA84D VH-2-E спіраль DART

<400> 110
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaatg tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg 120
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggg cccatcaagg 180
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcaca tcagcagcct gcagcctgaa 240
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg 300
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtcgag 360
tctggcggag gactggtgca gcctggcggc tccctgagac tgtcttgcgc cgcctccggc 420
ttcaccttct ccagcttcgg catgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa gggactggaa 480
tgggtggcct acatctctc cgactcctcc gccatctact acgccgacac cgtgaagggc 540
aggttcacca tctcccggga caacgcgaag aactccctgt acctgcagat gaactccctg 600
cgggacgagg acaccgcctg gtactactgc ggcagaggcc gggagaatat ctactacggc 660
tcccggctgg attattgggg ccagggcacc accgtgaccg tgtcctccgg aggatgtggc 720
ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag gttgctgctt tggagaagga ggtcgtgca 780
cttgaaaagg aggtcgagc cctggagaaa 810

<210> 111
<211> 269
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ланцюг hBCRA84DVL-2 x TCR VH - K спіраль

<400> 111

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile

PAT-3024-ukr-seq

35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 112

<211> 807

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, що кодує ланцюг hBCA84DVL-2 x TCR VH - К спіраль

<400> 112

PAT-3024-ukr-seq
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc 60
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctgggtatca gcagaagcct 120
ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180
aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcgccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgcg gaggccaggt tcagctgggtg 360
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccttg acaaggcctt 480
gagtggatcg gatataatga tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540
ggcagagtcg cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacctgca gatgaacagc 600
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggg 720
ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780
aaggaaaagg tcgcagccct gaaagag 807

<210> 113
<211> 274
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ланцюг NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-E спіраль DART

<400> 113

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

PAT-3024-ukr-seq

115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile
 165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly
 210 215 220

Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Glu Lys

<210> 114
 <211> 822
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує ланцюг NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-E спіраль DART

<400> 114

cagtcgtccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc aatcaccatc	60
tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg ttaactggta ccagcagctc	120
ccaggaaagg ctcccaaact cctcatctat tatgatgacc tactgccctc aggggtctct	180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagccttcc tggccatcag tgggtccag	240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtccagt	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggaggcggat ccggcggcgg aggcgaggtg	360
cagctggctg agtctggcgg aggactggtg cagcctggcg gctccctgag actgtcttgc	420
gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc ggcattgcact ggggtccgcca gggtccaggc	480

PAT-3024-ukr-seq

aagggactgg aatgggtggc ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgccgac	540
accgtgaagg gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag	600
atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg ccggggagaat	660
atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtcctcc	720
ggaggatgtg gcggtggaga agtggccgca ctggagaaag aggttgctgc ttgggagaag	780
gaggtcgtg cacttgaaaa ggaggtcgca gccctggaga aa	822

<210> 115
 <211> 270
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> ланцюг hBCA84DVL-2 x NKG2D VH - К спіраль

<400> 115

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn		20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile		35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe		85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly		100	105	110
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys		115	120	125
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		130	135	140
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		145	150	155
Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala		165	170	175

PAT-3024-ukr-seq
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 180 185 190

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

<210> 116
 <211> 810
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Полінуклеотид, що кодує ланцюг hBCA84DVL-2 x NKG2D VH - к спіраль

<400> 116
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgcacc 60
 atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120
 ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180
 aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggaatatca gggaggcgga tccggcggcg gaggccagg acagctggtg 360
 gagtctgggg gaggcctggt caagcctgga gggctccctga gactctcctg tgcagcgtct 420
 ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac tgggtccgcc aggtccagg caaggggctg 480
 gagtgggtgg catttatacg gtatgatgga agtaataaat actatgcaga ctccgtgaag 540
 ggccgattca ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc 600
 ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgcgaaag atcgagggtt gggggatgga 660
 acctactttg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctccgg aggatgtggc 720
 ggtggaaaag tgcccgcaact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa ggctcgccga 780
 cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag 810

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. B7-H3 зв'язувальна молекула, де вказана молекула являє собою антитіло, його імунореактивний фрагмент або діатіло, яка включає варіабельний домен, що специфічно зв'язується із позаклітинним доменом B7-H3, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула включає:
 - 10 (1) варіабельний домен легкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23 та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25, та варіабельний домен важкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31, та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;
 - 15 (2) варіабельний домен легкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, та варіабельний домен важкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, CDR₂, що має

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; або

(3) варіабельний домен легкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39, та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41, та варіабельний домен важкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47, та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49.

2. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 1, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула зв'язується з B7-H3, що ендогенно експресується на поверхні ракової клітини.

3. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 1 або пунктом 2, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула зв'язується з B7-H3, що інтерналізується при зв'язуванні з B7-H3, який експресується на поверхні ракової клітини.

4. B7-H3 зв'язувальна молекула за будь-яким з пунктів 1-3, яка являє собою гуманізоване моноклональне антитіло.

5. B7-H3 зв'язувальна молекула за будь-яким з пунктів 1-4, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула включає варіантну Fc ділянку людського IgG1, де вказана варіантна Fc ділянка людського IgG1 включає принаймні одну амінокислотну модифікацію відносно Fc ділянки дикого типу, при цьому вказана(і) амінокислотна(і) модифікація(ї) включає(ють) амінокислотну(і) модифікацію(ї), яка(і) змінює(ють) афінність або авідність вказаної варіантної Fc ділянки для зв'язування з FcγR, так, що вказана B7-H3 зв'язувальна молекула демонструє поліпшену ефекторну функцію у порівнянні із вказаною Fc ділянкою дикого типу.

6. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 5, де вказана модифікація Fc ділянки включає:

(A) принаймні одну заміну, вибрану з групи, що складається з:

(1) F243L;

(2) D270E;

(3) R292P;

(4) S298N;

(5) Y300L;

(6) V305I;

(7) A330V; та

(8) P396L;

(B) принаймні одну заміну з двох амінокислотних залишків, при цьому вказані заміни є вибраними з групи, що складається з:

(1) F243L та P396L;

(2) F243L та R292P; та

(3) R292P та V305I;

(C) принаймні одну заміну з трьох амінокислотних залишків, при цьому вказані заміни є вибраними з групи, що складається з:

(1) F243L, R292P та Y300L;

(2) F243L, R292P та V305I;

(3) F243L, R292P та P396L; та

(4) R292P, V305I та P396L;

(D) принаймні одну заміну з чотирьох амінокислотних залишків, при цьому вказані заміни є вибраними з групи, що складається з:

(1) F243L, R292P, Y300L та P396L; та

(2) F243L, R292P, V305I та P396L;

або

(E) заміну принаймні п'яти амінокислотних залишків: F243L, R292P, Y300L, V305I та P396 L, де вказана нумерація представлена відповідно до схеми нумерації Кабат.

7. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 5, де вказана модифікація Fc ділянки включає заміни:

(A) F243L, R292P та Y300L;

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L; або

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I та P396L,

де вказана нумерація представлена відповідно до схеми нумерації Кабат.

8. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 7, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула включає:

(A) варіабельний домен легкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, та CDR₃,

що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, та варіабельний домен важкого ланцюга, що включає CDR₁, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, CDR₂, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, та CDR₃, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; та

- 5 (В) модифікацію Fc ділянки, що включає заміни: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L, де вказана нумерація представлена відповідно до схеми нумерації Кабат.
9. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 8, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула являє собою химерне антитіло.
10. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 8, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула являє собою гуманізоване антитіло.
11. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 1, де вказана молекула включає:
(А) варіабельний домен легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 89;
(В) варіабельний домен важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 99;
(С) Fc-ділянку, що має заміни: L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L,
- 15 де вказана нумерація представлена відповідно до схеми нумерації Кабат.
12. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидний ланцюг B7-H3 зв'язувальної молекули за будь-яким з пунктів 1-10.
13. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 1, де вказана B7-H3 зв'язувальна молекула представляє собою діатіло, яке включає:
(А) поліпептидний ланцюг I, що включає імуноглобуліновий VL епітопзв'язувальний домен, специфічний для зв'язування B7-H3, та VH епітопзв'язувальний домен, специфічний для зв'язування молекули, відмінної від B7-H3; та
(В) поліпептидний ланцюг II, що включає імуноглобуліновий VH епітопзв'язувальний домен, специфічний для зв'язування B7-H3, та VL епітопзв'язувальний домен, специфічний для зв'язування вказаної молекули, відмінної від B7-H3;
- 25 де вказані поліпептидні ланцюги I та II є асоційованими разом так, що утворюють функціональні епітопзв'язувальні домени, здатні до зв'язування з B7-H3 та вказаною молекулою, відмінною від B7-H3.
14. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 13, де вказана молекула, відмінна від B7-H3, являє собою гаптен.
15. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 14, де вказаний гаптен являє собою флуоресцеїн ізотіоціанат.
16. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 13, де вказана молекула, відмінна від B7-H3, являє собою рецептор Т-клітини або рецептор NKG2D.
- 35 17. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 13, де вказана молекула, відмінна від B7-H3, являє собою асоційований з пухлиною антиген.
18. B7-H3 зв'язувальна молекула за пунктом 17, де вказаний асоційований з пухлиною антиген є вибраним з групи, що складається з A33; ADAM-9; ALCAM; BAGE; бета-катеніну; CA125; карбоксипептидази М; CD103; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD36;
- 40 CD40/CD154; CD45; CD46; CD5; CD56; CD79a/CD79b; CDK4; CEA; CTLA4; цитокератину 8; EGF-R; EphA2; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2/GD3/GM2; gp100; HER-2/neu; людського папіломавірусу-E6; людського папіломавірусу-E7; інтегрину-альфа-V-бета-6; JAM-3; KID3; KID31; KSA (17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-ацетилглюкозамінілтрансферази; онкостатину М; p15; PIPA; PSA; PSMA; ROR1; sTn; рецептора TNF-β; рецептора TNF-α; TNF-γ рецептора; рецептора трансферину та VEGF рецептора.
- 45 19. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидний ланцюг B7-H3 зв'язувальної молекули за будь-яким з пунктів 13-18.
20. Фармацевтична композиція, що включає (i) терапевтично ефективну кількість B7-H3 зв'язувальної молекули за будь-яким з пунктів 1-11 або 13-18 та (ii) фармацевтично прийнятний носій.
- 50 21. Фармацевтична композиція за пунктом 20, яка додатково включає один або більше додаткових протиракових агентів.
22. Фармацевтична композиція за пунктом 21, де вказаний додатковий протираковий агент являє собою хіміотерапевтичний агент, радіаційний терапевтичний агент, гормональний
- 55 терапевтичний агент, токсин або імунотерапевтичний агент.
23. Фармацевтична композиція за пунктом 21, де вказаний додатковий протираковий агент являє собою токсин, вибраний з групи, що складається з: таксану, майтансоноїду, ауристатину, каліхеаміцину, антрацикліну, аналога CC-1065, доцетакселу, катепсину, ричину, гелоніну, екзотоксину Pseudomonas, дифтерійного токсину, РНКаз та токсичного радіоізотопу.

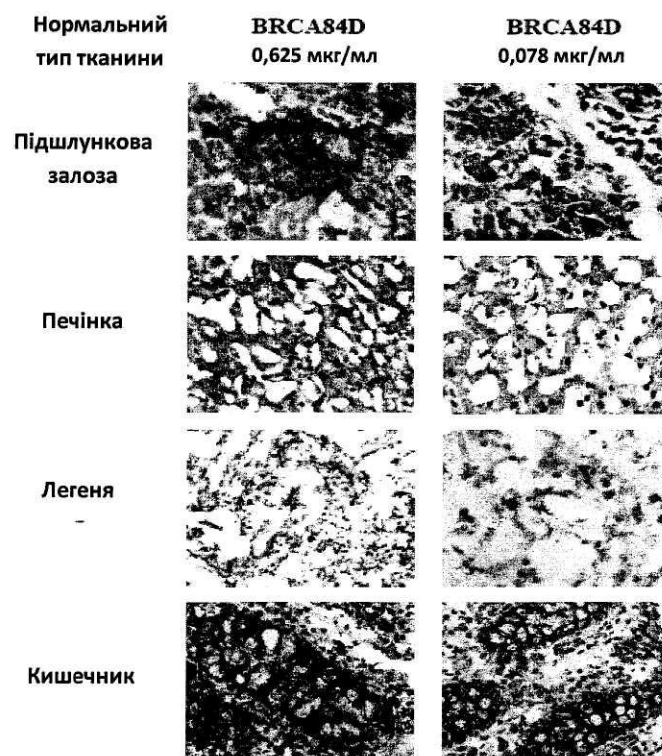
24. Застосування В7-Н3 зв'язувальної молекули за будь-яким з пунктів 1-11 або 13-18 для діагностики раку, де вказана В7-Н3 зв'язувальна молекула є міченою за допомогою здатної до визначення мітки.

25. Застосування за пунктом 24, яке **відрізняється** тим, що вказаний рак характеризується присутністю ракової клітини, вибраної з групи, що складається з клітини пухлини надниркової залози, раку, асоційованого зі СНІДом, альвеолярної саркоми м'яких тканин, астроцитарної пухлини, раку жовчного міхура, раку кісток, раку головного та спинного мозку, метастатичного раку мозку, раку молочної залози, пухлин каротидного гломуса, раку шийки матки, хондросаркоми, хордоми, хромофобної карциноми ниркових клітин, гіпернефроїдної пухлини нирки, раку кишечника, колоректального раку, шкірної доброякісної фіброзної гістіоцитомі, десмопластичної дрібнокруглоклітинної пухлини, епіндимомі, саркоми Юїнга, позаскелетної міксоїдної хондросаркоми, фіброгенного недовершеного остеогенезу, фіброзної дисплазії кісток, раку жовчного міхура або жовчної вивідної протоки, раку шлунково-кишкового тракту, гестаційного трофобластного захворювання, пухлини зародкових клітин, раку голови та шиї, карциноми печінкових клітин, пухлини острівкових клітин, саркоми Капоші, раку нирки, лейкемії, ліпоми/доброякісної ліпоматозної пухлини, ліпосаркоми/злоякісної ліпоматозної пухлини, печінкового раку, лімфоми, раку легень, медулобластоми, меланомі, менінгіомі, множинної ендокринної неоплазії, множинної мієломи, мієлодиспластичного синдрому, нейробластоми, нейроендокринних пухлин, раку яєчника, раку підшлункової залози, папілярної карциноми щитовидної залози, пухлини паращитовидної залози, педіатричного раку, пухлини капсули периферичного нерву, феохромоцитомі, пухлини гіпофіза, раку передміхурової залози, задньої ювеальної меланомі, виключного гематологічного розладу, ниркового метастатичного раку, паличковидної пухлини, рабдіоміосаркоми, саркоми, раку шкіри, саркоми м'яких тканин, раку лускатих клітин, раку шлунку, синовіальної саркоми, тестикулярної саркоми, тимусної карциноми, тимоми, метастатичного раку щитовидної залози та раку матки.

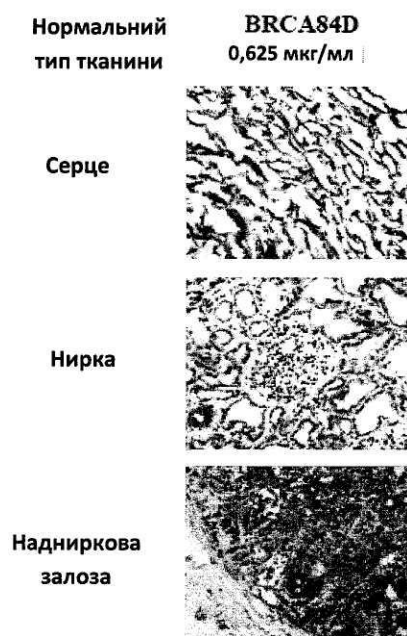
26. Застосування В7-Н3 зв'язувальної молекули за будь-яким з пунктів 1-11 або 13-18 або фармацевтичної композиції за будь-яким з пунктів 20-23 для одержання лікарського засобу для лікування раку у пацієнта.

27. Застосування В7-Н3 зв'язувальної молекули за пунктом 26, яке **відрізняється** тим, що вказаний рак характеризується присутністю ракової клітини, вибраної з групи, що складається з клітини пухлини надниркової залози, раку, асоційованого зі СНІДом, альвеолярної саркоми м'яких тканин, астроцитарної пухлини, раку жовчного міхура, раку кісток, раку головного та спинного мозку, метастатичного раку мозку, раку молочної залози, пухлин каротидного гломуса, раку шийки матки, хондросаркоми, хордоми, хромофобної карциноми ниркових клітин, гіпернефроїдної пухлини нирки, раку кишечника, колоректального раку, шкірної доброякісної фіброзної гістіоцитомі, десмопластичної дрібнокруглоклітинної пухлини, епіндимомі, саркоми Юїнга, позаскелетної міксоїдної хондросаркоми, фіброгенного недовершеного остеогенезу, фіброзної дисплазії кісток, раку жовчного міхура або жовчної вивідної протоки, раку шлунково-кишкового тракту, гестаційного трофобластного захворювання, пухлини зародкових клітин, раку голови та шиї, карциноми печінкових клітин, пухлини острівкових клітин, саркоми Капоші, раку нирки, лейкемії, ліпоми/доброякісної ліпоматозної пухлини, ліпосаркоми/злоякісної ліпоматозної пухлини, печінкового раку, лімфоми, раку легень, медулобластоми, меланомі, менінгіомі, множинної ендокринної неоплазії, множинної мієломи, мієлодиспластичного синдрому, нейробластоми, нейроендокринних пухлин, раку яєчника, раку підшлункової залози, папілярної карциноми щитовидної залози, пухлини паращитовидної залози, педіатричного раку, пухлини капсули периферичного нерву, феохромоцитомі, пухлини гіпофіза, раку передміхурової залози, задньої ювеальної меланомі, виключного гематологічного розладу, ниркового метастатичного раку, паличковидної пухлини, рабдіоміосаркоми, саркоми, раку шкіри, саркоми м'яких тканин, раку лускатих клітин, раку шлунку, синовіальної саркоми, тестикулярної саркоми, тимусної карциноми, тимоми, метастатичного раку щитовидної залози та раку матки.

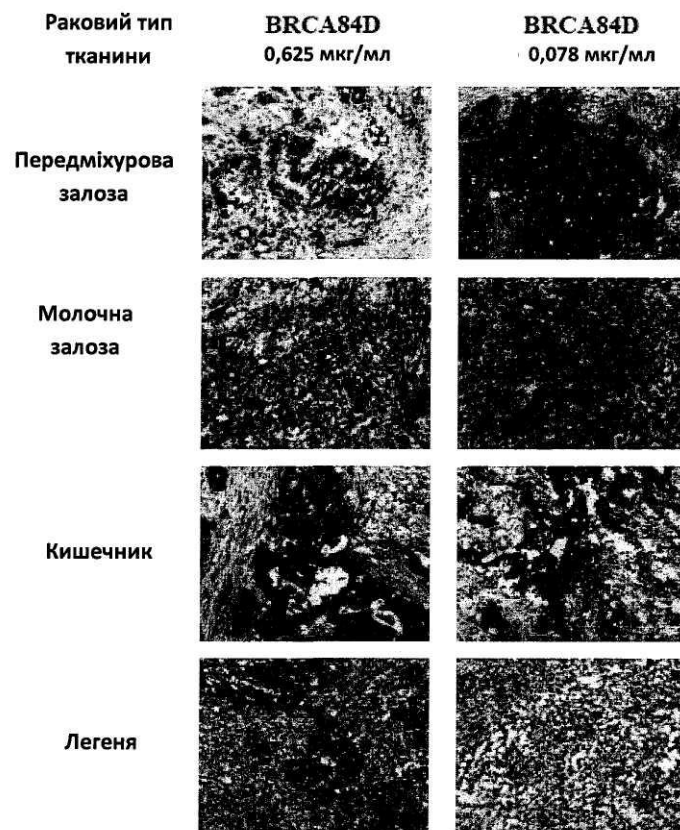
28. Застосування за пунктом 27, яке **відрізняється** тим, що застосування додатково включає введення однієї або більше додаткових протиракових терапій, вибраний з групи, що складається з хіміотерапії, імунотерапії, радіаційної терапії, гормональної терапії та хірургії.



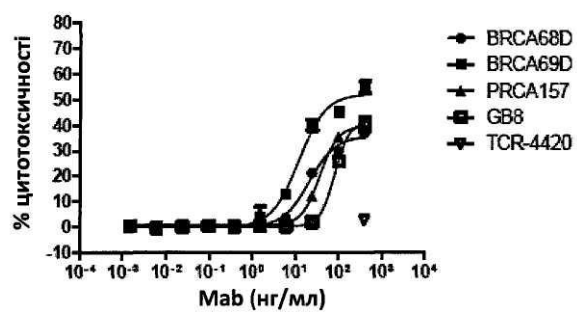
Фігура 1А



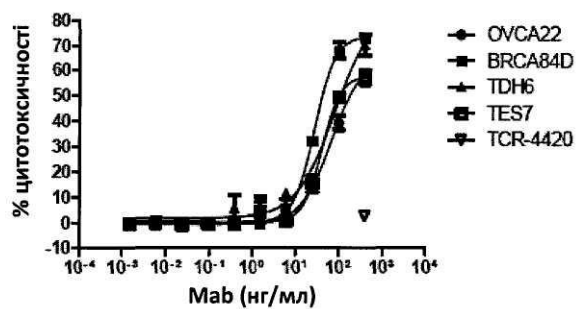
Фігура 1В



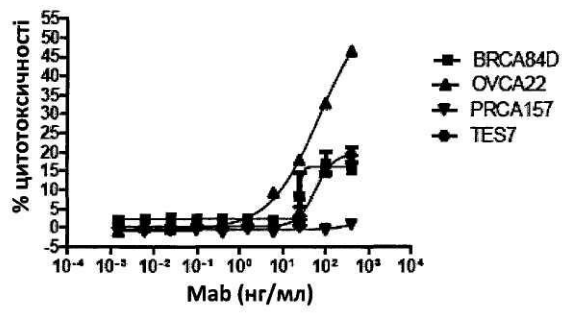
Фігура 2



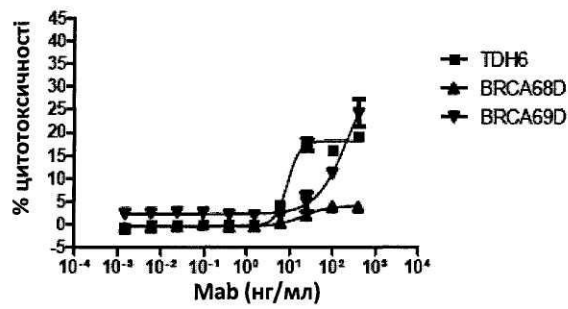
Фігура 3А



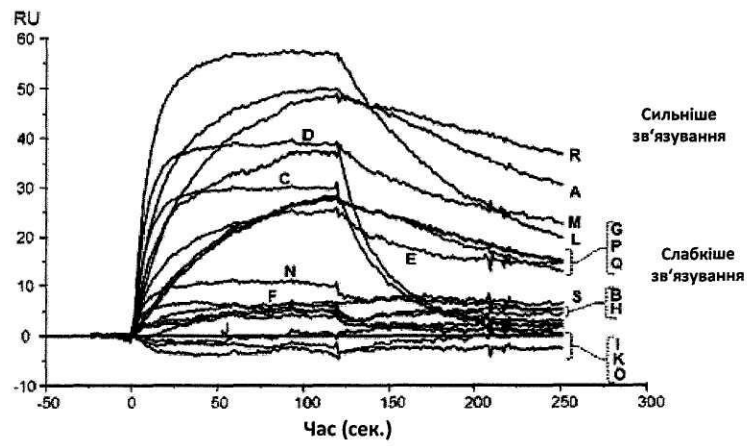
Фігура 3В



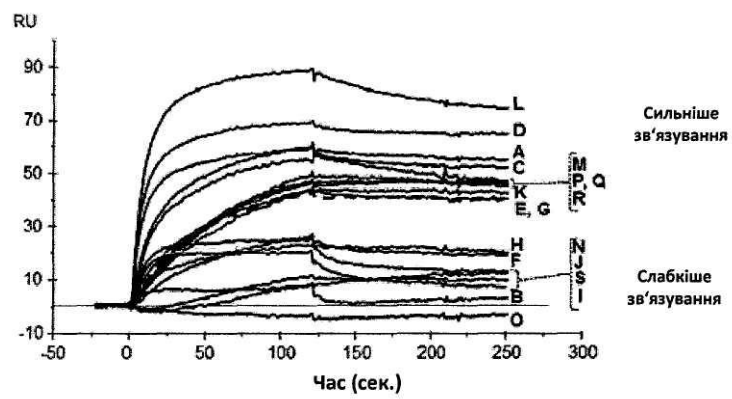
Фігура 3С



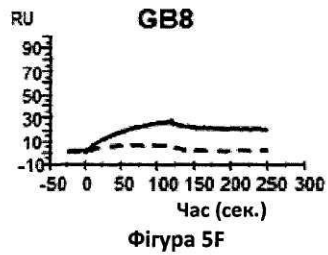
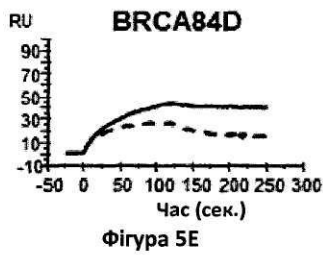
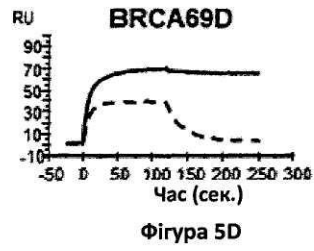
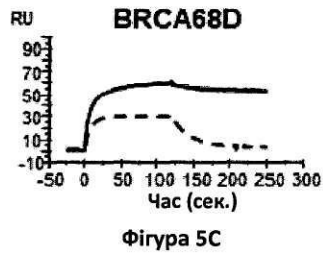
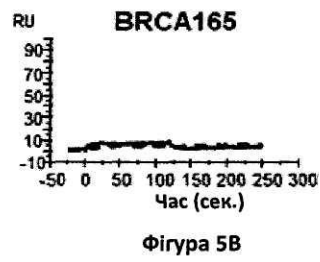
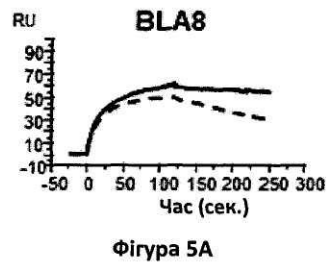
Фігура 3D

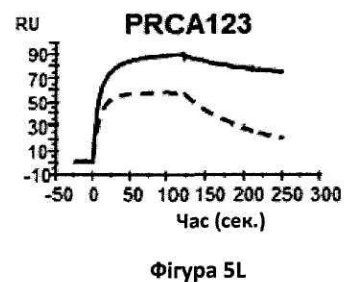
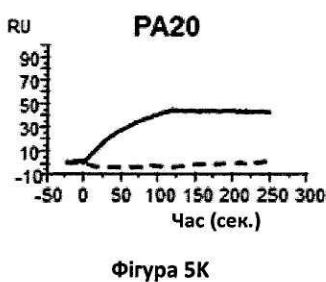
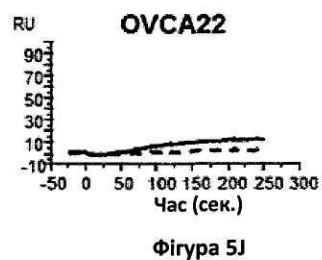
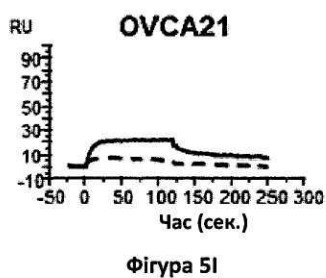
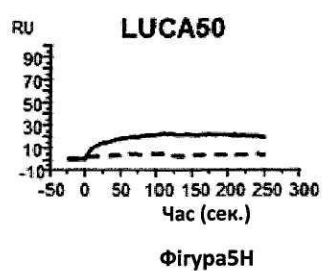
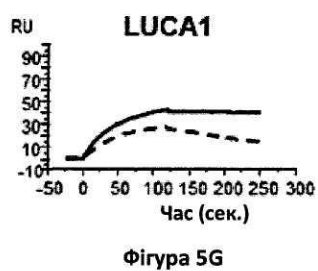


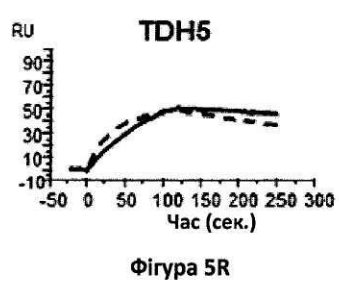
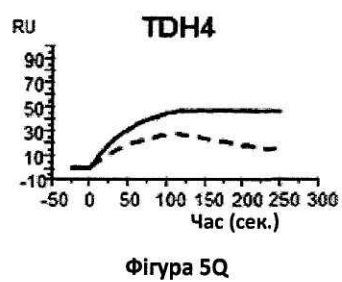
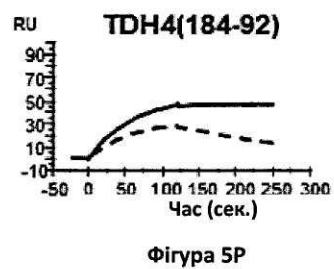
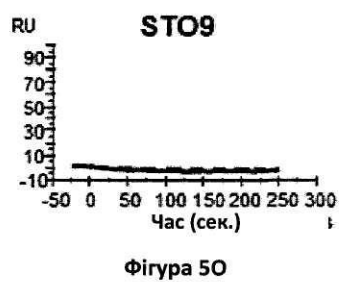
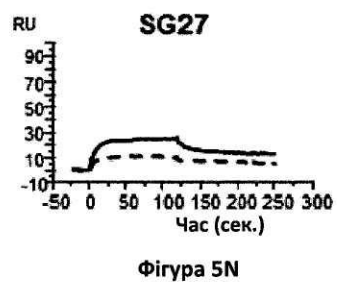
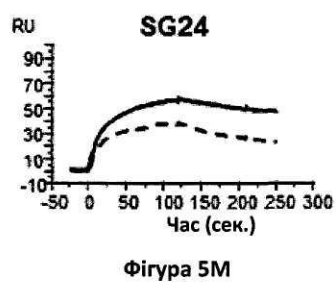
Фігура 4A

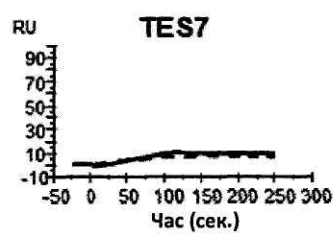


Фігура 4B

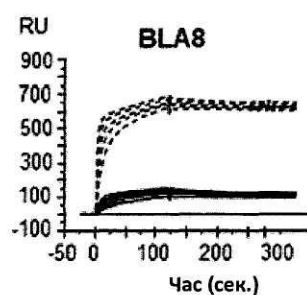




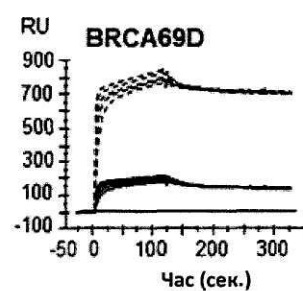




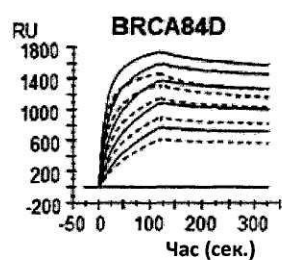
Фігура 5S



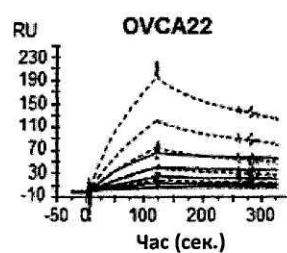
Фігура 6A



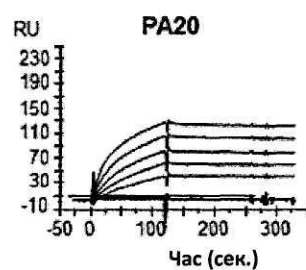
Фігура 6B



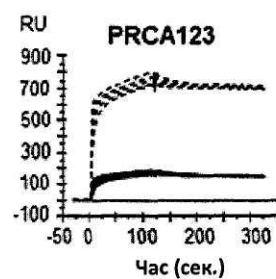
Фігура 6C



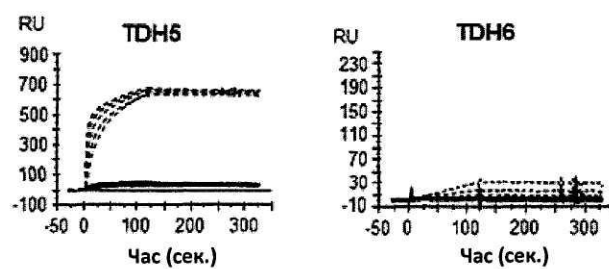
Фігура 6D



Фігура 6C

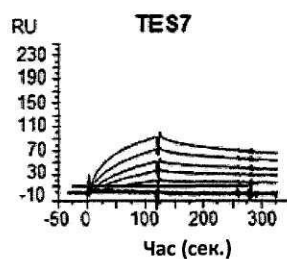


Фігура 6F

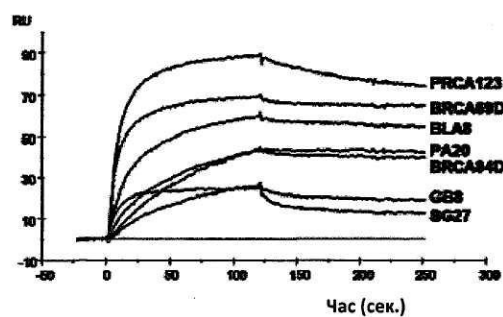


Фігура 6G

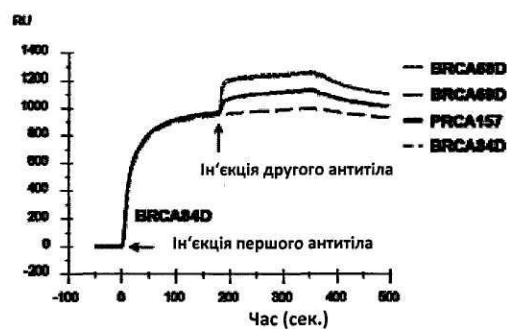
Фігура 6H



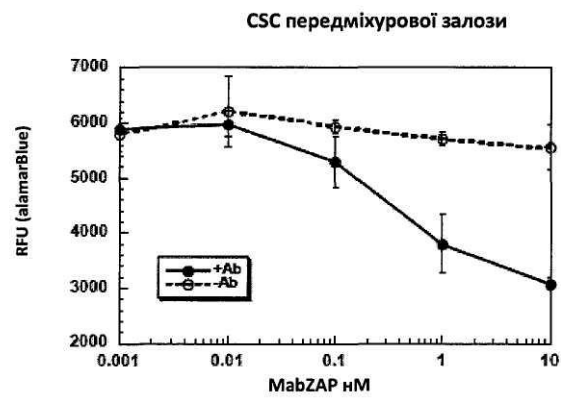
Фігура 6I



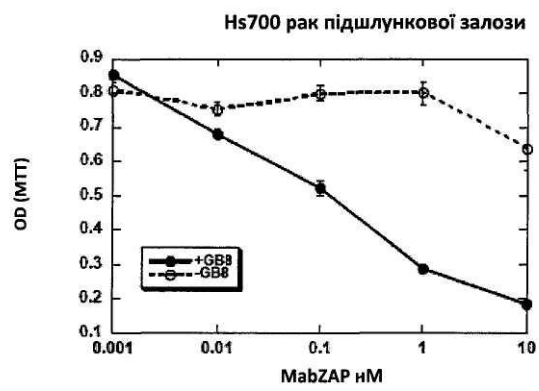
Фігура 7



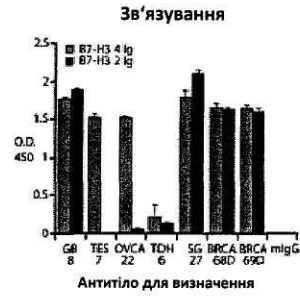
Фігура 8



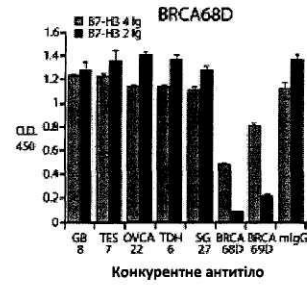
Фігура 9А



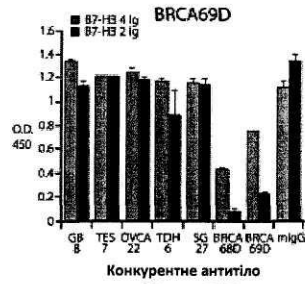
Фігура 9В



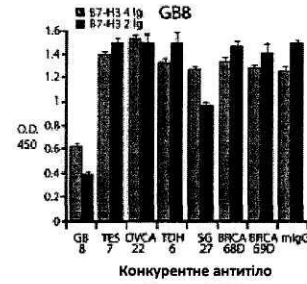
Фігура 10A



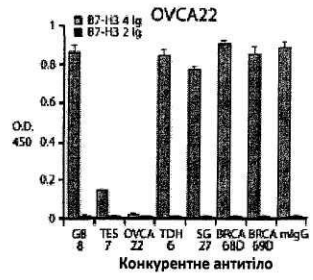
Фігура 10B



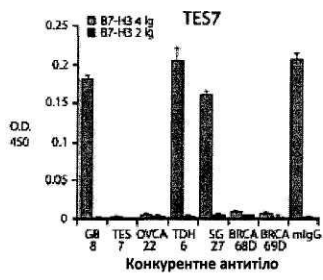
Фігура 10C



Фігура 10D



Фігура 10E



Фігура 10F

```

      10      20      30      40      50
(1) DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNV D TNVAWYQQKF GQSPKALIYS
(2) DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNV D TNVAWYQQKF GRAPKLLIYS
      60      70      80      90     100
(1) ASYRYSGVED RFTSGSGSGTD FTLTINWQS EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGS
(2) ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSTCP EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGQ

```

```

(1) GTKLEIK
(2) GTKLEIK

```

(1) Варіабельний легкий ланцюг BRCA84D (SEQ ID NO:3)

(2) Гуманізований варіабельний легкий ланцюг BRCA84D-1 (SEQ ID NO:68)

Фігура 11A

```

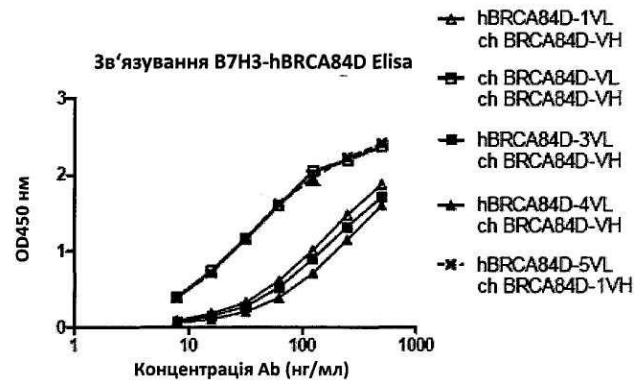
      10      20      30      40      50
(1) DVOLVESGGG LVQPGGSPKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA EEKGLEWVAY
(2) DVOLVESGGG LVQPGGSIPL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
      60      70      80      90     100
(1) ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNTLF LQMTSLRSED TAVYYCGRGR
(2) ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSIV LQMTSLRSED TAVYYCARGR
      110     120
(1) ENIYYGSRLD YWGQGTTLTV SS
(2) ENIYYGSRLD YWGQGTITVTV SS

```

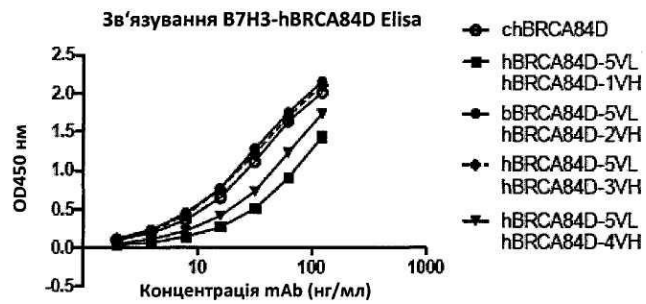
(1) Варіабельний важкий ланцюг BRCA84D (SEQ ID NO:11)

(2) Гуманізований варіабельний важкий ланцюг BRCA84D-1 (SEQ ID NO:80)

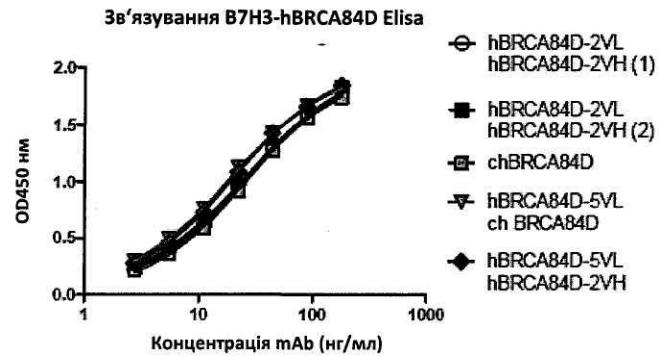
Фігура 11B



Фігура 12

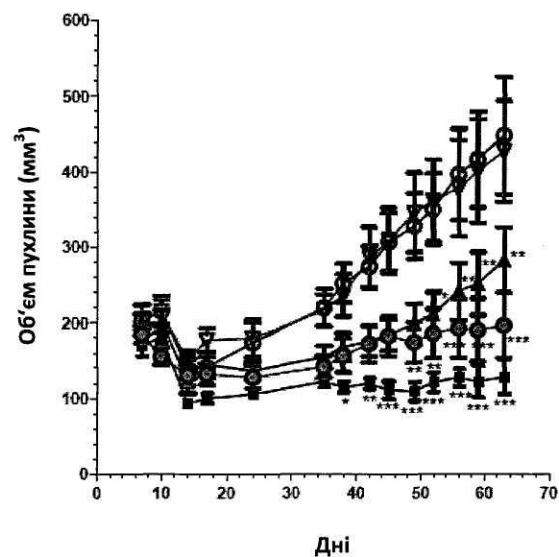


Фігура 13



Фігура 14

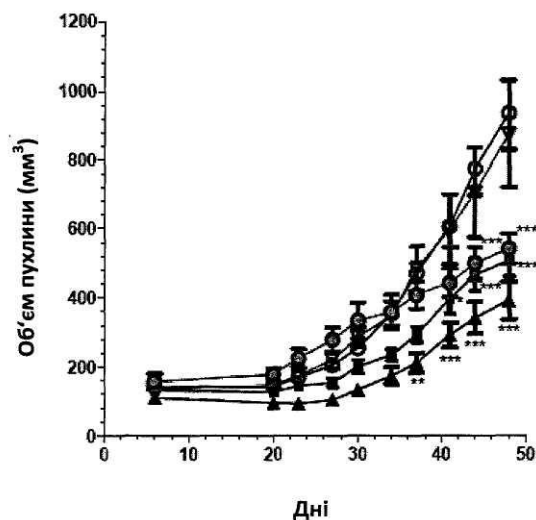
HT-1197 карцинома сечового міхура



- Носій
- ▽ IgG контроль
- ▲ hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) (1 мг/кг)
- hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) (10 мг/кг)
- hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) (20 мг/кг)

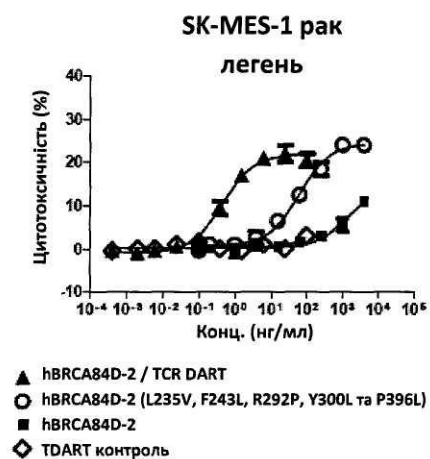
Фігура 15

A-498 карцинома ренальних клітин

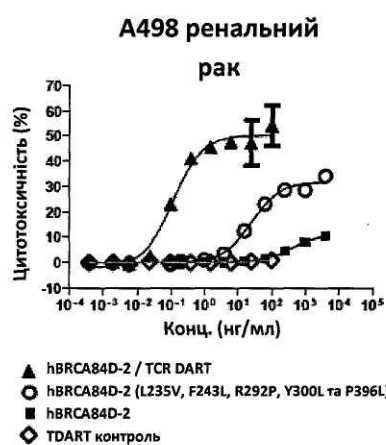


- Носій
- ▽ IgG контроль (10 мг/кг)
- ▲ hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) (1 мг/кг)
- hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) (10 мг/кг)
- hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L та P396L) (20 мг/кг)

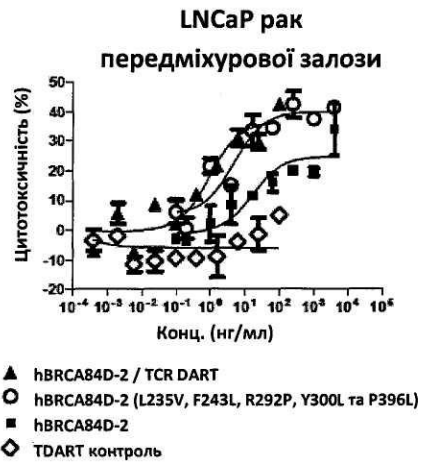
Фігура 16



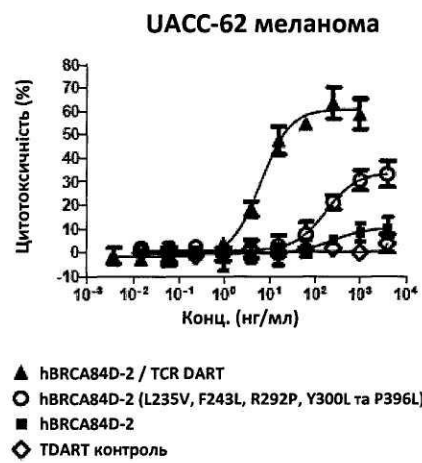
Фігура 17А



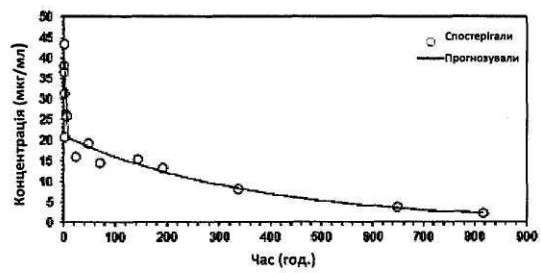
Фігура 17В



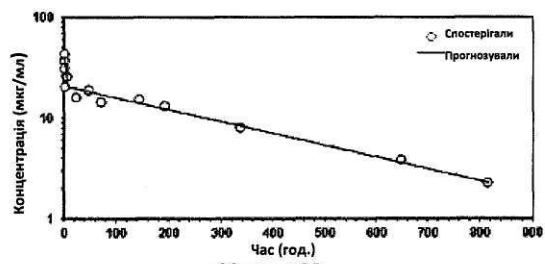
Фігура 17C



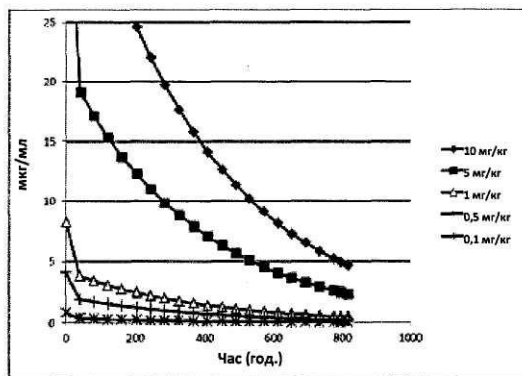
Фігура 17D



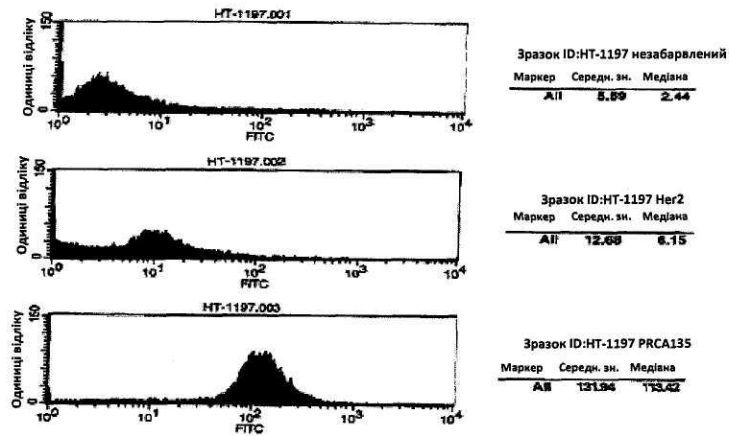
Фігура 18А



Фігура 18В

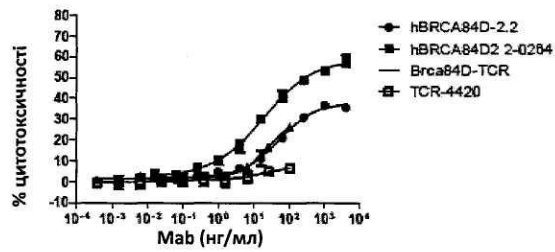


Фігура 18С

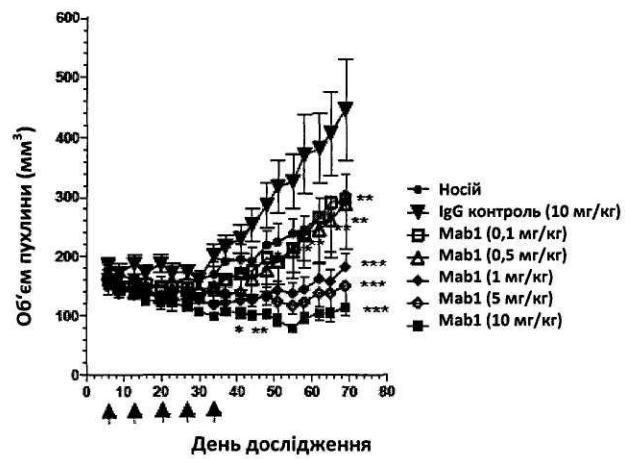


Фігура 19

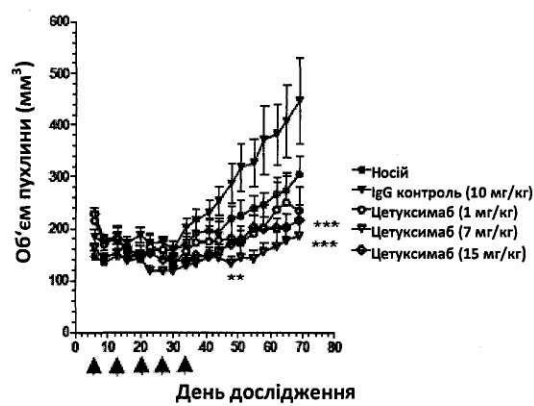
HT-1197 зі спочиваючими РВМС (LDH)
E:T = 30:1 Донор #49480



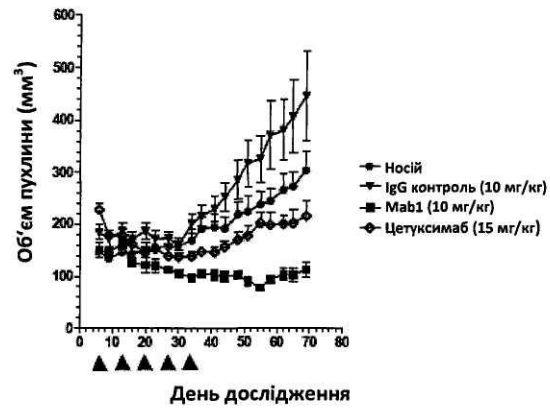
Фігура 20



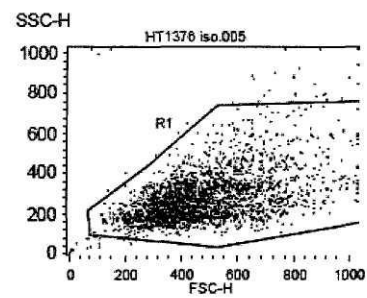
Фігура 21A



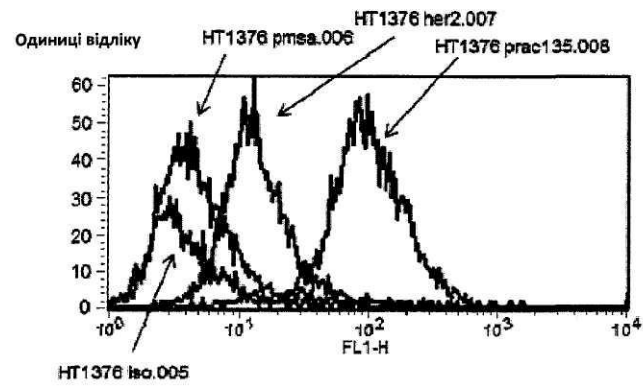
Фігура 21B



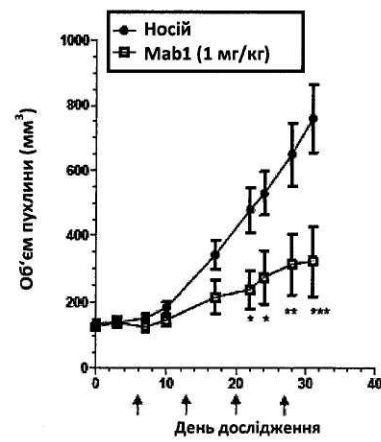
Фігура 21С



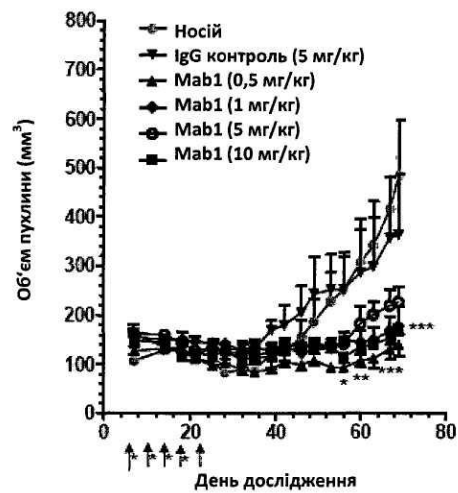
Фігура 22А



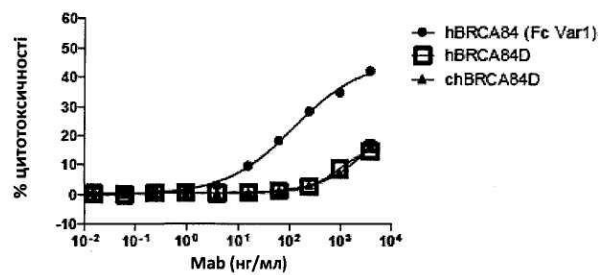
Фігура 22В



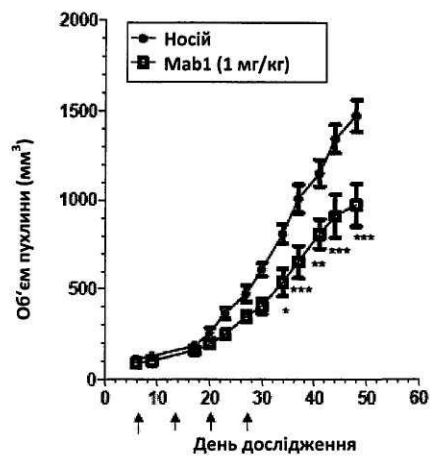
Фігура 23



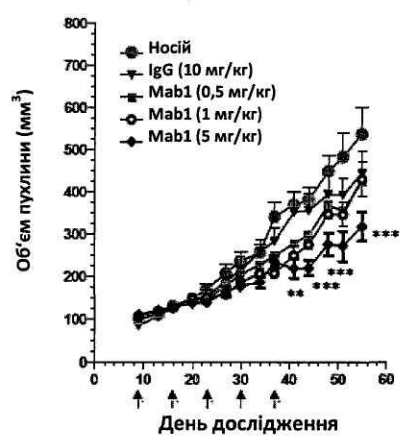
Фігура 24



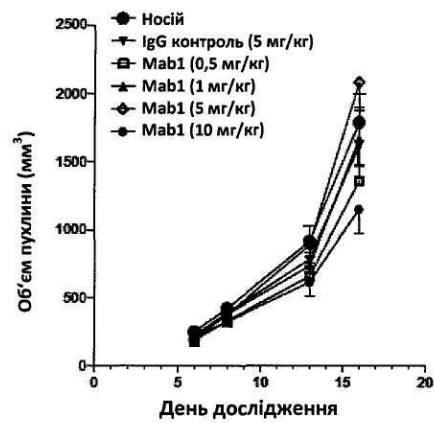
Фігура 25



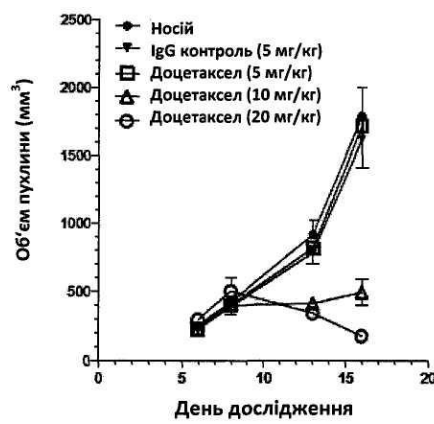
Фігура 26



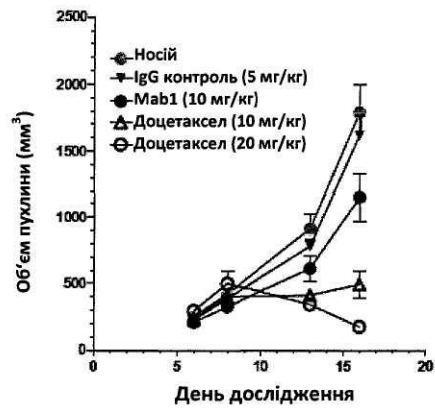
Фігура 27



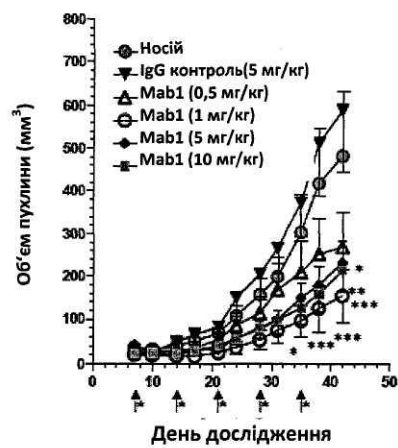
Фігура 28А



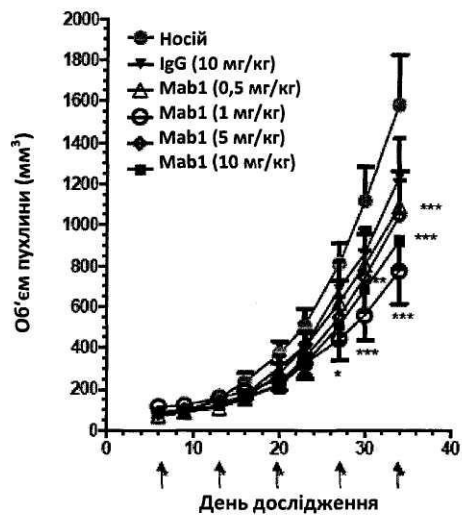
Фігура 28В



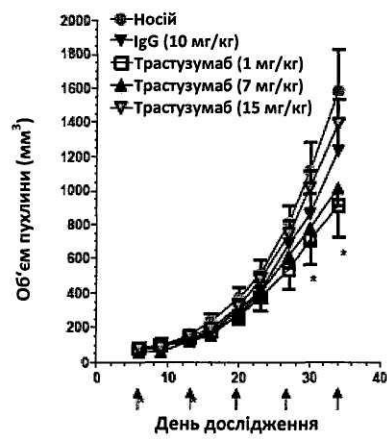
Фігура 28С



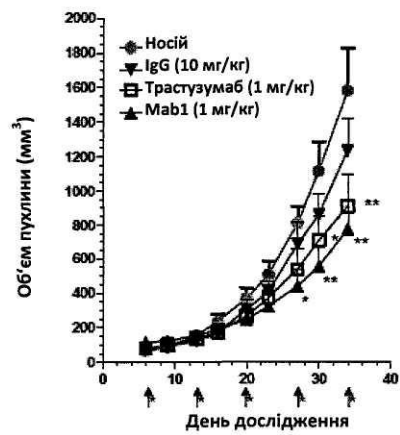
Фігура 29



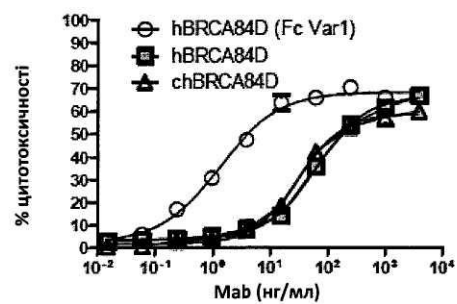
Фігура 30А



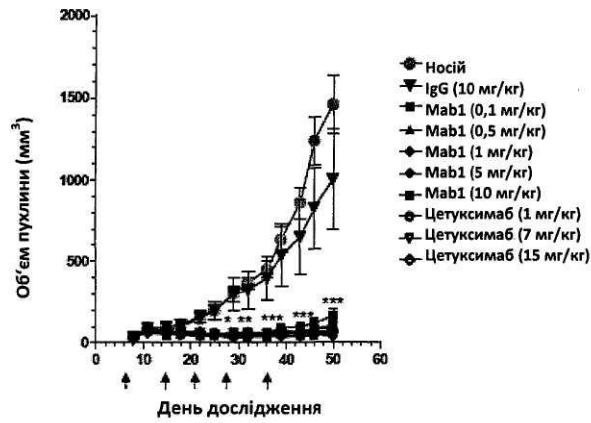
Фігура 30В



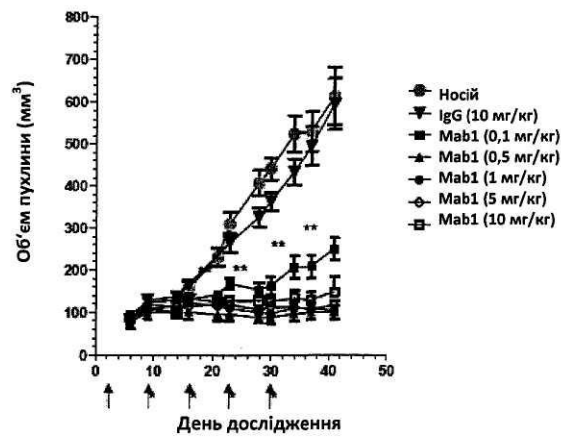
Фігура 30С



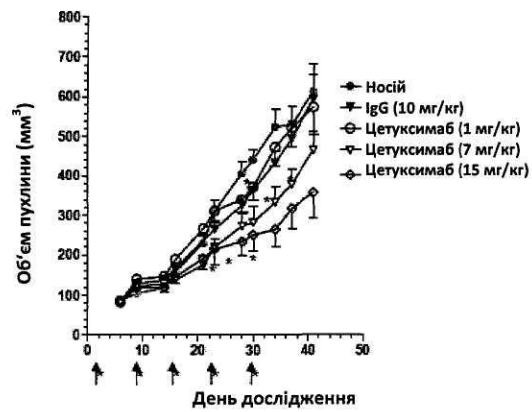
Фігура 31



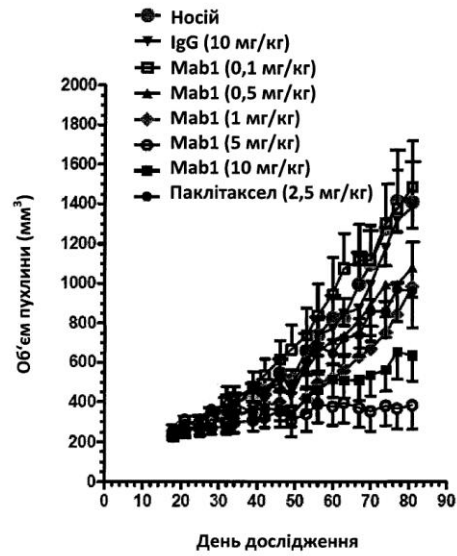
Фігура 32



Фігура 33A



Фігура 33B



Фігура 34

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601