



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 465 282** (13) **C2**

(51) МПК
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008141706/10, 21.03.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.03.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.03.2006 US 60/784,704
22.03.2006 US 60/785,330
22.12.2006 US 60/871,743

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2010 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 27.10.2012 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2004/056308 A, 08.07.2004. MOULD et al, "Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit", J Biol Chem., 1997 Jul 11; 272(28), с.17283-17292. (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 21.10.2008

(86) Заявка РСТ:
US 2007/064572 (21.03.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/060645 (22.05.2008)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

**ЧУНТХАРАПАЙ Анан (US),
ПЛАУМАН Грег (US),
ТЕССЬЕ-ЛАВИНЬ Марк (US),
У Янь (US),
Е Вэйлань (US)**

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТАГОНИСТОВ АЛЬФА5БЕТА1

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложены варианты антител против альфа5бета1 класса IgG2 из гибридом, депонированных под номером доступа в АТСС №РТА-7421, №РТА-7420, а

также конъюгат антитела с терапевтическим средством и антитело с меткой для диагностики заболевания, связанного с экспрессией альфа5бета1. Раскрыты также кодирующая нуклеиновая кислота; экспрессионный вектор; рекомбинантная

клетка; способ получения антитела; способ обнаружения белка альфа5бета1; фармацевтическая композиция на основе антитела; и варианты применений антитела для лечения патологического ангиогенеза.

Использование изобретения обеспечивает антитела с высокой аффинностью с Kd 0,1 нМ, которые могут найти применение в лечении патологий, связанных с ангиогенезом. 17 н. и 20 з.п. ф-лы, 16 ил., 6 табл., 17 пр.

(56) (продолжение):

РОЙТ А. и др. ИММУНОЛОГИЯ. Пер. с англ. - М.: Мир, 2000-592 с., с.110-113, 150-159.

R U 2 4 6 5 2 8 2 C 2

R U 2 4 6 5 2 8 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008141706/10, 21.03.2007**

(24) Effective date for property rights:
21.03.2007

Priority:

(30) Convention priority:
21.03.2006 US 60/784,704
22.03.2006 US 60/785,330
22.12.2006 US 60/871,743

(43) Application published: **27.04.2010 Bull. 12**

(45) Date of publication: **27.10.2012 Bull. 30**

(85) Commencement of national phase: **21.10.2008**

(86) PCT application:
US 2007/064572 (21.03.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/060645 (22.05.2008)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517

(72) Inventor(s):

ChUNTKhARAPAJ Anan (US),
PLAUMAN Greg (US),
TESS'E-LAVIN' Mark (US),
U Jan' (US),
E Vehjlan' (US)

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)

(54) **COMBINED THERAPY WITH USING ALPHA5BETA1 ANTAGONISTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are offered: versions of alpha5beta1 class IgG2 antibodies of hybridomas deposited under access number in ATCC No. PTA-7421, No. PTA-7420; as well as a conjugate of the antibody and the therapeutic agent, and the marked antibody for diagnosing a disease related to alpha5beta1 expression. There are also disclosed: a coding nucleic acid; an expression vector; a

recombinant cell; a method for producing the antibody; a method for detecting alpha5beta1 protein; an antibody-based pharmaceutical composition; versions for applying the antibody for treating pathological angiogenesis.

EFFECT: use of the invention provides the antibody affine to Kd 0,1 nM which can find application in treating pathology associated with angiogenesis.

37 cl, 16 dwg, 6 tbl, 17 ex

Область изобретения

Представленное изобретение относится к использованию антагонистов VEGF и антагонистов альфа5бета1 для лечения рака и подавления ангиогенеза и/или подавления проницаемости сосудов, включая ненормальный ангиогенез при некоторых заболеваниях. Представленное изобретение также относится к использованию агонистов VEGFR и агонистов альфа5бета1 для повышения ангиогенеза и сосудистой проницаемости. Представленное изобретение также относится к антителам против альфа5бета1, включающим их составам и наборам и способам их изготовления и применения.

Уровень техники изобретения

Признана важная роль VEGF-A в патологическом и непатологическом ангиогенезе. Введение VEGF в моделях in vivo вызывает сильный ангиогенный ответ (Plouet, J et al., (1989) EMBO J. 8:3801-3808; Leung, D.W., et al., (1989) Science 246:1306-1309). Потеря одного аллельного гена VEGF-A приводит к повышению эмбриональной смертности у мышей (Carmeliet, P., et al., (1996) Nature 380:435-439; Ferrara, N et al., (1996) Nature 380:439-442). VEGF также известен в качестве фактора сосудистой проницаемости в связи с его способностью вызывать кровоизлияния (Senger, D.R. et al., (1995) Science 219:983-985; Dvorak, H.F., et al., (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029-1039). Таким образом VEGF-A вовлечен в ангиогенез на этапе развития, воспроизводства и костный ангиогенез, в дополнение к другим непатологическим видам ангиогенеза.

VEGF-A связывается с двумя рецепторными тирозинкиназами (РТК), VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR, Flk-1). Обычно считается, что VEGFR-2 является основным медиатором митогенных, ангиогенных и увеличивающих проницаемость действий VEGF-A. В феврале 2004 US Food and Drug Administration (FDA) одобрила бевацизумаб, гуманизированные моноклональные антитела против VEGF (фактора роста эндотелия сосудов)-А, для лечения метастатического рака кишечника в сочетании с основанными на 5-фторурациле (ФУ) режимами химиотерапии. Впоследствии FDA одобрила пегаптиниб, аптамер, который блокирует изоформу VEGF-A из 165 аминокислот, для лечения влажной (неоваскулярной) формы связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD).

Несмотря на эти достижения, многие пациенты, получающие лечение антагонистами VEGF в конечном счете становятся жертвами своей болезни. Следовательно, имеется потребность в разработке новых медикаментов и способов лечения для лечения заболеваний, которые более не поддаются или только частично поддаются терапии антагонистами VEGF. Также существует потребность в разработке альтернативных и/или лучших способов лечения для лечения рака и осложнившихся заболеваний, вызванных или затрагиваемых ненормальным ангиогенезом.

Краткое описание изобретения

Представленное изобретение относится к медикаментам и способам лечения пациентов, которые могут получить выгоду от уменьшения ангиогенеза, страдающих от ненормального ангиогенеза и/или страдающих от неоплазии. В соответствии с одним вариантом осуществления представленное изобретение предлагает способ ингибирования ангиогенеза и/или сосудистой проницаемости у субъекта, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и антагониста альфа5бета1, одновременно или последовательно. В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения, представленное изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего от заболевания,

причем субъект или ранее реагировал на лечение заболевания антагонистом VEGF, но лишь частично, или уже не реагирует на антагонист VEGF, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества антагониста альфа5бета1. В соответствии с другим вариантом осуществления, представленное изобретение предлагает способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, устойчивым или трудноизлечимым при помощи лечения антагонистом альфа5бета1, самостоятельно или в комбинации с химиотерапией, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF.

Представленное изобретение также касается новых антител против альфа5бета1, наборов и композиций, их включающих, и способов их изготовления или применения. В соответствии с одним из вариантов осуществления новые антитела против альфа5бета1 являются описанными здесь антителами 7H5 или 7H12, или их гуманизированной или химерной формой. В соответствии с другим отдельным вариантом осуществления антитела 7H5 или 7H12 или их химерные или гуманизированные формы могут находиться в форме фрагментов Fab, Fab', F(ab)'₂, одноцепочечного Fv (scFv), фрагмента Fv, диатела, полиспецифического антитела и линейного антитела. В соответствии с другим вариантом осуществления новые антитела против альфа5бета1 могут быть конъюгированы с другим объектом, но не ограничиваясь перечисленным, таким как терапевтический препарат, или флуоресцентный краситель, или иной маркер для обнаружения альфа5бета1 у пациентов или в образцах от пациентов. Подобные новые антитела против альфа5бета1 могут быть использованы в различных терапевтических и диагностических методах. Например, такие антитела против альфа5бета1 могут быть использованы при лечении ненормального ангиогенеза, неоплазии, заболеваний глаз и аутоиммунных заболеваний. Подобные антитела могут быть использованы для обнаружения белка альфа5бета1 у пациентов или в образцах от пациентов путем осуществления контакта таких антител с белком альфа5бета1 у пациентов или в образцах пациентов и количественного или качественного определения связанных с белком альфа5бета1 антител против альфа5бета1.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления, представленное изобретение предлагает способ лечения рака у субъекта, включающий стадию введения антагониста VEGF и антагониста альфа5бета1 одновременно или последовательно. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления рак реагирует на терапию антагонистом VEGF. Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения связанной с возрастом дегенерации желтого пятна у субъекта, страдающего от AMD, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и антагониста альфа5бета1 одновременно или последовательно. По еще одному варианту осуществления предложен способ лечения аутоиммунных заболеваний у субъекта, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и антагониста альфа5бета1 одновременно или последовательно.

В одном из вариантов осуществления подвергающемуся лечению субъекту может быть сначала введен антагонист VEGF, а затем проведено лечение антагонистом альфа5бета1. В другом варианте осуществления, субъект подвергается лечению антагонистом VEGF и антагонистом альфа5бета1 одновременно. В соответствии с другим вариантом осуществления субъект подвергается лечению антагонистом VEGF до тех пор, пока субъект не перестанет реагировать на лечение антагонистом VEGF, после чего субъект подвергается лечению антагонистом альфа5бета1. В одном

отдельном варианте осуществления субъект подвергался лечению антагонистом VEGF, если рак был неинвазивным или на ранней стадии и подвергался лечению альфа5бета1 антагонистом, когда рак был инвазивным. По другому варианту осуществления субъект, подвергавшийся лечению антагонистом альфа5бета1, имел

5 повышенный уровень альфа5бета1 в пораженной болезнью ткани по сравнению с тканью от субъекта, не страдающего заболеванием. В этом случае способ может далее включать стадию обнаружения альфа5бета1 у субъекта, например в больной ткани после лечения антагонистом VEGF. В соответствии с одним вариантом осуществления

10 инвазивным раком является метастазирующий рак. В соответствии с другим вариантом осуществления, рак на ранней стадии - это рак, излечиваемый вспомогательной терапией (например, химиотерапией или хирургическим удалением).

В одном предпочтительном варианте осуществления субъект, страдающий от

15 болезни, имеет патологию ангиогенеза. В соответствии с другим вариантом осуществления, болезнь выбрана из группы, состоящей из рака, иммунного заболевания или глазного заболевания. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, заболевание выбрано из группы, состоящей из солидной опухоли, метастатической опухоли, опухоли мягких тканей, заболевания, связанного с

20 неоваскуляризацией глаза, воспалительного заболевания, связанного с ненормальным ангиогенезом, заболевания, возникающего после трансплантации субъекту, и заболевания, связанного с ненормальным развитием сосудисто-волокнутой ткани. В соответствии с другим предпочтительным вариантом, болезнь выбрана из группы, состоящей из рака груди (включая метастатический рак груди), рака шейки матки,

25 рака кишечника (включая метастатический рак кишечника), рака легких (включая немелкоклеточный рак легких), не-Ходжкинской лимфомы (NHL), хронического лимфолейкоза, почечноклеточного рака, рака простаты, включая устойчивый к гормонам рак простаты, рака печени, рака головы и шеи, меланомы, рака яичника,

30 мезотелиомы, рака мягких тканей, желудочно-кишечная опухоль стромы, мультиформная глиобластома и множественная миелома. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления, болезнь выбрана из группы, состоящей из ретинопатии, вызванной возрастом дегенерации желтого пятна (например, влажной AMD), диабетического отека сетчатки, покраснения радужки, псориаза,

35 воспалительного заболевания почек, гемолитического уремического синдрома, диабетической ретинопатии (например, пролиферативная диабетическая ретинопатия), артрита (например, псориатического артрита, остеоартрита, ревматоидного артрита), воспалительной болезни кишечника, хронического воспаления, хронического

40 отслоения роговицы, хронического увеита, хронического витрита, корнеального отторжения пересаженной ткани, корнеальной неоваскуляризации, корнеальной неоваскуляризации пересаженной ткани, болезни Крона, миопии, глазной неоваскулярной болезни, болезни Педжета, пемфигоида, полиартрита, пост-лазерной радиальной кератотомии, неоваскуляризации сетчатки, синдрома Шегрена, язвенного

45 колита, отторжения имплантата, воспаления легких, нефротического синдрома, отека, асцитов, связанных со злокачественными опухолями, удара, ангиофибромы и неоваскулярной глаукомы. В одном из вариантов осуществления, субъекту дополнительно вводится терапевтический препарат, выбранный из группы, состоящей

50 из анти-неопластического препарата, химиотерапевтического препарата и цитотоксического препарата.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления данного изобретения, подвергающийся лечению антагонистом альфа5бета1 субъект страдает

от рецидива после лечения антагонистом VEGF или стал невосприимчивым к лечению антагонистом VEGF. В соответствии с другим вариантом осуществления, подвергающийся лечению антагонистом альфа5бета1 и антагонистом VEGF субъект страдает от метастатического рака или ранее подвергался вспомогательной терапии.

5 В одном варианте осуществления, заболевание у являющегося кандидатом пациента является рецидивом, невосприимчивым или устойчивым к химиотерапевтическим препаратам, таким как иринотекан. Примеры таких заболеваний включают, но не ограничены, метастатический рак кишечника, рецидив метастатического рака
10 кишечника, метастатический рак груди, рецидив метастатического рака груди, метастатический рак груди HER2+, адьювантный рак груди, адьювантный рак груди HER2+, метастатический рак поджелудочной железы, адьювантный рак толстой кишки, адьювантный немелкоклеточный рак легких, адьювантный рак прямой кишки, адьювантный немелкоклеточный рак легких, метастатический немелкоклеточный рак
15 легких, метастатический рак яичника, метастатический почечноклеточный рак и адьювантный почечноклеточный рак.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту, страдающему от описанного здесь заболевания, после лечения антагонистом VEGF проводится
20 поддерживающая терапия, где поддерживающая терапия подразумевает использование антагониста альфа5бета1 самого по себе или после, или одновременно с антагонистом VEGF.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления антагонист VEGF может быть выбран из группы, состоящей из антитела,
25 иммуноадгезина, пептитела, малой молекулы и нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей VEGF при жестких условиях (например, рибозим, siРНК или аптамер). В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления антагонист VEGF является антителом. В
30 соответствии с другим вариантом осуществления антитело является моноклональным антителом. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления связывание антител против VEGF с человеческим VEGF может быть полностью ингибировано антителами Avastin[®]. В соответствии с одним предпочтительным
35 вариантом осуществления антитела против VEGF являются человеческими, гуманизированными или химерными. В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления антителами против VEGF является антитело Avastin[®]. В соответствии с другим вариантом осуществления антитела против VEGF выбраны из группы,
40 состоящей из Fab, Fab', F(ab)'₂, одноцепочечного Fv (scFv), фрагмента Fv; диатела и линейного антитела. В соответствии с другим вариантом осуществления антагонист VEGF является биспецифическим антителом, которое связывается с VEGF и альфа5бета1 и является антагонистом альфа5бета1.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления антагонист альфа5бета1 может быть выбран из группы, состоящей из антитела, иммуноадгезина,
45 пептитела, малой молекулы и нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей альфа5бета1, при жестких условиях.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, антагонист альфа5бета1 является антителом. В соответствии с другим вариантом осуществления
50 антитело является моноклональным антителом. В соответствии со следующим вариантом осуществления, моноклональное антитело является химерным антителом, таким как антитело против человеческого альфа5бета1, известное как M200 или F200. В соответствии с одним вариантом осуществления антитела против альфа5бета1

включают последовательность VH SEQ ID NO:1 и последовательность VL SEQ ID NO:2.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитела против альфа5бета1 включают последовательность SEQ ID NO:3 и последовательность SEQ ID NO:4. В соответствии с другим вариантом осуществления антитела против альфа5бета1
5 включают последовательность SEQ ID NO:4 и последовательность SEQ ID NO:5. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения связывание антител против альфа5бета1 с человеческим альфа5бета1 может быть полностью ингибировано антителами 7H5 или антителами 7H12. В соответствии с одним
10 предпочтительным вариантом осуществления антитела против альфа5бета1 являются человеческими, гуманизированными или химерными. В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления антителами против человеческого альфа5бета1 являются антитело 7H5, антитело 7H12 или химерное, или гуманизированное антитело на их основе. В соответствии с другим вариантом осуществления антитела против
15 альфа5бета1 выбраны из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)'₂, одноцепочечного Fv (scFv), фрагмента Fv; диатела и линейного антитела. В соответствии с другим вариантом осуществления антагонист альфа5бета1 является биспецифическим антителом, которое связывает VEGF и альфа5бета1 и является антагонистом VEGF. В
20 соответствии с еще одним вариантом осуществления антагонист анти-альфа5бета1 имеет измененную эффекторную функцию. В соответствии с одним вариантом осуществления антитела против альфа5бета1 изменены с целью уменьшения или подавления антителозависимого клеточного цитотоксического действия (ADCC) или
25 комплементзависимого цитотоксического действия (CDC) (например, путем изменения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Fc антитела). В соответствии с еще одним вариантом осуществления, антитела против альфа5бета1 были изменены для увеличения периода полужизни в человеческом организме (например путем изменения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей
30 участок Fc антитела).

В соответствии с одним вариантом осуществления антагонист VEGF или антагонист альфа5бета1 конъюгирован с цитотоксическим препаратом или химиотерапевтическим препаратом. В соответствии с другим вариантом
35 осуществления цитотоксический препарат является радиоизотопом или токсином.

Представленное изобретение предлагает композиции, включающие антагонист VEGF, антагонист альфа5бета1 и фармацевтически приемлемый носитель. Представленное изобретение также предлагает изделия, включающие инструкции по
40 обнаружению альфа5бета1 у субъекта, подвергавшегося лечению антагонистом VEGF.

Представленное изобретение также касается применения агонистов VEGFR и агонистов альфа5бета1 для стимуляции ангиогенеза и проницаемости сосудов и композиций, включающих агонисты VEGFR, и агонисты альфа5бета1, и
45 фармацевтически приемлемый носитель. Комбинированная терапия агонистами VEGFR и агонистами альфа5бета1 может быть использована при лечении различных заболеваний, при которых может наступить улучшение при увеличении ангиогенеза и сосудистой проницаемости, включая, например, излечение ран, такое как лечение хронических ран, острых ран и обычных ран.

Краткое описание фигур

50 Фигура 1 показывает увеличение популяции экспрессирующих альфа5бета1 клеток стромы после обработки ксенотрансплантированных опухолей HT29 антителами против VEGF, B20-4.1.

Фигура 2 представляет собой диаграмму, показывающую связывание антител 7H5

и 7Н12 с клетками HUVEC в исследовании прямого связывания.

Фигура 3 показывает связывание антител 7Н5 и 7Н12 с клетками HUVEC, но не с клетками RAJ по данным анализа FACS.

Фигура 4 является диаграммой, показывающей адгезию HUVEC к фибронектину в присутствии очищенных моноклональных антител 7Н5 и 7Н12.

Фигура 5 представляет собой (А) столбчатую диаграмму, демонстрирующую действие 7Н5 и 7Н12 на развитие клеток HUVEC по общему числу клеток и (В) столбчатую диаграмму, демонстрирующую действие 7Н5 и 7Н12 на развитие клеток HUVEC по окраске Alamar blue в другом исследовании.

Фигура 6 представляет собой фотографию миграции клеток HUVEC после обработки 7Н5 на 0 ч и 30 ч по сравнению с отрицательным контролем (IgG).

Фигура 7 представляет собой столбчатую диаграмму, количественно демонстрирующую миграцию клеток HUVEC после обработки 7Н5 и 7Н12.

Фигура 8 представляет собой столбчатую диаграмму, демонстрирующую процент клеток HUVEC, экспрессирующих активированную каспазу-3 в исследованиях апоптоза после обработки 7Н5 и 7Н12.

Фигура 9 представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую активность каспазы 3/7 в клетках HUVEC после обработки 7Н5 и 7Н12.

Фигура 10 представляет собой диаграмму, демонстрирующую активность 7Н12 и/или бевацизумаба на модели заживления раны уха кролика.

Фигура 11 демонстрирует результаты лечения антителами против VEGF с дополнением антителами против альфа5бета1 или без них на модели рака груди в виде (А) диаграммы, демонстрирующей средний объем опухоли в группе у подвергавшихся лечению мышей, или (В) график Каплана-Мейера, демонстрирующий процент животных, остающихся в исследовании, как функцию времени. Животные изымались из исследования, когда их опухоли достигали или превышали 1500 мм³.

Фигура 12 демонстрирует результаты лечения антителами против VEGF с дополнением антителами против альфа5бета1 или без них на модели рака толстой кишки в виде (А) диаграммы, демонстрирующей средний объем опухоли в группе у подвергавшихся лечению мышей, или (В) график Каплана-Мейера, демонстрирующий процент животных, остающихся в исследовании, как функцию времени. Животные изымались из исследования, когда их опухоли достигали или превышали 1500 мм³.

Фигура 13 демонстрирует результаты лечения антителами против альфа5бета1 или химиотерапевтическим препаратом на модели рака толстой кишки в виде (А) диаграммы, демонстрирующей средний объем опухоли в группе у подвергавшихся лечению мышей, или (В) график Каплана-Мейера, демонстрирующий процент животных, остающихся в исследовании, как функцию времени. Животные изымались из исследования, когда их опухоли достигали или превышали 1500 мм³.

Фигура 14 демонстрирует график Скэтчарда связывания ¹²⁵I-7Н5 с альфа5бета1 на клеточной линии фибробластов кролика R9ab.

Фигура 15 демонстрирует график Скэтчарда связывания ¹²⁵I-7Н12 с альфа5бета1 на клеточной линии фибробластов кролика R9ab.

Фигура 16 демонстрирует результаты картирования эпитопов IgG против интегрина альфа5бета1 и исследований конкурентного связывания различных антител против альфа5бета1.

Подробное описание изобретения

Не будучи связанными теорией, авторы сделали предположение, что увеличение восстановления популяции клеток стромы может доставлять к больным участкам

иные факторы роста сосудов, что может компенсировать потерю активности VEGF у пациентов, подвергавшихся терапии антагонистами VEGF. Воздействие на экспрессирующие альфа5бета1 клетки стромы антителами против альфа5бета1 может приводить к уменьшению числа клеток стромы, таким образом, уменьшая продукцию потенциально компенсирующих факторов сосудистого роста. Альтернативно или дополнительно авторы предположили, что ингибирование взаимодействий между эндотелием и внеклеточным матриксом и частичное ингибирование взаимодействий связывания альфа5бета1 будет увеличивать эффективность лечения антагонистами VEGF путем ингибирования рецидивов ангиогенеза вдоль следов во внеклеточном матриксе, оставленных регрессирующими вследствие лечения антагонистом VEGF сосудами. Таким образом, лечение антагонистами альфа5бета1 одновременно с любым лечением антагонистами VEGF или после него может ингибировать восстановление сосудов после лечения антагонистом VEGF и, следовательно, возобновление неоваскулярного роста.

«Альфа5бета1», или « $\alpha5\beta1$ », или « $\alpha5\beta1$ » является интегрином, включающим два различных белка (т.е. субъединицы альфа5 и бета1). Для альфа5бета1 показано, что он связывается с фибронектином, L1-CAM и фибриногеном. Интегрин альфа5бета1 также называют белком очень поздней активации-5, VLA-5, альфа5бета1, CD49e/CD29, рецептором фибронектина, FNR и GPIIb-IIIa. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления альфа5бета1 является человеческим альфа5бета1.

«Альфа5» также известен как CD49e, альфа5, альфа5 субъединица интегрин, альфа субъединица VLA-5, субъединица IC GPIIb-IIIa и альфа цепь FNR имеет четыре изоформы, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга (A-D). Вариации подвергаются цитоплазматические домены белков. Аминокислотные последовательности изоформ человеческого альфа5 могут быть найдены, например, под номерами доступа Genbank X07979, U33879, U33882 и U33880 соответственно.

«Бета1» также называют CD29, бета1, GPIIb тромбоцитов; бета-цепь VLA; бета-1 цепь интегрин, CD29; FNRb; MDF2; VLAB; GPIIb; MSK12 и VLA5B. Аминокислотные последовательности человеческого бета1 могут быть найдены, например под номером доступа Genbank X06256.

Термин «VEGF» или «VEGF-A», как он использован здесь, относится к 165-аминокислотному человеческому фактору роста эндотелиальных клеток сосудов и связанным 121-, 189-, и 206-аминокислотным человеческим факторам роста эндотелиальных клеток сосудов, как описано в Leung et al. Science, 246:1306 (1989), и Houck et al. Mol. Endocrin., 5: 1806 (1991), наряду с встречающимися в природе аллельными и измененными их формами. Термин «VEGF» также относится к VEGF отличным от человека видов, таких как мышь, крыса или примат. Иногда VEGF от определенного вида указывается терминами, такими как hVEGF для человеческого VEGF, mVEGF для мышинового VEGF, и т.п. Термин «VEGF» также используется для обозначения укороченных форм полипептида, включающих аминокислоты от 8 до 109 или от 1 до 109 165-аминокислотного человеческого фактора роста эндотелиальных клеток сосудов. Ссылки на любые подобные формы могут быть обозначены в настоящей заявке, например, как «VEGF (8-109)», «VEGF (1-109)» или «VEGF₁₆₅». Положения аминокислот в «укороченном» природном VEGF пронумерованы, как они указаны в природной последовательности VEGF. Например, аминокислота в положении 17 (метионин) в укороченном природном VEGF соответствует аминокислоте 17 (метионину) в природном VEGF. Укороченный природный VEGF имеет средство связывания к рецепторам KDR и Flt-1, сравнимое с

природным VEGF. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления VEGF является человеческим VEGF.

Термин «антагонист VEGF» относится к молекуле, способной нейтрализовать, заблокировать, ингибировать, сделать неактивным, уменьшить или помешать действию VEGF, способом, включающим ее связывание с VEGF или одним или более рецепторов VEGF или кодирующими их нуклеиновыми кислотами. Предпочтительно, антагонист VEGF связывается с VEGF или рецептором VEGF. Антагонисты VEGF включают антитела против VEGF и их антиген-связывающие участки, полипептиды, которые связываются с VEGF или с рецепторами VEGF и блокируют взаимодействие лиганда с рецептором (например, иммуноадгезины, пептитела), антитела против рецептора VEGF и антагонисты рецептора VEGF, такие как низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR, аптамеры, которые связывают VEGF и нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются при определенных условиях с последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют VEGF или рецептор VEGF (например, иРНК). В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, антагонист VEGF связывается с VEGF и ингибирует VEGF индуцированную пролиферацию эндотелиальных клеток. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, антагонист VEGF связывается с VEGF или рецептором VEGF с большим сродством, нежели не с VEGF или с не с рецептором VEGF. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, антагонист VEGF связывается с VEGF или рецептором VEGF с Kd между 1 мкМ и 1 пМ. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления антагонист VEGF связывается с VEGF или рецептором VEGF с Kd между 500 нМ и 1 пМ.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, антагонист VEGF выбран из группы, состоящей из полипептида, такого как антитело, пептитело, иммуноадгезин, низкомолекулярное соединение или аптамер. В предпочтительном варианте осуществления антитело является антителом против VEGF, таким как антитело AVASTIN[®] или антителом против рецептора VEGF, таким как антитела против VEGFR2 или против VEGFR3. Другие примеры антагонистов VEGF включают VEGF-Trap, Mucagen, PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (сорафениб), ZD-6474, CP632, CP-547632, AZD-2171, CDP-171, SU-14813, CHIR-258, AEE-788, SB786034, BAY579352, CDP-791, EG-3306, GW-786034, RWJ-417975/CT6758 и KRN-633.

Термин «антитело против VEGF» обозначает антитело, способное связываться с VEGF с достаточным сродством и специфичностью. Предпочтительно, антитело против VEGF по изобретению может быть использовано в качестве терапевтического препарата, ориентированного и препятствующего заболеваниям и состояниям, в которые вовлечено действие VEGF. Антитела против VEGF обычно не связываются ни с другими гомологами VEGF, такими как VEGF-B или VEGF-C, ни с другими факторами роста, такими как PIGF, PDGF или bFGF. Предпочтительными антителами против VEGF являются моноклональные антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и моноклональные антитела против VEGF A.4.6.1, производимые гибридомой ATCC HB 10709. Более предпочтительно антитела против VEGF являются рекомбинантными гуманизированными моноклональными антителами против VEGF, выработанными в соответствии с Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599, включая, но не ограничиваясь антителом, известным как бевацизумаб (BV; Avastin[®]). В соответствии с другим вариантом осуществления, антитела против VEGF, которые могут быть использованы, включают, но не ограничены, антителами, раскрытыми в

заявке WO 2005/012359. В соответствии с одним вариантом осуществления, антитела против VEGF включают переменные тяжелые и переменные легкие участки любого из антител, раскрытых на фигурах 24, 25, 26, 27 и 29 заявки WO 2005/012359 (например, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 и B20.4.1). В другом
5 предпочтительном варианте осуществления, антитело против VEGF, известное как ранибизумаб является антагонистом VEGF, назначаемым при болезнях глаз, таких как диабетическая нейропатия и AMD.

Антитело против VEGF «бевацизумаб(BV)», также известное как "rhUMAb VEGF" или "Avastin®", является рекомбинантным гуманизированным моноклональным
10 антителом против VEGF, полученным в соответствии с Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599. Оно включает мутантные структурные участки человеческого IgG1 и антигенсвязывающие определяющие комплементарность участки мышиного
15 моноклонального антитела против hVEGF A.4.6.1, которое блокирует связывание человеческого VEGF с его рецепторами. Приблизительно 93% аминокислотной последовательности бевацизумаба, включая большую часть структурных участков, является производным человеческого IgG1, и приблизительно 7% последовательности является производным мышиного антитела A4.6.1. Бевацизумаб имеет молекулярную
20 массу приблизительно 149000 дальтон и гликозилирован. Другие антитела против VEGF включают антитела, описанные в патенте Соединенных Штатов № 6884879 и WO 2005/044853.

Антитела против VEGF ранибизумаб или антитела LUCENTIS® или rhuFab V2 являются гуманизированными антителами со сформировавшимся средством против
25 человеческого фрагмента VEGF Fab. Ранибизумаб производится обычными методами рекомбинантной технологии с помощью экспрессионного вектора для Escherichia coli и бактериального ферментирования. Ранибизумаб не гликозилирован и имеет молекулярную массу приблизительно 48000 дальтон. См. WO98/45331 и US20030190317.

Термин «антагонист альфа5бета1» относится к любой молекуле, которая
30 ингибирует биологическое действие альфа5бета1. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, молекула антагониста специфически связывает альфа5бета1. В соответствии с одним предпочтительным вариантом
35 осуществления, молекула антагониста связывается с альфа5. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, антагонист альфа5бета1 предпочтительно связывается с альфа5бета1 с большим средством, нежели с интегринами, не являющимися альфа5бета1. В соответствии с одним
40 предпочтительным вариантом осуществления, антагонист выбран из группы, состоящей из полипептида, такого как антитело, пептитела, или иммуноадгезина, низкомолекулярного соединения или аптамера, который ингибирует связывание альфа5бета1 с его лигандами (в частности, фибронектином), или нуклеиновой
45 кислоты, которая гибридизуется при жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей альфа5бета1 (например, иРНК, препятствующая экспрессии альфа5). Биологическое действие альфа5бета1 может быть любым из эффектов, их сочетанием или всеми эффектами, выбранными из группы, состоящей из (1)
50 связывания с фибронектином, (2) увеличением миграции клеток на фибронектине, (3) увеличения выживаемости клеток, содержащих альфа5бета1 в присутствии фибронектина, (4) увеличения пролиферации клеток, содержащих альфа5бета1 в присутствии фибронектина, и (5) увеличения образования трубок из клеток, содержащих альфа5бета1 в присутствии фибронектина.

Примеры антагонистов-антител против альфа5бета1 включают M200 и F200 (WO

2004/089988A2), описанные здесь антитела 7Н5 и антитела 7Н12, и химерные, полностью человеческие и гуманизированные антитела на их основе. Например, антитела M200 и F200 могут быть получены из переменных тяжелых и переменных легких цепей мышинных антител против человеческого альфа5бета1, ПА1 (Pharming, San Diego, Ca). Примеры низкомолекулярных ингибиторов альфа5бета1 включают Ac-PHSCN-NH₂ (WO-9822617A1) и (S)-2-[(2,4,6-триметилфенил)сульфонил]-амино-3-[7-бензилоксикарбонил-8-(2-пиридилламиноэтил)-1-окса-2,7-диазаспиро-(4,4)-нон-2-ен-3-ил]карбониламино]пропионовую кислоту. В соответствии с одним из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, антагонист альфа5бета1 связывается с альфа5бета1, но не связывается с альфаVбета3, альфаVбета5 или альфаVбета1. В соответствии с одним из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, антагонист альфа5бета1 связывается с альфа5бета1 с K_d между 1 мкМ и 1 пМ. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения антагонист альфа5бета1 связывается с альфа5бета1 с K_d между 500 нМ и 1 пМ. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления антителом против альфа5бета1 является антитело, которое может конкурировать с антителом 7Н5 или антителом 7Н12 при связывании с альфа5бета1 при исследовании конкурентного связывания. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления, антителом является антитело, связывание которого с альфа5бета1 может быть полностью ингибировано антителами, производимыми гибридомой, депонированной как альфа5/бета1 7Н5.4.2.8 (ATCC No. PTA-7421), или гибридомой, депонированной как Альфа5/бета1 7Н12.5.1.4 (ATCC No. PTA-7420) 7 марта 2006 г.

Термин «агонист VEGFR» относится к молекуле, которая может активировать рецептор VEGF или увеличить его экспрессию. Агонисты VEGFR включают, но не ограничены, агонисты-лиганды VEGFR, варианты VEGF, антитела и активные фрагменты.

Термин «агонист альфа5бета1» относится к молекуле, которая может активировать альфа5бета1 или увеличивать его экспрессию. Агонисты альфа5бета1 включают, но не ограничены, например, лигандные агонисты альфа5бета1.

Молекулы, такие как антитела, характеризующиеся связыванием с перекрывающимися или сходными участками цели, могут быть идентифицированы путем проведения исследований конкурентного ингибирования/связывания.

В одном варианте осуществления клетки HUVEC или другие клетки, экспрессирующие альфа5бета1, использованы в исследованиях конкурентного ингибирования, для оценки расположения мест связывания двух антител против альфа5бета1 относительно друг друга был использован FACS. Например, клетки HUVEC могут быть промыты в конической пробирке и осаждены центрифугированием при 100 об/мин в течение 5 мин. Осадок обычно промывался два раза. Затем клетки могут быть ресуспендированы, подсчитаны и сохранены на льду до использования. В лунку может быть добавлено 100 мкл первого антитела против альфа5бета1 (например, начиная с концентрации 1 мкг/мл или более низкой концентрации). Затем в каждую лунку может быть добавлено 100 мкл клеток (например, 20×10⁵ клеток), после чего проводилась инкубация на льду в течение 30 мин. Затем в каждую лунку может быть добавлено по 100 мкл биотинилированных антител против альфа5бета1 (исходный раствор 5 мкг/мл), после чего проведено инкубирование на льду в течение 30 мин. Затем клетки были отмыты и осаждены центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант был удален. В

лунку был добавлен (100 мкл, 1:1000) конъюгированный с R-пикоэритрином стрептавидин (Jackson 016-1 10-084). Затем планшета была завернута в фольгу и инкубирована на льду в течение 30 мин. После инкубирования осадок мог быть промыт и осажден центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Осадок был ресуспендирован и перенесен в микропробирки для анализа FACS.

Термин «ангиогенный фактор или агент» обозначает фактор роста, который стимулирует развитие кровеносных сосудов, например, способствует ангиогенезу, росту клеток эндотелия, стабильности кровеносных сосудов, и/или васкулогенезу и т.д.

Ангиогенные факторы включают, но не ограничены, например, VEGF и членами семейства VEGF, PlGF, семейством PDGF, семейством фактора роста фибробластов (FGF), лигандов TIE (ангиопоэтинов), эфрины, Del-1, факторами роста фибробластов: кислым (aFGF) и основным (bFGF), фоллистатином, фактором стимуляции колоний гранулоцитов (G-CSF), фактором роста гепатоцитов (HGF)/рассеивающим фактором (SF), интерлейкином 8 (IL-8), лептином, мидкином, плацентарным фактором роста, тромбоцитарным фактором роста эндотелиальных клеток (PD-ECGF), тромбоцитарным фактором роста, в особенности PDGF-BB или PDGFR-бета, плейотрофином (PTN), програнулином, пролиферинном, трансформирующим фактором роста альфа (TGF-alpha), пролиферинном, трансформирующим фактором роста бета (TGF-beta), фактором некроза опухолей-альфа (TNF-alpha), фактором роста эндотелия сосудов (VEGF)/фактором проницаемости сосудов (VPF), и т.д. Они также включают факторы, ускоряющие заживление ран, такие как гормон роста, инсулин-подобный фактор роста-I (IGF-I), VIGF, эпидермальный фактор роста (EGF), CTGF и члены его семейства, и TGF-альфа и TGF-бета. См., например, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (например, таблицу 1, перечисляющую известные онкогенные факторы); и, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

Термин «Kd» или «значение Kd» для антитела против VEGF в соответствии с данным изобретением в одном предпочтительном варианте осуществления измеряется путем исследования связывания радиоактивно меченого VEGF (RIA), проводимого между Fab версией антитела и молекулой VEGF, как описано в следующем измерении, в котором сродство связывания в растворе Fab по отношению к VEGF определяется путем уравнивания Fab минимальной концентрацией меченого (¹²⁵I) VEGF(109) в присутствии серии разведений немеченого VEGF, с последующим захватом связанного VEGF на покрытом антителами против Fab планшете (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Для установки условий для проведения анализа микротитровальные планшеты (Dyplex) были покрыты захватывающими антителами против Fab (Cappel Labs) при инкубации в течение ночи с 5 мкг/мл антител в 50 мМ карбонате натрия (pH 9,6), после чего заблокированы 2% (по весу) бычьего сывороточного альбумина в ФСБ в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неабсорбирующей планшете (Nunc №269620) 100 пМ или 26 пМ [¹²⁵I] VEGF(109) было смешано с серией разведений интересующего Fab, например Fab-12 (Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Затем интересующий Fab инкубировали в течение ночи; однако инкубация могла продолжаться до 65 часов для того, чтобы убедиться в том, что равновесие достигнуто. Затем смеси были перенесены на захватывающий планшет и инкубированы при комнатной температуре в течение одного часа. Затем раствор был

удален, после чего планшет был промыт восемь раз 0,1% Tween-20 в ФСБ. Когда
планшеты были высушены было добавлено 150 мкл сцинтилляционной
жидкости (MicroScint-20; Packard) на лунку, после чего планшеты были подсчитаны на
гамма-счетчике Topcount(Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого
5 из Fab, которые давали связывание, меньше или равное 20% от максимального, были
выбраны для использования в исследованиях по конкурентному связыванию. В
соответствии с другим вариантом осуществления Kd или значение Kd были измерены с
использованием анализов с применением поверхностного плазмонного резонанса с
10 использованием VIAcore™-2000 или VIAcore™-3000 (VIAcore, Inc., Piscataway, NJ)
при 25°C с иммобилизованным hVEGF (8-109), чипами CM5 и ~10 единицами
ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы на карбоксиметилированном
декстрани (CM5, VIAcore Inc.) были активированы гидрохлоридом N-этил-N'-(3-
15 диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в
соответствии с инструкциями поставщика. Человеческий VEGF был разведен 10 мМ
ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед введением со скоростью
потока 5 мкл в минуту для получения приблизительно 10 единиц ответа (RU)
связанного белка. После введения человеческого VEGF был введен 1М этаноламин
20 для блокирования непрореагировавших групп. Для кинетических измерений была
введена серия двухкратных разведений Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в ФСБ с
добавлением 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25
мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) были вычислены с
25 применением простой модели связывания один к одному Лангмуира (VIAcore
Evaluation Software version 3.2) путем одновременной подстановки сенсограмм
ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации (Kd) была вычислена
как соотношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881.
Если скорость ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ по данным исследований
30 поверхностного плазмонного резонанса, описанного ранее, скорость ассоциации
может быть определена с применением методики гашения флуоресценции, при
которой измеряется увеличение или уменьшение интенсивности флуоресцентного
излучения (возбуждение 295 нм, излучение 340 нм, 16 нм полоса пропускания) при 25°C
35 20 нМ антитела против VEGF (в форме Fab) в ФСБ, pH 7,2 в присутствии
увеличивающихся концентраций короткой формы человеческого VEGF (8-109) или
мышинного VEGF по данным измерений с помощью спектрометра, такого как
спектрометр, оснащенный stop-flow (Aviv Instruments) или SLM-Aminco
40 спектрофотометр серии 8000 (ThermoSpectronic) с встряхиваемой кюветой. Сходные
исследования связывания могут быть проведены для определения Kd Fab или антител
против альфа5бета1 с применением в качестве мишени альфа5бета1.

В использованном здесь значении подвергающийся лечению субъект является
млекопитающим (например, человеком, приматом, не являющимся человеком,
45 крысой, мышью, коровой, лошастью, свиньей, овцой, козой, собакой, кошкой и т.д.).
Субъект может быть клиническим пациентом, добровольцем клинических испытаний,
экспериментальным животным и т.д. У субъекта может подозреваться наличие или
иметься риск возникновения рака, иммунного заболевания или любого другого
заболевания, характеризующегося патологическим ангиогенезом. Многие способы
50 диагностики рака, иммунных заболеваний или других заболеваний, демонстрирующих
ненормальный ангиогенез и клинические картины этих болезней, хорошо известны в
данной области. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления
подвергающийся лечению субъект является человеком.

Термин «ненормальный ангиогенез» применяется, когда новые кровеносные сосуды вырастают или чрезмерно, или неуместно (например, участок, время или начало ангиогенеза являются нежелательными с точки зрения медицины) в состоянии заболевания или таким образом, что он вызывает состояние заболевания.

5 Избыточный, неуместный или неконтролируемый ангиогенез происходит в случае, когда рост нового кровеносного сосуда вносит вклад в ухудшение состояния
заболевания или является причиной состояния заболевания, такого как рак, особенно
10 вакуолизованные солидные опухоли и метастатические опухоли (включая рак толстой кишки, легких (особенно мелкоклеточный рак легких), или рак простаты),
заболеваний, вызванных неоваскуляризацией глаза, в особенности диабетической слепоты, ретинопатий, преимущественно диабетической ретинопатии или связанной с
15 возрастом дегенерации желтого пятна, хороидальной неоваскуляризации (CNV), диабетического отека желтого пятна, патологической миопии, болезнь Ван Хиппеля-Линдау, гистоплазмоз глаза, окклюзия вены сетчатки (CRVO), корнеальная
неоваскуляризация, неоваскуляризация сетчатки и рубеоз; псориаз, псориатический артрит, гемангиобластома, такая как гемангиома; воспалительные заболевания почек,
такие как гломерулонефриты, в особенности мезангиопролиферативный
20 гломерулонефрит, гемолитический уремический синдром, диабетическая нефропатия или гипертензивный нефросклероз; различные воспалительные болезни, такие как артриты, в особенности ревматоидный артрит, воспалительные заболевания
кишечника, псориаз, саркоидоз, артериальный артериосклероз и заболевания, происходящие после трансплантации, эндометроз или хроническая астма и более
25 чем 70 других состояний. Новые кровеносные сосуды могут питать пораженные ткани, разрушать нормальные ткани, и, в случае рака, новые сосуды могут позволить клеткам опухоли попасть в круговорот и осесть в других органах (метастазы опухоли). Представленное изобретение рассматривает лечение пациентов, имеющих
30 риск возникновения упомянутых выше заболеваний.

Другие пациенты, являющиеся кандидатами на получение антител или полипептидов по этому изобретению, имеют или находятся под угрозой развития, ненормального разрастания сосудисто-волокнутой ткани, красных угрей, синдрома приобретенного иммунодефицита, закупорки артерий, атопического кератита,
35 бактериальных язв, болезни Бехчета, переносимых кровью опухолей, обструктивного заболевания сонных артерий, хороидальной неоваскуляризации, хронического воспаления, хронического отслоения сетчатки, хронического увеита, хронического витрита, излишнего ношения контактных линз, отторжения трансплантата роговицы,
40 неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации трансплантата роговицы, болезни Крона, болезни Эйлза, эпидемического кератоконъюнктивита, грибковых язв, заражения простым герпесом, заражения опоясывающим герпесом, синдромов повышенной вязкости, саркомы Капоши, лейкемии, дегенерации липидов, болезни Лайма, краевого кератолиза, язвы Мурена, микобактериальных инфекций за
45 исключением проказы, миопии, глазной неоваскулярной болезни, врожденных ямок зрительного нерва, синдрома Ослера-Вебера (Ослера-Вебера-Рандю), остеоартрита, болезни Педжета, воспаления ресничного кружка, пемфигоида, филектенулеза, полиартерита, осложнений после лазерного излучения, заражений простейшими,
50 эластичной псевдоксантомы, птеригия, сухого кератита, pterygium keratitis sicca, радиальной кератотомии, неоваскуляризации сетчатки, ретролентальной фиброплазии, саркоида, склерита, серповидноклеточной анемии, синдрома Шегрена, солидных опухолей, болезни Старгарта, болезни Стивена Джонсона, высшего

лимбического кератита, сифилиса, системной волчанки, краевой дегенерации роговицы, токсоплазмоза, травм, опухолей саркомы Юинга, опухолей нейробластомы, опухолей остеосаркомы, опухолей ретинобластомы, опухолей рабдомиосаркомы, язвенного колита, окклюзии вен, дефицита витамина А и саркоидоза Вегнера, нежелательного ангиогенеза, связанного с диабетом, паразитическими заболеваниями, ненормальным заживлением ран, постхирургической гипертрофией, ранениями или травмами, подавлением роста волос, подавлением овуляции и формированием желтого тела, подавлением имплантации и подавлением развития эмбриона in uterus.

Терапия против ангиогенеза полезна при общем лечении отторжения трансплантата, воспаления легких, нефротического синдрома, прееклампсии, выпота в область перикарда, такого как связанный с перикардитами, и плеврального выпота, заболеваний и расстройств, характеризующихся нежелательной проницаемостью сосудов, например, отеком, связанным с опухолями мозга, асцитами, ассоциированными со злокачественными опухолями, синдромом Мейгса, воспалением легких, нефротическим синдромом, экссудативным перикардитом, плевральным выпотом, проницаемостью, связанной с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как постинфарктные состояния, удары и подобное.

Другие зависящие от ангиогенеза заболевания в соответствии с этим изобретением включают ангиофибром (ненормальное кровотечение из склонных к кровотечению сосудов), неоваскулярной глаукомы (рост кровеносных сосудов в глазу), артериовенозные пороки развития (ненормальное сообщение между артериями и венами), несрастающиеся переломы (переломы, которые не излечиваются), атеросклеротические бляшки (затвердения артерий), пиогенная гранулома (частое патологическое изменение кожи, состоящее из кровеносных сосудов), склеродермия (форма заболевания соединительной ткани), гемангиома (опухоль, состоящая из кровеносных сосудов), трахома (основная причина слепоты в третьем мире), гемофилическая артропатия, слипание сосудов и гипертрофированные шрамы (неправильное формирование шрама).

Термин «лечение» относится и к терапевтическому лечению, и к профилактическим или превентивным мерам. Нуждающиеся в лечении пациенты включают тех, кто уже имеет расстройство, и тех, у кого расстройство должно быть предотвращено.

Термины «повторение», «рецидив» или «рецидивный» относятся к возвращению рака или заболевания после клинического определения исчезновения заболевания. Диагностика удаленных метастаз или локального повторного возникновения может считаться рецидивом.

Термины «невосприимчивый» или «устойчивый» относятся к раку или заболеванию, которое не реагирует на лечение.

Термин «вспомогательная терапия» относится к лечению, проводимому после основного лечения, обычно хирургического. вспомогательная терапия при раке или заболевании может включать иммунную терапию, химиотерапию, радиотерапию или терапию гормонами.

Термин «поддерживающая терапия» относится к запланированному повторному лечению, которое проводится для помощи в поддержании эффектов предшествующей терапии. Поддерживающая терапия часто проводится для поддержания рака в состоянии ремиссии или для удлинения ответа на определенную терапию вне зависимости от прогресса болезни.

Термин «инвазивный рак» относится к раку, который распространился за пределы

слоя ткани, в котором он начался, в нормальные окружающие ткани. Инвазивный рак может быть или не быть метастатическим.

Термин «неинвазивный рак» относится к очень ранней стадии рака или к раку, который не распространяется за пределы ткани, из которой происходит.

5 Термин «выживание без прогрессирования» в онкологии относится к периоду времени в процессе и после лечения, в течение которого рак не растет. Выживание без прогрессирования включает количество времени, в течение которого пациент испытывал полный или частичный ответ, также как и период времени, в течение которого пациент испытывал стабильную болезнь.

10 Термин «прогрессирующая болезнь» в онкологии может относиться к росту опухоли более чем на 20 процентов с момента начала лечения или по причине увеличения массы опухоли, или по причине распространения опухоли.

15 Термин «расстройство» обозначает любое состояние, при котором лечение антителами принесет пользу. Например, млекопитающие, страдающие от ненормального ангиогенеза (избыточного, неуместного или неконтролируемого ангиогенеза) или сосудистой проницаемости или нуждающиеся в их профилактике. Это включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к

20 обсуждаемому расстройству. Неограничивающие примеры подвергаемых лечению расстройств включают злокачественные и доброкачественные опухоли, нелейкемические и лимфоидные злокачественные опухоли; нейронные, глиальные, астроцитальные, гипоталамические и другие железистые, макрофаговые,

25 эпителиальные, стромальные и бластоцелические расстройства; и воспалительные, ангиогенные и иммунологические расстройства.

Термины «рак» и «раковый» относятся к или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым

30 ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничены, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемию. Отдельные примеры подобного рака включают рак сквамозных клеток, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак груди, рак кишечника, рак толстой кишки, эндометриальную саркому, саркому слюнной железы, рак почек, рак почечных

35 канальцев, рак простаты, рак вульвы, рак щитовидной железы, печеночная карцинома, рак головы и шеи, рак прямой кишки, рак кишечника, рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и сквамозную карциному легких, рак сквамозных клеток (например, рак эпителиальных

40 сквамозных клеток), рак простаты, рак брюшины, печеночноклеточный рак, рак желудка, включая желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, ретинобластому, астроцитому, текомы, арренобластомы, гепатому, гематологические злокачественные образования, включая неходжкинскую лимфому (NHL), множественную миелому и острые гематологические

45 злокачественные состояния, эндометриальную или внутриматочную карциному, эндометриоз, фибросаркомы, хориокарциному, карциному слюнной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциномы пищевода, карциному печени, карциному прямой кишки, карциному члена, носоглоточную карциному, карциному гортани,

50 саркому Капоши, меланому, карциномы кожи, шванному, олигодендроглиому, нейробластомы, рабдомиосаркому, остеогенную саркому, лейомиосаркому, карциномы мочевого тракта, карциномы тироида, опухоль Вильма, а также В-клеточную лимфому (включая низкодифференцированную/фолликулярную

неходжкинскую лимфому (NHL); малую лимфоцитарную (SL) NHL; среднедифференцированную/фолликулярную NHL; диффузную NHL средней степени; высокодифференцированную иммунобластическую NHL; высокодифференцированную лимфобластическую NHL; мелкоклеточную NHL с нерасщепленными ядрами; NHL с массивным поражением, лимфому клеток мантии; СПИД-ассоциированную лимфому, болезнь Вандельстрема (макроглобулинемия); хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL); острую лимфобластическую лейкемию (ALL), лейкоз ворсистых клеток; хроническую лейкемию миелобластов; и пост-трансплантационное лимфопролиферационное расстройство (PTLD), также как и ненормальное разрастание сосудов, связанное с факотозами и синдромом Мейгса.

Термин «опухоль», как он использован здесь, относится к неопластическому росту и пролиферации клеток, злокачественному и доброкачественному, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

Термин «анти-неопластическая композиция» или «анти-неопластический препарат» относится к композиции, полезной при лечении рака, включающей не менее одного активного терапевтического фактора, например «противоракового препарата».

Примеры терапевтических агентов (противораковых препаратов) включают, но не ограничены, например, химиотерапевтическими препаратами, ингибирующими рост препаратами, цитотоксическими препаратами, препаратами, применяемыми в радиотерапии, препаратами против ангиогенеза, апоптотическими препаратами, противотубулиновыми препаратами, и прочими препаратами для лечения рака, такими как антитела против HER-2, антитела против CD20, антагонист рецептора фактора роста эпидермиса (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (например, эрлотиниб (TarcevaTM), ингибиторы тромбоцитарного фактора роста (например, GleevecTM (иматиниб месилат)), ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более следующих целей - с рецептором(ами) ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BAFF, BR3, APRIL, BCMA или VEGF, TRAIL/ Apo2 и другими биологически активными и органическими химическими факторами, и т.п. Их сочетания также включаются в данное изобретение.

Использованный здесь термин «фактор подавления (ингибирования) роста» относится к соединению или составу, который подавляет рост клеток *in vitro* и/или *in vivo*. Таким образом, фактором подавления роста может являться фактор, значительно уменьшающий процент клеток, находящихся в S-фазе. Примеры факторов подавления роста включают факторы, которые блокируют ход клеточного цикла (в точке, отличной от S-фазы), такие как факторы, вызывающие остановку G1 и остановку в M-фазе. Классические блокираторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), TAXOL[®] и ингибиторы топоII, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Факторы (агенты), блокирующие G1, также распространяются на блокировку S- фазы, например, ДНК-алкилирующие препараты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дальнейшая информация может быть найдена в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Глава 1, озаглавленная "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" авторы Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), в особенности стр. 13.

Термин «цитотоксический препарат (агент)», как он использован здесь, относится к

веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток. Предполагается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, I^{131} , I^{125} , Y^{90} и Re^{186}), химиотерапевтические препараты и токсины, такие как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты.

Термин «химиотерапевтический препарат» обозначает химическое соединение, применяемое при лечении рака. Примеры химиотерапевтических препаратов включают химические соединения, которые можно использовать для лечения рака.

Примеры химиотерапевтических препаратов включают алкилирующие препараты, такие как тиотепа и СУТОХАН® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан, и пиросульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа, и уредопа; этиленимины и метиленимины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (главным образом буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (а именно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин а; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлоронафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, оксид гидрооксид мехлоретамина, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевина, такая как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, и ранимустин; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихимицин, в особенности калихимицин гамма II и калихимицин омега II (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; бифосфонаты, такие как хлоронат; эсперамицин; а также хромофор неокарциностаин и связанные хромопротеиновые эндииновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, кариномицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, ADRIAMYCIN® доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин 2-пирролино-доксорубицин и деоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомидины, пепломицин, потфиромицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберсидин, убенимекс, зиностаин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флюдарабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлюуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитостанол, мепитостан, тестостерон; ингибиторы надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид алдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; енилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптина; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; маитанзиноиды, такие как маитанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон;

мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в особенности токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел TAXOL[®] (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.), ABRAХANETM без кремофора, сконструированная на основе альбумина форма паклитаксела в виде наночастиц (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), и доксетаксел TAXOTERE[®] (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабин GEMZAR[®]; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин NAVELBINE[®]; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (Camptosar, СРТ-11) (включая режим лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; комбретастин; лейковорин (LV); оксалиплатин, включая режим лечения оксалиплатином (FOLFOX); ингибиторы PKC-альфа, Raf, H-Ras и EGFR (например, эрлотиниб (TarcevaTM)), которые понижают размножение клеток, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные всех перечисленных выше препаратов.

Также включены в данное описание противогормональные препараты, которые регулируют или подавляют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные регуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX[®]), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, и FARESTON-торемифен; ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, который регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрол-ацетат MEGASE[®], екземестан AROMASIN[®], форместан, фадрозол, ворозол RIVISOR[®], летрозол FEMARA[®] и анастрозол ARIMIDEX[®]; антиандрогены, такие как флутамид, нилютамид, бикаллютамид, лейпролид, и гoserелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолан, аналог нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, в особенности ингибирующие экспрессию генов сигнальных путей, вовлеченных в размножение аберрантных клеток, таких как, например, PKC-alpha, Raf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим ANGIOZYME[®]) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как вакцины генетической терапии, например вакцина ALLOVECTIN[®], вакцина LEUVECTIN[®], и вакцина VAXID[®]; PROLEUKIN[®] rIL-2; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN[®]; ABARELIX[®] gmRH; винорелбин и эсперамицины (см. патент США № 4675187), и фармацевтически приемлемые соли, кислые формы или производные перечисленных выше препаратов.

Термин «пролекарство», использованный в данной заявке, относится к предшественнику или производной форме фармацевтически активного вещества (например, низкомолекулярного соединения), которое менее цитотоксично по отношению к пораженным клеткам по сравнению с исходным препаратом и может быть ферментативно активировано или преобразовано в более активную исходную

форму. См., например, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) и Stella et al, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Пролекарства в соответствии с данным изобретением
5 включают, но не ограничены, фосфат-содержащими пролекарствами, тиофосфат-содержащими пролекарствами, сульфат-содержащими пролекарствами, пептид-содержащими пролекарствами, модифицированными D-аминокислотой пролекарствами, гликозилированными пролекарствами, β-лактам-содержащими
10 пролекарствами, содержащими возможно замещенный феноксиацетамид пролекарства или содержащими возможно замещенный фенилацетамид пролекарствами, 5-фторцитозином и другими пролекарствами 5-фторуридина, которые могут быть преобразованы в более цитотоксичный свободный препарат. Примеры цитотоксичных препаратов, которые могут быть переведены в форму
15 пролекарства для применения в данном изобретении, включают, но не ограничены описанными выше химиотерапевтическими препаратами.

Термин «изолированный», когда использован для описания различных полипептидов, раскрытых здесь, означает полипептид, который был идентифицирован
20 и отделен и/или выделен из клетки или культуры клеток, в которой он экспрессировался. Загрязняющими компонентами в его естественном окружении являются материалы, которые обычно препятствуют диагностическому или терапевтическому применению полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных
25 вариантах осуществления полипептид будет очищен (1) до степени, достаточной для получения не менее чем 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом или (2) до гомогенности по данным SDS-PAGE при невозстанавливающих и
30 восстанавливающих условиях с использованием синего Кумасси или, предпочтительно, окраски серебром. Изолированный полипептид включает полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды полипептида не присутствует. Однако обычно изолированный полипептид бывает изготовлен с использованием по меньшей мере
35 одного этапа очистки.

Термин «изолированная» кодирующая полипептид нуклеиновая кислота или иная кодирующая полипептид нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой
40 кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой обычно связана в естественном источнике кодирующей полипептид нуклеиновой кислоты. Изолированная кодирующая полипептид молекула нуклеиновой кислоты находится в
иной форме или окружении, нежели те, в которых она встречается в природе. Изолированная кодирующая полипептид молекула нуклеиновой кислоты таким
45 образом отличается от кодирующей полипептид молекулы нуклеиновой кислоты в природных клетках. Однако изолированные кодирующие полипептид молекулы нуклеиновой кислоты включают кодирующие полипептид молекулы нуклеиновой кислоты, которые обычно экспрессируют полипептид в случае, например, когда
50 молекула нуклеиновой кислоты находится в положении на хромосоме, отличном от положения в естественных клетках.

Термин «управляющие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии оперативно связанных кодирующих

последовательностей в определенном организме-хозяине. Управляющие последовательности, подходящие для прокариот, например, включают промотор, возможно последовательность-оператор, и участок связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является «оперативно связанной», когда она находится в функциональных отношениях с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, предпоследовательность ДНК или секреторная лидерная последовательность оперативно связана с ДНК, кодирующей полипептид, в случае если она экспрессирует препротейн, участвующий в секреции полипептида; промотор или энхансер является оперативно связанным с последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомы оперативно связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что способствует трансляции. В общем, «оперативно связанные» означает, что последовательности ДНК соединены и непрерывны, и, в случае секреторной лидерной последовательности, непрерывны и находятся в одной фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть прилегающими. Связывание происходит путем лигирования в подходящих сайтах рестрикции. Если таких сайтов не существует, в соответствии с обычной практикой используются синтетические линкеры и адаптеры.

«Жесткие условия» или «условия высокой жесткости», как описано здесь, могут быть определены как (1) включающие низкую ионную силу и высокую температуру для отмывки, например 0,015 М хлорид натрия/0,0015 М цитрат натрия/0,1% додецилсульфат натрия при 50°C; (2) включающие денатурирующий фактор, такой как формамид, в процессе гибридизации, например, 50% (объемных) формамида с 0,1% бычьего сывороточного альбумина/0,1% фиколла/0,1% поливинилпирролидона/50 мМ натриевого фосфатного буфера с рН 6,5 с 750 мМ хлорида натрия, 75 мМ цитрата натрия при 42°C; или (3) гибридизация в течение ночи в растворе, который содержит 50% формамида, 5x SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (рН 6,8), 0,1% пирофосфат натрия, 5x раствор Денхардта, обработанная ультразвуком сперма лосося (50 мкг/мл), 0,1% SDS и 10% сульфата декстрана при 42°C с отмывкой 10 минут при 42°C в 0,2x SSC (хлорид натрия/цитрат натрия) с последующей 10 минутной промывкой при условиях высокой жесткости, состоящей из 0,1 x SSC, содержащего ЭДТА при 55°C.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к приведенным здесь полипептидным последовательностям определяется как процент в обсуждаемой последовательности аминокислотных остатков, идентичных аминокислотным остаткам в сравниваемом полипептиде после выравнивания и, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей, введения разрывов, причем консервативные замены не считаются частью идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, находящимися в пределах знаний специалиста в данной области техники, например, с использованием общественно доступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения гомологии, включая алгоритмы, требующиеся для достижения максимальной гомологии в пределах полной длины сравниваемых последовательностей. Однако для решаемых здесь

задач % идентичности аминокислотных последовательностей были получены с применением компьютерной программы сравнения последовательностей программы ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc, исходный код (таблица 1) был внесен в реестр вместе с документацией пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он был зарегистрирован под регистрационным номером США TXU510087. Программа ALIGN-2 доступна публично через Genentech, Inc., South San Francisco, California. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой системе UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей были заданы программой ALIGN-2 и не изменялись.

Аминокислотные последовательности, описанные здесь, являются непрерывными аминокислотными последовательностями, если не указано иное.

Использованный здесь термин «иммуноадгезин» обозначает подобные антителам молекулы, которые сочетают специфичность связывания гетерологичного белка («адгезина») с эффекторными функциями константных доменов иммуноглобулина. Структурно, иммуноадгезины включают слитую последовательность, состоящую из последовательности аминокислот с желаемой специфичностью связывания, иной по сравнению с участком узнавания и связывания антигена антитела (т.е. являющуюся «гетерологичной»), и последовательностей константных доменов иммуноглобулина. Адгезиновая часть молекулы иммуноадгезина обычно является непрерывной аминокислотной последовательностью, включающей по меньшей мере участок связывания с рецептором или лигандом, таким как VEGFR или фибронектиновый лиганд. Константный участок последовательности иммуноглобулина в иммуноадгезине может быть получен из любого иммуноглобулина, такого как подтипы IgG-1, IgG-2, IgG-3, или IgG-4, IgA (включая IgA-1 и IgA-2), IgE, IgD или IgM. Пептитела, часто содержащие последовательность, полученную путем отбора из последовательностей фагового дисплея, которые специфически связываются с мишенью, и их слияния с Fc частью иммуноглобулина тоже могут быть здесь сочтены иммуноадгезинами.

Термин «антитело» использован в наиболее общем смысле и, в частности, подразумевает, например, единичные моноклональные антитела (включая агонисты, антагонисты и нейтрализующие антитела), композиции антител с многоэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, одноцепочечные антитела и фрагменты антител (см. ниже), до тех пор, пока они специфически связываются с нативным полипептидом и/или демонстрируют биологическую или иммунологическую активность согласно данному изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления, антитело связывается с олигомерной формой белка-мишени, например с тримерной формой. В соответствии с другим вариантом осуществления, антитело специфически связывается с белком, это связывание может быть ингибировано моноклональными антителами в соответствии с данным изобретением (например, депонированным антителом согласно данному изобретению и т.п.). Фраза «функциональный фрагмент или аналог» антитела обозначает соединение, имеющее качественную биологическую активность, общую с антителом, с которым оно сравнивается. Например, функциональный фрагмент или аналог антитела согласно данному изобретению может специфически связываться с VEGF или альфа5бета1. В одном варианте осуществления, антитело может предотвратить или значительно уменьшить способность VEGF вызывать размножение клеток.

«Изолированным антителом» является антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонентов его естественной среды. Загрязняющими компонентами его естественного окружения являются материалы, способные
 5 препятствовать диагностическому или терапевтическому применению антител, включая ферменты, гормоны и иные белковые или небелковые растворимые вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитела будут очищены (1) до более чем 95% по весу антител, при определении по методу Лоури, и, наиболее предпочтительно, до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для
 10 получения не менее чем 15 аминокислотных остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности по данным SDS-PAGE при восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания синим Кумасси или, предпочтительно, серебром. Изолированные антитела включают антитела *in situ* в
 15 рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент натурального окружения антител не будет присутствовать. Однако обычно изолированные антитела получают с применением по меньшей мере одного этапа очистки.

Основная 4-цепочечная единица антитела является гетеротетрамерным
 20 гликопротеином, состоящим из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (антитело IgM состоит из 5 обычных гетеротетрамерных единиц, наряду с дополнительным полипептидом, называемым цепочкой J, и, таким образом, содержит 10 участков связывания антигена, а секретированные антитела IgA могут полимеризоваться, образуя поливалентные структуры, включающие 2-5 основных 4-
 25 цепочечных единиц вместе с J-цепью). В случае IgG, 4-цепочечная единица обычно имеет массу около 150000 дальтон. Каждая цепь L связана с цепью H одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две цепи H связаны друг с другом одной или более дисульфидных связей, в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая из
 30 цепей H и L также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая цепь H имеет на N-конце вариабельный домен (V_H), с последующими тремя константными доменами (C_H) для каждой из цепей α и γ , и четырема константными доменами C_H для изоформ μ and ϵ . Каждая цепь L имеет на N-конце
 35 вариабельный домен (V_L), с последующим константным доменом (C_L) на другом конце. V_L находится напротив V_H , а C_L находится напротив первого константного домена тяжелой цепи C_H^1 . Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют взаимодействие между вариабельными участками тяжелой и легкой цепей. Спаренные вместе, V_H и V_L образуют участок связывания антигена. Структура и
 40 свойства различных классов антител описаны, например, в *Basic and Clinical Immunology*. 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

Цепь L от любого позвоночного вида может быть отнесена к одному из двух четко
 45 различаемых типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (C_H), иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные
 50 соответственно α , δ , γ и μ . Классы γ и α далее подразделяются на подклассы на основе относительно небольших различий в последовательности C_H и функции, например у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что некоторые сегменты

вариабельных доменов имеют значительные различия в последовательностях среди антител. Домен V обеспечивает связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. Однако вариабельность

5 неравномерно распределена в пределах 110-ти аминокислот вариабельных доменов. Вместо этого, участки V состоят из относительно постоянных промежутков, называемых каркасными участками (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками исключительной вариабельности, называемых

10 «гипервариабельные участки», каждый из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждый из вариабельных доменов природных тяжелых и легких цепей включает четыре FR, в основном принимающих конфигурацию бета-листа, связанных с тремя гипервариабельными участками, которые формируют петли, соединяя и в некоторых случаях формируя часть структуры бета-листа. В каждой цепи гипервариабельные области удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с

15 гипервариабельными участками с другой цепи, вносят вклад в формирование антиген-связывающего участка антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с

20 антигеном, но проявляют разнообразные эффекторные функции, такие как участие антитела в зависящей от антител клеточной цитотоксичности (ADCC).

Термин «гипервариабельный участок», используемый здесь, относится к

аминокислотным остаткам в антителе, ответственным за связывание антигена.

25 Гипервариабельный участок обычно включает аминокислотные остатки из «участка, определяющего комплементарность» или "CDR" (например, остатки около 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в V_L , и около 31-35B (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в V_H (в одном варианте осуществления H1 находится около приблизительно 31-35); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National

30 Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или остатки из «гипервариабельной петли» (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в V_L , и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в V_H ; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Использованный здесь термин «моноклональное антитело» относится к антителам, полученным из популяции в основном гомогенных антител, то есть отдельные

35 антитела, содержащиеся в популяции, являются идентичными за исключением возможных естественно встречающихся мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного участка антигена. Более того, в противоположность

40 препаратам поликлональных антител, которые включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они могут быть синтезированы незагрязненными другими антителами. Модификатор

45 «моноклональные» не должен истолковываться как требующий производства антител каким-либо определенным способом. Например, моноклональные антитела, применимые в представленном изобретении, могут быть получены при помощи гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены с применением методов рекомбинантной ДНК в

50 бактериальных, эукариотических животных или растительных клетках (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с применением технологий, описанных, например,

в Clackson et al., Nature. 352:624-628 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), и примерах ниже.

Здесь моноклональные антитела также включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенных видов или принадлежащих определенному классу или подклассу, в то время как оставшаяся часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, так же как и фрагменты этих антител, до тех пор, пока они демонстрируют биологическую активность в соответствии с данным изобретением (см. патент США 4816567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес в данном изобретении, включают «приматизированные» антитела, включающие антиген-связывающие последовательности переменного домена, происходящие от примата, не являющегося человеком (например, обезьян Старого мира, человекообразных обезьян, и т.д.), и человеческие последовательности константных участков.

«Интактное» антитело - это антитело, содержащее антиген-связывающий участок, а также C_L и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Константные домены могут быть константными доменами природной последовательности (например, человеческими константными доменами исходной последовательности) или вариантом их аминокислотной последовательности. Предпочтительно, интактное антитело имеет одну или более эффекторных функций.

«Фрагменты антител» включают части целых антител, предпочтительно антигенсвязывающий или переменный участок целого антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, и Fv; диатела, линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител; и мультиспецифичные антитела, собранные из фрагментов антител.

Выражение «линейные антитела» обычно относится к антителам, описанным в Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995). Вкратце, эти антитела содержат пару тандемных сегментов Fd (VH-CH1-VH-CH1), которые, вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи, образуют пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифичными или моноспецифичными.

Расщепление антител папаином дает два идентичных антиген-связывающих фрагмента, называемых фрагментами "Fab", и остаточный фрагмент "Fc", обозначение отражает способность легко кристаллизоваться. Фрагмент Fab состоит из целой L цепи вместе с переменным доменом H цепи (V_H), и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_H^1). Каждый фрагмент Fab является моновалентным по отношению к связыванию антигена, т.е. имеет единственный участок связывания антигена.

Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент $F(ab')_2$, который грубо соответствует двум связанным дисульфидными мостиками фрагментам Fab, имеющим дивалентную антиген-связывающую активность и все еще способным перекрестно сшивать антиген. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab тем, что они имеют несколько дополнительных аминокислотных остатков на C-конце домена C_H1 ,

включая один или более цистеиновых остатков из шарнирного участка антитела. Fab'-SH - это использованное здесь обозначение для Fab', в котором один или более цистеиновых остатков константного домена несут свободную тиоловую группу.

Фрагменты антител $F(ab')_2$ были изначально получены как пары фрагментов Fab',

имеющие шарнирные остатки цистеина между ними. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

Фрагмент Fc включает C-концевые участки обеих цепей H, связанные вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определены последовательностями в
5 участке Fc, который также является частью, узнаваемой рецепторами Fc (FcR), обнаруженными на некоторых типах клеток.

"Fv" является минимальным фрагментом антитела, содержащим полный участок узнавания и связывания антигена. Этот фрагмент представляет собой димер,
10 состоящий из одного переменного участка тяжелой и одного легкой цепей, находящихся в тесной, нековалентной связи. В результате связывания этих двух доменов образуются шесть гипервариабельных петель (по 3 петли от H и L цепей), которые содержат аминокислотные остатки, участвующие в связывании антигена, и придают специфичность связывания антигена с антителом. Однако даже
15 единственный переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) имеет способность узнавать и связывать антиген, хотя и с более низким сродством по сравнению с целым участком связывания.

«Одноцепочечные Fv», также сокращаемые как "sFv" или "scFv", являются
20 фрагментами антител, которые включают домены антител V_H и V_L, присоединенные к одной полипептидной цепи. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий sFv сформировать структуру, требуемую для связывания антигена. Для описания sFv см. Pluckthun in The
25 Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, ниже.

Термин «диатела» относится к малым фрагментам антител, получаемым конструированием фрагментов sFv (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (приблизительно 5-10 остатков) между доменами V_H и V_L, таким образом достигается
30 спаривание доменов V между цепями, а не внутри цепи, что приводит к образованию бивалентного фрагмента, например, фрагмента, имеющего два участка связывания антигена. Биспецифические диатела являются гетеродимерами двух «скрещенных» фрагментов sFv, в которых домены двух антител V_H и V_L присутствуют в различных
35 полипептидных цепях. Диатела описаны более полно, например, в EP 404097, WO 93/11161; и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

«Гуманизированные» формы нечеловеческих антител (например, антител грызунов) являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из нечеловеческих антител. Главным образом,
40 гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (антителами-реципиентами), в которых остатки гипервариабельного участка реципиента заменены остатками гипервариабельного участка антитела (донорного антитела) от вида, не являющегося человеком, такого как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющего желаемую специфичность, сродство и
45 возможности. В некоторых случаях остатки структурного региона (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не встречающиеся ни в реципиентном, ни в донорном антителе. Эти модификации сделаны для дальнейшего
50 улучшения эффективности антитела. Обычно, гуманизированное антитело включает в основном все из по меньшей мере одного, а обычно двух, переменных доменов, в которых все или в основном все гипервариабельные петли соответствуют имеющимся в нечеловеческом иммуноглобулине и все или в основном все FR являются FR из

человеческой последовательности иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут также включать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), обычно от человеческого иммуноглобулина. Для большего количества деталей см. Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

«Видозависимое антитело» это антитело, которое имеет большее сродство при связывании с антигеном от одного вида млекопитающих, чем с его гомологом от другого вида млекопитающих. Обычно, видозависимые антитела «специфически связываются» с человеческим антигеном (т.е. имеют значение сродства при связывании (Kd) не больше чем 1×10^{-7} М, предпочтительно не больше чем 1×10^{-8} , и наиболее предпочтительно не более чем 1×10^{-9} М), но имеют сродство при связывании с гомологом антигена из другого, отличного от человека вида млекопитающих, которое по меньшей мере приблизительно в 50 раз, или по меньшей мере приблизительно в 500 раз, или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз, слабее чем сродство его связывания с человеческим антигеном. Видозависимые антитела могут принадлежать к любому из различных типов антител, определенных выше, но предпочтительно являются гуманизированными или человеческими антителами.

В таких вариантах осуществления, степень связывания полипептида, антитела, антагониста или композиции с «нецелевым» белком будет менее чем приблизительно 10% от связывания полипептида, антитела, антагониста или композиции с белком, являющимся его непосредственной целью по данным анализа методом активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) или радиоиммунной преципитации (RIA). Что касается связывания полипептида, антитела, антагониста или композиции с молекулой-мишенью, термин «специфическое связывание», или «специфически связывается с», или «специфично» для конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени означает связывание, которое является измеримо отличным от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно является молекулой сходной структуры, которая не имеет связывающей активности. Например, специфическое связывание может быть определено методом конкуренции с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание будет показано, если связывание меченой мишени с зондом будет конкурентно подавлено избытком немеченой мишени. Используемый здесь, термин «специфическое связывание», или «специфически связывается с», или «специфично для» конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени может быть проиллюстрирован, например, молекулой, имеющей Kd по отношению к мишени не менее чем приблизительно 10^{-4} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-5} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-6} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-7} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-8} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-9} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-10} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-11} М, альтернативно не менее чем приблизительно 10^{-12} М или лучше. В одном варианте осуществления, термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом конкретного полипептида при отсутствии значительного связывания с любым другим

полипептидом или эпитопом полипептида.

Термин «эффекторные функции» антитела относится к биологическим активностям, приписываемым участку Fc (участку Fc природной последовательности или варианту аминокислотной последовательности участка Fc) антитела и изменяется с изотипом антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание рецептора Fc; антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности; и активацию В-клеток.

Термин «естественная последовательность участка Fc» подразумевает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности участка Fc, обнаруженной в природе. Примеры последовательностей Fc описаны, например, но не ограничены Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Термин «вариант Fc участка» подразумевает аминокислотную последовательность, которая отличается от природной последовательности участка Fc преимуществом наличия по меньшей мере одной «аминокислотной модификации», описанной в данном изобретении. Предпочтительно, вариант участка Fc имеет не менее одной аминокислотной замены по сравнению с природной последовательностью участка Fc или с участком Fc исходного полипептида, например от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в природной последовательности участка Fc или в участке Fc исходного полипептида. В одном варианте осуществления вариант участка Fc, описанного здесь, будет иметь не менее чем приблизительно 80% гомологии, не менее чем приблизительно 85% гомологии, не менее чем приблизительно 90% гомологии, не менее чем приблизительно 95% гомологии, или не менее чем приблизительно 99% гомологии с участком Fc природной последовательности. В соответствии с другим вариантом осуществления, вариант участка Fc, описанного здесь, будет иметь не менее чем приблизительно 80% гомологии, не менее чем приблизительно 85% гомологии, не менее чем приблизительно 90% гомологии, не менее чем приблизительно 95% гомологии, или не менее чем приблизительно 99% гомологии с участком Fc исходного полипептида.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» или «гомологии аминокислотной последовательности» по отношению к приведенным здесь полипептидным последовательностям определяется как процент в обсуждаемой последовательности аминокислотных остатков, идентичных аминокислотным остаткам в сравниваемом полипептиде после выравнивания и, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей, введения разрывов, причем консервативные замены не считаются частью идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения % идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, находящимися в пределах знаний специалиста в данной области техники, например, с использованием общественно доступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения гомологии, включая алгоритмы, требующиеся для достижения максимальной гомологии в пределах полной длины сравниваемых последовательностей. Однако для решаемых здесь

задач % идентичности аминокислотных последовательностей были получены с применением компьютерной программы сравнения последовательностей программы ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc, исходный код был
 5 внесен в реестр вместе с документацией пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он был зарегистрирован под регистрационным номером США TXU510087. Программа ALIGN-2 доступна публично через Genentech, Inc., South San Francisco, California. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для
 10 использования в операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой системе UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей были заданы программой ALIGN-2 и не изменялись.

Термин «полипептид, включающий участок Fc» относится к полипептиду, такому как антитело или иммуноадгезин (см. определения выше), включающему участок Fc.
 15 Лизин, находящийся на С-конце (остаток 477 в соответствии с системой нумерации EU) участка Fc, может быть удален, например, в процессе очистки полипептида или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Соответственно, композиция, содержащая полипептиды, включая антитела, имеющие
 20 участок Fc в соответствии с данным изобретением, может содержать популяции полипептидов, в которых все остатки K447 удалены, полипептидные популяции, в которых не удалено ни одного остатка K447, или полипептидные популяции, имеющие смесь полипептидов, имеющих и не имеющих остатка K447.

В пределах настоящей спецификации и формулы изобретения по отношению к
 25 остаткам в переменном домене (приблизительно, остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) обычно использована система нумерации по Kabat (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или
 30 «индекс EU» обычно используется при ссылке на остаток в константном участке тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU приведен в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), кратко приведенном здесь в виде ссылки). Если
 35 не указано иное, ссылки на номера остатков в переменном домене антител подразумевают нумерацию остатков по системе нумерации Kabat. Если не указано иное, ссылки на номера остатков в константном домене антител подразумевают нумерацию остатков по системе нумерации EU.

Термины «рецептор Fc» или «FcR» использованы для описания рецептора, который
 40 связывается с участком Fc антитела. В одном варианте осуществления FcR согласно данному изобретению связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют
 45 сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся в основном в их цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в цитоплазматическом домене основанный на тирозине участок активации (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в цитоплазматическом домене
 50 основанный на тирозине ингибирующий участок (ITIM) (см. обзорную публикацию M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Термин включает аллотипы, такие как аллотипы FcγRIIA: FcγRIIA-Phe158, FcγRIIA-Val158, FcγRIIA-R131 и/или FcγRIIA-H131. FcR рассматриваются в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991);

Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут обнаружены в будущем, также охватываются здесь термином «FcR». Термин также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

Термин «FcRn» относится к неонатальному рецептору Fc (FcRn). FcRn по структуре сходен с главным комплексом гистосовместимости (МНС) и состоит из V-цепи, нековалентно связанной с ϵ 2-микроглобулином. Многочисленные функции неонатального рецептора Fc FcRn рассматриваются в Ghetie and Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766. FcRn играет роль в пассивной доставке иммуноглобулинов IgG от матери к детенышу и регуляции уровней сывороточного IgG. FcRn может выступать как рецептор реутилизации, связывая и транспортируя пиноцитированные IgG в интактном виде внутрь клеток и через них, позволяя им избежать обычного метаболического пути, приводящего к их деградации.

В WO00/42072(Presta) и Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) описаны варианты антител с увеличенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций приведено здесь в виде ссылки.

«Домен CH1» человеческого участка Fc IgG (также называемый доменом «C1» или «H1») обычно имеет протяженность от приблизительно 118 аминокислоты до приблизительно 215 аминокислоты (по системе нумерации EU).

Термин «шарнирный участок» обычно определяется как протяженность от Glu216 до Pro230 человеческого IgG1 (Burton, Molec. Immunol.22: 161-206 (1985)). Шарнирные участки других изоформ IgG могут быть выровнены с последовательностью IgG1 при помощи установки первого и последнего оснований цистеина, формирующих связи S-S между тяжелыми цепями в одно положение.

«Нижний шарнирный участок» участка Fc обычно определяется как протяженность оснований непосредственно на C-конце шарнирного участка, т.е. остатки от 233 до 239 участка Fc. В предшествующих работах связывание с FcR обычно приписывалось аминокислотным остаткам в нижнем шарнирном участке участка Fc IgG.

«Домен CH2» человеческого участка Fc IgG (также упоминаемый как домен «C2» или «H2») обычно находится в области от 231 аминокислоты до 340 аминокислоты. Домен CH2 является уникальным в том, что он не является близко спаренным с другим доменом. Вместо этого между двумя доменами CH2 интактной молекулы природного IgG находятся две N-связанные разветвленные углеводные цепочки. Было сделано предположение, что углеводы могут заменять спаривание домена с доменом и способствовать стабилизации домена CH2. Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985).

«Домен CH3» (также упоминаемый как домен «C2» или «H3») включает протяженность остатков на C-конце домена CH2 в участке Fc (т.е. приблизительно от аминокислотного остатка 341 до C-конца последовательности антитела, обычно на аминокислотном остатке 446 или 447 IgG).

«Функциональный участок Fc» имеет «эффекторные функции» природной последовательности участка Fc. Примеры «эффекторной функции» включают связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; зависящую от антител опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (т.е. рецепторов В-клеток, BCR), и т.д. Подобные эффекторные функции обычно требуют комбинации участка Fc со связывающим доменом (например, с переменным

доменом антитела) и могут быть оценены с применением различных анализов, например, как раскрыто в данном описании.

«C1q» является полипептидом, который включает сайт связывания участка Fc с иммуноглобулином. C1q вместе с двумя сериновыми протеазами, C1r и C1s, образуют комплекс C1, первый компонент пути комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Человеческий C1q может быть приобретен на коммерческих основаниях, например у Quidel, San Diego, CA.

Термин «домен связывания» относится к участку полипептида, который связывается с другой молекулой. В случае FcR, домен связывания может включать часть его полипептидной цепочки (например, его альфа цепи), которая отвечает за связывание Fc участка. Одним из полезных доменов связывания является внеклеточный домен альфа цепи FcR.

Антитело или пептитело с вариантом Fc IgG с «измененным» средством связывания FcR или активностью ADCC имеет увеличенную или уменьшенную способность связывать FcR (например, Fc γ R или FcRn) и/или активность ADCC по сравнению с исходным полипептидом или с полипептидом, включающим исходную последовательность участка Fc. Вариант Fc, который «демонстрирует улучшенное связывание» с FcR, связывается по меньшей мере с одним FcR с более высоким средством (то есть с более низким значением Kd или IC50), чем исходный полипептид или IgG Fc с природной последовательностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, увеличение связывания по сравнению с исходным полипептидом может быть приблизительно 3-кратным, предпочтительно приблизительно 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, или 500 кратным, или от приблизительно 25% до 1000% улучшения связывания. Вариант полипептида, который «демонстрирует пониженное связывание» с FcR связывается по меньшей мере с одним FcR с более низким средством (то есть с более высоким значением Kd или IC50), чем исходный полипептид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, уменьшение связывания по сравнению с исходным полипептидом может быть приблизительно на 40% или более.

Термин «антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретированные Ig связываются с рецепторами FcR, присутствующими на некоторых цитотоксичных клетках (например, клетках - естественных киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяя этим цитотоксическим клеткам-эффекторам специфически связываться с несущими антиген клетками-мишенями и впоследствии убивать клетки-мишени при помощи цитотоксинов. Антитела «взводят» цитотоксические клетки и являются абсолютно необходимыми для подобного уничтожения. Основные клетки, являющиеся медиаторами ADCC, клетки NK экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR в гематопоезических клетках обобщена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Для оценки активности ADCC интересующей молекулы может быть проведено исследование ADCC *in vitro*, как описано в патенте США № 5500362 или 5821337 или в Примерах ниже. Применяемые для таких исследований эффекторные клетки включают одноядерные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-убийцы (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC интересующей молекулы может быть исследована *in vivo*, например на модели на животных, такой как раскрыта в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

Полипептид, включающий вариант участка Fc, который «демонстрирует увеличенную ADCC» или является медиатором антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC) в присутствии человеческих клеток-эффекторов более эффективно, чем полипептид, имеющий Fc IgG дикого типа или исходный полипептид, является значительно более эффективным *in vitro* или *in vivo* в качестве медиатора ADCC, если количества полипептида с вариантом участка Fc и полипептида с участком Fc дикого типа (или родительским полипептидом) в исследовании являются практически одинаковыми. Обычно такие варианты определяются с использованием исследований ADCC *in vitro*, таких как описанные здесь, однако подразумеваются и другие анализы или методы определения активности ADCC, например в модели на животных и т.д. В одном варианте осуществления предпочтительный вариант более эффективен в качестве медиатора ADCC по сравнению с Fc дикого типа (или исходным полипептидом) в приблизительно от 5 до приблизительно 100 раз, например, в приблизительно от 25 до приблизительно 50 раз.

Термин «комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клеток-мишеней в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента начинается со связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с узнаваемым ими антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Варианты полипептида с измененными аминокислотными последовательностями участка Fc и уменьшенная или увеличенная способность к связыванию C1q описаны в патенте США № 6194551B1 и WO99/51642. Содержание этих публикаций непосредственно приведено здесь в виде ссылки. См. также Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Термин «человеческие клетки-эффекторы» обозначает лейкоциты, экспрессирующие один или более FcR и выполняющие эффекторные функции. Согласно одному осуществлению клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют ADCC эффекторные функции. Примеры человеческих лейкоцитов, которые являются медиаторами ADCC, включают одноядерные клетки периферийной крови (PBMC), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; предпочтительны PBMC и клетки NK. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например из крови или PBMC, как описано здесь.

Методы измерения связывания с FcRn известны (см., например, Ghetie 1997, Hinton 2004), а также описаны в примерах ниже. Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и период жизни связывающихся с человеческим FcRn с высоким сродством полипептидов могут быть изучены, например, на трансгенных мышах или трансфицированных линиях человеческих клеток, экспрессирующих человеческий FcRn, или на приматах, которым введен вариант полипептида Fc. В одном варианте осуществления антитела против альфа5бета1, имеющие измененный Fc IgG в соответствии с изобретением, демонстрировали увеличенное сродство связывания с человеческим FcRn по сравнению с полипептидом, имеющим Fc IgG дикого типа, не менее чем в 2 раза, не менее чем в 5 раз, не менее чем в 10 раз, не менее чем в 50 раз, не менее чем в 60 раз, не менее чем в 70 раз, не менее чем в 80 раз, не менее чем в 100 раз, не менее чем в 125 раз, не менее чем в 150 раз. В определенном варианте осуществления сродство связывания с человеческим FcRn увеличилось

приблизительно в 170 раз.

В одном варианте осуществления EC50 или кажущаяся Kd (при pH 6,0) полипептида для сродства связывания с FcRn была меньше чем 1 мкМ, более предпочтительно менее или равна 100 нМ, более предпочтительно менее или равна 10 нМ. В одном варианте осуществления для увеличенного сродства связывания с FcγRIII (F158; т.е. изотип с низким сродством) EC50 или кажущаяся Kd была менее или равна 10 нМ, а для FcγRIII (V158; изотип с высоким сродством) EC50 или кажущаяся Kd была менее или равна 3 нМ. В соответствии с другим вариантом осуществления, уменьшение связывания антитела с рецептором Fc относительно контрольного антитела (например, антитела Herceptin®) может считаться значительным по отношению к контрольному антителу, если соотношение значений поглощения в средней точке кривых связывания испытуемого антитела и контрольного антитела (например, $A_{450\text{нм}}(\text{антитело})/A_{450\text{нм}}(\text{контрольное антитело})$) меньше или равно 40%. В соответствии с другим вариантом осуществления, увеличение связывания антитела с рецептором Fc относительно контрольного антитела (например антитела Herceptin®) может быть сочтено значительным по отношению к контрольному антителу, если соотношение значений поглощения в средней точке кривых связывания испытуемого антитела и контрольного антитела (например, $A_{450\text{нм}}(\text{антитело})/A_{450\text{нм}}(\text{контрольное антитело})$) больше или равно 125%. См., например, Пример 16.

«Исходный полипептид» или «исходное антитело» является полипептидом или антителом, включающим аминокислотную последовательность, из которой возник измененный полипептид или антитело и с которым производится сравнение измененного полипептида или антитела. Обычно исходный полипептид или исходное антитело не имеет одной или более модификаций участка Fc, описанных здесь, и отличается от измененного полипептида, описанного здесь, по эффекторным функциям. Исходный полипептид может включать природную последовательность участка Fc или участок Fc с уже имеющимися модификациями аминокислотной последовательности (такими как присоединения, делеции и/или замены).

Антитела в соответствии с данным изобретением могут быть получены при помощи фагового дисплея. Использованный здесь термин «библиотека» относится к множеству последовательностей антител, или фрагментов антител, или нуклеиновых кислот, которые кодируют эти последовательности, последовательности имеют различия в комбинации изменяемых аминокислот, которые были введены в эти последовательности в соответствии со способами изобретения.

«Фаговый дисплей» - это методика, с помощью которой варианты полипептидов демонстрируются в виде слитных белков в качестве по меньшей мере части белка оболочки фаговых частиц, например, нитчатого фага. Полезность фагового дисплея заключается в том, что большие библиотеки случайных вариантов белка могут быть быстро и эффективно отсортированы по наличию последовательностей, которые связывают антиген-мишень с высоким сродством. Отображение пептидных и белковых библиотек на фагах применяется для проверки миллионов полипептидов на предмет имеющих конкретные особенности связывания. Методы поливалентных фаговых дисплеев использованы для демонстрации малых случайных пептидов и малых белков путем слияния их или с геном III, или с геном VIII нитевидного фага. Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362 (1992) и цитируемые там ссылки. В моновалентном фаговом дисплее протеиновая или пептидная библиотека слита с геном III или его частью и экспрессируется на низких уровнях в присутствии гена III дикого типа, так что фаговые частицы демонстрируют одну копию или не

демонстрируют слитных белков. По сравнению с поливалентным фагом авидность уменьшена, так что используется сортировка на основе существенного сродства к лигандам, и фагмидные векторы, которые облегчают манипуляции с ДНК. Lowman and Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991).

5 «Фагмида» - это плазмидный вектор, имеющий бактериальную точку инициации репликации, например ColE1, и копию межгенного участка бактериофага. Фагмида может быть использована с любым известным бактериофагом, включая нитевидные бактериофаги и лямбдоидные бактериофаги. Плазмида также обычно содержит
10 маркер отбора по устойчивости к антибиотикам. Сегменты ДНК, клонированные в эти векторы, могут передаваться как плазмиды. Когда клетки, содержащие эти векторы, снабжаются всеми генами, необходимыми для продукции фаговых частиц, способ репликации плазмид изменяется на репликацию по принципу катящегося кольца для получения копий одной цепи плазмидной ДНК и упаковки фаговых частиц.
15 Фагмиды могут образовывать инфекционные и неинфекционные фаговые частицы. Этот термин подразумевает фагмиды, содержащие ген фагового белка оболочки или его фрагмент, связанный с геном гетерологичного полипептида так, что в результате слияния генов гетерологичный полипептид демонстрируется на поверхности фаговой
20 частицы.

Термин «фаговый вектор» обозначает двухцепочечную репликационную форму бактериофага, содержащую гетерологичный ген и способную реплицироваться. Фаговый вектор имеет фаговую точку инициации репликации, позволяющую репликацию фага и образование фаговой частицы. Фаг предпочтительно является
25 нитевидным бактериофагом, таким как M13, fl, fd, фагом Pf3 или их производным, или лямбдоидным фагом, таким как лямбда, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, и т.д., или их производным.

Ковалентные модификации полипептидов, такие как пептитела, иммуноадгезины, антитела и короткие пептиды, включены в область действия данного изобретения.
30 Один способ ковалентной модификации включает проведение реакции целевых аминокислотных остатков полипептида с органическим модифицирующим реактивом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или с N- или C-концевыми остатками полипептида. Модификация бифункциональными реактивами
35 полезна, например, для создания поперечных сшивок полипептида с водонерастворимой поддерживающей матрицей или поверхностью для применения в способе очистки антител, и наоборот. Обычно используемые сшивающие реагенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, эфиры N-
40 гидроксисукцинимиды, например, эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые эфиры, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат), бифункциональные малемиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан, и реагенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дителио]пропиоимидат.

45 Другие модификации включают деамидирование глутаминовых и аспарагиновых остатков до соответствующих глутаминовых и аспартиловых остатков, соответственно, гидроксисалицилата пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериловых или треониловых остатков, метилирование α -аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], ацетилирование N-концевого амина, амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.
50

Другие модификации включают конъюгацию с антагонистами токсинов, таких как майтанзин и майтанзиноиды, калихеамицин и другие цитотоксические вещества.

Другой тип ковалентной модификации полипептидов включает связывание полипептида с одним или с разнообразными непротеиновыми полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксикаллены, способом, изложенным в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

Полипептид в соответствии с представленным изобретением может также быть модифицирован, если это принесет пользу, таким образом, чтобы формировать химерную молекулу, включающую полипептид, слитый с другим, гетерологичным полипептидом или аминокислотной последовательностью (например, иммуноадгезины или пептитела).

В одном варианте осуществления, подобные химерные молекулы включают полипептид, слитый с доменом трансдукции белка, который нацеливает полипептид на доставку в различные ткани, а более конкретно через гематоэнцефалический барьер, с применением, например, домена трансдукции белка ТАТ вируса иммунодефицита человека (Schwarze et al., 1999, Science 285: 1569-72).

В другом варианте осуществления, такая химерная молекула включает полипептид, слитый с полипептидом-меткой, который обеспечивает эпитоп, с которым могут селективно связываться антитела против метки. Эпитоп-метка обычно располагается на амино- или карбоксильном конце полипептида. Присутствие подобных помеченных эпитопом форм полипептида может быть обнаружено с применением антител против полипептида-метки. Также присутствие эпитопа-метки позволяет легко очищать полипептид способом аффинной очистки с применением антитела против метки или другого типа аффинной матрицы, которая связывает метку-эпитоп. В уровне техники известны различные полипептиды-метки и соответствующие им антитела. Примеры включают метки поли-гистидин (poly-His) или поли-гистидин-глицин (poly-His-gly); полипептидную метку flu HA и ее антитело 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; метку с-мус и антитела к ней 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology. 5:3610-3616 (1985)]; метку гликопротеина D вируса простого герпеса (gD) и антитела к нему [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Другие полипептиды-метки включают пептид Flag [Hopp et al., BioTechnology. 6:1204-1210 (1988)]; пептид эпитопа КТ3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; пептид эпитопа α -тубулина [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; и пептидную метку гена белка 10 T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6393-6397 (1990)].

В альтернативном варианте осуществления, химерная молекула может включать полипептид, слитый с иммуноглобулином или определенным участком иммуноглобулина. Для бивалентной формы химерной молекулы (например, «иммуноадгезина») подобное слияние может быть проведено с участком Fc молекулы IgG. Слитные Ig согласно данному изобретению включают полипептиды, которые включают приблизительно или только остатки 94-243, остатки 33-53, или остатки 33-52 от человека вместо по меньшей мере одного переменного участка в молекуле Ig. В особо предпочтительном варианте осуществления, слитный иммуноглобулин включает шарнирный участок и участки CH2 и CH3 или шарнирный участок и участки CH1, CH2 и CH3 молекулы IgG1. Получение слитных иммуноглобулинов также описано в патенте США № 5428130, от 27 июня 1995 г.

Изобретение предлагает способы и композиции для ингибирования или

предотвращения рецидивов роста опухолей или рецидивов роста раковых клеток. В различных вариантах осуществления, рак представляет собой рецидив роста опухолей или рецидив роста раковых клеток в случае, если количество раковых клеток заметно не уменьшилось, или увеличилось, или размер опухоли значительно не уменьшился, или увеличился, или оказываются неудачными попытки дальнейшего уменьшения размера или числа раковых клеток. Определение, являются ли раковые клетки рецидивом роста опухоли или рецидивом роста раковых клеток, проводится *in vivo* или *in vitro* любым способом для оценки эффективности воздействия на раковые клетки, известным в области техники. Опухоль, устойчивая к лечению против VEGF, является примером рецидива роста опухоли.

«Эффективное количество» полипептида, антитела, антагониста или композиции, описанной здесь, соответствует количеству, достаточному для выполнения определенного заявленного назначения. «Эффективное количество» может быть определено эмпирически и при помощи известных способов, относящихся к заявленному назначению.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, полипептида или антагониста согласно данному изобретению, эффективному для «лечения» заболевания или расстройства у млекопитающего (то есть пациента). В случае рака, терапевтически эффективное количество препарата может уменьшать количество раковых клеток; уменьшать размер или вес опухоли; подавлять (т.е. замедлять до некоторой степени или, предпочтительно, останавливать) инфильтрацию рака в периферийные органы; подавлять (т.е. замедлять до некоторой степени или, предпочтительно, останавливать) метастазы опухоли; подавлять, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. Для того чтобы препарат мог предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, он должен быть цитостатическим и/или цитотоксическим. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество является количеством, подавляющим рост. В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество является количеством, которое улучшает выживание пациента без прогрессирования. В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество является количеством, которое продлевает срок жизни пациента.

В случае лечения ран термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству препарата, эффективному для ускорения или улучшения заживления ран у субъекта. Терапевтическая доза представляет собой дозу, которая демонстрирует терапевтический эффект на пациенте, а субтерапевтическая доза представляет собой дозу, не демонстрирующую терапевтического эффекта на пациенте, подвергающемся лечению.

Термин «хроническая рана» относится к ране, которая не заживает. См., например, Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994). Хронические раны включают, но не ограничены, например, артериальными язвами, диабетическими язвами, пролежнями, трофическими язвами и т.д. Острая рана может развиваться в хроническую рану. Острые раны включают, но не ограничены, ранами, вызванными, например, термическими повреждениями, травмами, хирургией, удалением экстенсивного рака кожи, глубокими грибковыми и бактериальными инфекциями, васкулитами, склеродермией, пемфигоидом, токсическим некрозом эпителия и т.д. См., например, Buford, Wound Healing and Pressure Sores, HealingWell.com, опубликовано: 24 октября 2001. Термин

«обычная рана» относится к ране, которая подвергается обычному заживлению ран.

Термин «ингибирующее рост количество» полипептида, антитела, антагониста или композиции согласно данному изобретению обозначает количество, способное подавлять рост клеток, особенно опухолевых, например, раковых клеток, как *in vitro*, так и *in vivo*. Ингибирующее рост количество полипептида, антитела, антагониста или композиции согласно данному изобретению для ингибирования роста неопластических клеток может быть определено эмпирически или известными способами, или как в приведенных здесь примерах.

Термин «цитотоксическое количество» полипептида, антитела, антагониста или композиции согласно данному изобретению обозначает количество, способное вызывать разрушение клеток, в особенности опухолевых, например раковых клеток, как *in vitro*, так и *in vivo*. Цитотоксическое количество полипептида, антитела, антагониста или композиции согласно данному изобретению для ингибирования роста неопластических клеток может быть определено эмпирически или известными в области техники способами.

Термин «аутоиммунное заболевание» здесь означает заболевание или расстройство, имеющее происхождение от собственных тканей индивидуума и направленное против них же или их совместное проявление или симптомы, а также возникающее из-за этого состояние. Примеры аутоиммунных заболеваний или расстройств включают, но не ограничены артритами (ревматоидный артрит, таким как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагрический артрит, острый подагрический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориазный артрит, артрит позвоночника, и юношеский ревматоидный артрит, остеоартрит, ревматоидный артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, и анкилозирующий спондилит), воспалительными гиперпролиферативными болезнями кожи, псориазом, таким как пятнистый псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, дерматитом, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, герпетический дерматит, и атопический дерматит, связанным с X-хромосомой синдромом повышенного IgM, крапивницей, такой как хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, полимиозитом/дерматомиозитом, юношеским дерматомиозитом, токсическим некрозом эпидермиса, склеродермией (включая системную склеродермию), склерозом, таким как системный склероз, рассеянным склерозом (MS), таким как спино-оптический MS, первичный прогрессирующий MS, и MS ремиттирующего течения, прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, болезнь Шарко-Вульпиана, и атактический склероз, воспалительным заболеванием кишечника (IBD) (например, болезнь Крона, колиты, такие как язвенный колит, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит, и трансмуральный колит и аутоиммунные воспалительные заболевания кишечника), гангренозной пиодермией, узловатой эритемой, первичным склерозирующим холангитом, эписклеритом, синдромом дыхательной недостаточности, синдромом расстройства дыхания у взрослых или острым синдромом дыхательной недостаточности (ARDS), менингитом, воспалением любого участка сосудистой оболочки глазного яблока, иритом, хороидитом, и аутоиммунным гематологическим расстройством, ревматоидным спондилитом, внезапной потерей слуха, опосредованными IgE заболеваниями, такими как анафилактический, аллергический и

атопический риниты, энцефалитами, такими как энцефалит Рамуссена и лимбические энцефалиты и/или энцефалиты ствола мозга, увеитами, такие как передний увеит, острым передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантигенный увеит, задний увеит, или аутоиммунный увеит,

5
гломерулонефритом (GN) с нефротическим синдромом или без него, таким как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный GN, иммуноопосредованный GN, мембранный GN (мембранная нефропатия), идиопатический мембранный GN, мембранный пролиферативный GN (MPGN),

10
включая тип I и тип II, и быстрый прогрессирующий GN, аллергическими состояниями, аллергическими реакциями, экземой, включая аллергическую или атопическую экзему, астмой, такой как бронхиальная астма, и аутоиммунная астма, состояниями, вовлекающими инфильтрацию Т-клеток и хроническими воспалительными ответами, хроническими легочными воспалительными болезнями, аутоиммунными

15
миокардитами, недостаточностью адгезии лимфоцитов, системной красной волчанкой (SLE) или системными красными волчанками, такими как кожная SLE, подострая системная красная волчанка, красная волчанка новорожденных (NLE), распределенная красная волчанка, волчанка (включая нефритную, энцефалитную, педиатрическую, почечную, дискоидную, алопецическую), юношеским сахарным

20
диабетом (тип I), сахарным диабетом, включая педиатрический инсулин-зависимый сахарный диабет (IDDM), сахарный диабет взрослых (диабет II типа), аутоиммунные диабететы, идиопатический несахарный диабет; иммунными ответами, связанными с гиперчувствительностью немедленного и замедленного типа, опосредованными

25
цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулезом, саркоидозом, грануломатозом, включая лимфоматоидный грануломатоз, грануломатоз Вегнера, агранулоцитоз, васкулитами, включая васкулиты (включая ревматическую полимиаглию и гигантоклеточные артериты (артериты Такаясу), васкулитами средних сосудов

30
(включая болезнь Кавасаки и нодозный полиартрит), микроскопическим полиартритом, васкулитами ЦНС, некротизирующими, кожными или аллергическими васкулитами, системными некротизирующими васкулитами, и ANCA-ассоциированными васкулитами, такими как васкулит или синдром Чурга-Штраусса (CSS), временным артритом, апластической анемией, аутоиммунной

35
апластической анемией, положительной анемией Кумба аутоиммунная гемолитическая анемия с неполными тепловыми агглютинидами, анемией Даймонда-Блекфена, гемолитической анемией или иммунной гемолитической анемией, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), пернициозную анемию, болезнь

40
Аддисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (PRCA), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную нейтропению, панцитопению, лейкопению, заболевания, вовлекающими диапедез лейкоцитов, воспалительными расстройствами ЦНС, синдромами повреждения множественных органов, такими как вторичные после сепсиса, травмы или кровотечения, заболеваниями,

45
опосредованными комплексом антиген-антитело, заболевание базальной мембраны клубочков, синдром противифосфолипидных антител, аллергическими невритами, болезнью Бечета и Бехчета, синдромом Кастрлмана, синдромом Гудпастера, синдромом Рейно, синдромом Шегрена, синдромом Стивенса-Джонсона,

50
пемфигоидом, таким как буллезным пемфигоид и пемфигоид кожи, пузырьчаткой (включая обыкновенную пузырьчатку, листовидную пузырьчатку, пемфигоид слизистых оболочек и эритематозную пузырьчатку), аутоиммунными полиэндокринопатиями, болезнью или синдромом Рейтера, иммунокомплексными нефритами,

опосредованными антителами нефритами, хронической нейропатией, такой как нейропатии IgM или IgM-опосредованные нейропатии, тромбоцитопенией (развивающейся, например, у пациентов с инфарктом миокарда), включая тромбоцитопеническую тромбогемолитическую пурпуру (ТТР) и аутоиммунную или иммуно-опосредованную тромбоцитопению, такую как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТР), включая хроническую или острую ИТР, аутоиммунным заболеванием семенников и яичников, включая аутоиммунные орхиты и оофориты, первичным гипотиреозом, гипопаратиреоидизмом, аутоиммунными эндокринными заболеваниями, включая тиреоидиты, такие как аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото), или подострым тиреоидит, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, идиопатический гипотиреоидизм, болезнь Грейва, полигранулярными синдромами, такими как аутоиммунные полигранулярные синдромы (или полигранулярные эндокринопатические синдромы), паранеопластическими синдромами, включая неврологические нейропластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Итона-Ламберта, синдром «жесткого человека» или «жесткой персоны», энцефаломиелитами, такими как аллергический энцефаломиелит или *encephalomyelitis allergica* и экспериментальные аллергические энцефаломиелиты (ЕАЕ), злокачественной миастенией, дегенерацией мозжечка, нейромиотонией, опсоклонусом или опсоклоническим миоклоническим синдромом (OMS), и сенсорной нейропатией, синдромом Шихана, аутоиммунным гепатитом, хроническим гепатитом, люпозным гепатитом, гигантоклеточным гепатитом, хроническим активным гепатитом или аутоиммунным хроническим активным гепатитом, лимфоидным промежуточным пневмонитом, облитерирующим бронхоитом (не трансплантационным) или НВП (неспецифической промежуточной пневмонией), синдромом Гийена-Барре, болезнью Бергера (нефропатией IgA), идиопатической нейропатией IgA, линейным дерматозом IgA, первичным желчным циррозом, пневмоциррозом, аутоиммунным энтеропатическим синдромом, глютеневой болезнью, целиакией, брюшным спру (глютеневой энтеропатией), рефракторным спру, идиопатическим спру, криоглобулинемией, амилотрофическим латеральным склерозом (ALS, болезнь Лу Герига), коронарной болезнью сердца, аутоиммунным заболеванием внутреннего уха (AIED), или аутоиммунной потерей слуха, опсоклоническим миоклоническим синдромом (OMS), полихондритами, такими как рефракторный или рецидивический полихондрит, легочным альвеолярным протеинозом, амилоидозом, склеритом, не-раковым лимфоцитозом, первичным лимфоцитозом, включая моноклональный В-клеточным лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммопатию и моноклональную гаммопатию неясного значения MGUS) периферической нейропатией, паранеопластическим синдромом, каналопатиями, такими как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные расстройства, глухота, слепота, периодический паралич и каналопатиями ЦНС, аутизмом, воспалительной миопатией, фокальным сегментальным гломерулосклерозом (FSGS), эндокринной офтальмопатией, увеоретинитом, хориоретинитом, аутоиммунным гепатологическим расстройством, фибромиалгией, множественной эндокринной недостаточностью, синдромом Шмидта, адреналитом, желудочной атрофией, возрастным слабоумием, демиелинирующими заболеваниями, такими как аутоиммунные демиелинирующие заболевания, диабетическая нефропатия, синдром Дресслера, очаговая алопеция, синдром CREST (кальциноз, феномен Рейнальда, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия),

мужское и женское аутоиммунное бесплодие, смешанный коллагеноз, болезнь Чагаса, ревматическая лихорадка, повторяющийся выкидыш, «легкие фермера», экссудативная многоформная эритема, пост-кардиотомический синдром, синдром Кушинга, легочная аллергия птицеводов, аллергический грануломатозный ангиит, доброкачественным лимфотический ангиит, синдром Альпорта, альвеолитами, такими как аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит, интерстициальная болезнь легких, трансфузионная реакция, проказой, малярией, лейшманиозом, кипаносомиазом, шистосомиазом, аскаридазом, аспергиллезом, синдромом Самптера, синдромом Каплана, денге, эндокардитом, эндомиокардиальным фиброзом, легочным фиброзирующим альвеолитом, интерстициальным фиброзом легких, идиопатическим легочным фиброзом, цистическим фиброзом, эндофтальмитом, эритема *elevatum et diutinum*, врожденной анемией новорожденных, эозинофильным фасцитом, синдромом Шутьмана, синдромом Фелти, филяриозом, циклитом, таким как хронический циклит, гетерологический циклит, иридоциклит или циклит Фукса, пурпура Геноха-Шейнена, заражением вирусом иммунодефицита человека (HIV), заражением эховирусом, кардиомиопатией, болезнью Альцгеймера, заражением парвовирусом, заражением вирусом краснухи, пост-вакцинационными синдромами, врожденным заражением краснухой, заражением вирусом Эпштейна-Барра, свинкой, синдромом Эвана, аутоиммунной недостаточностью половых желез, хореей Сиденхама, пост-стрептококковыми нефритами, облитерирующим тромбангиом, тиротоксикозом, сухоткой спинного мозга, хориоретинитом, гигантоклеточной полимиаглией, эндокринной офтальмопатией, хроническим аллергическим пневмонитом, сухим кератоконъюнктивитом, эпидемическим кератоконъюнктивитом, идиопатическим нефритическим синдромом, нефропатии с минимальными изменениями, доброкачественным семейным и ишемическим реперфузионным повреждением, аутоиммунными поражениями сетчатки, воспалением суставов, бронхитами, хронической непроходимостью дыхательных путей, силикозом, молочницей, афтозным стоматитом, артериосклеротическими расстройствами, аспергимиогенезом, аутоиммунным гемолизом, болезнью Бека, криоглобулинемией, контрактурой Дюпюитрена, факоанафилактической эндофтальмией, аллергическим энтеритом, II типом лепроматозной реакции, идиопатическим лицевым параличом, синдромом хронической усталости, ревматической лихорадкой, болезнью Хаммена-Рича, сенсонейральной потерей слуха, параксизматической гомоглобинурией, гипогонадизмом, региональным илеитом, лейкопенией, инфекционным мононуклеозом, поперечным миелитом, первичной идиопатической микседемой, нефрозом, симпатической офтальмией, гранулематозным орхитом, панкреатитом, острым полирадикулоневритом, гангренозная пиодермией, подострым тиреоидитом, приобретенной спенической атрофией, бесплодностью по причине наличия антител против сперматозоидов, не-злокачественной тимомой, витилиго, болезнями, связанными с вирусами SCID и Эпштейна-Барра, синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS), паразитическими заболеваниями, такими как лейшмания, синдромом токсического шока, пищевым отравлением, состояниями, вовлекающими инфильтрацию Т-клеток, недостаточностью адгезии лейкоцитов, иммунными ответами, связанными с гиперчувствительностью немедленного и замедленного типа, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, заболеваниями, вовлекающими диапедез лейкоцитов, синдромом травм множественных органов, заболеваниями, опосредованными комплексом антиген-антитело, заболеваниями основной антигломерулярной мембраны, аллергическими невритами, аутоиммунными

полиэндокринопатиями, оофоритами, первичной микседемой, аутоиммунными атропическими гастритами, симпатической офтальмией, ревматическими заболеваниями, смешанным коллагенозом, нефротическим синдромом, инсулитами, полиэндокринной недостаточностью, периферической нейропатией, аутоиммунным полигранулярным синдромом типа I, идеопатическим гипопаратиреоидизмом взрослых (АОИ), генерализованной аллопецией, дилатационной кардиомиопатией, приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гемохроматозом, миокардитами, нефротическим синдромом, первичным склерозирующим холангитом, гнойными или негнойными синуситами, острыми или хроническими синуситами, эфимоидный, фронтальный, максиларный и офеноидный синуситы, связанными с эозинофилами расстройствами, такими как эозинофилия, легочная инфильтрационная эозинофилия, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Леффлера, хроническая эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия, бронхолегочный аспергиллез, аспергиллома или синдром Кимуры, анафилоксия, серонегативный спондилоартрит, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склера, эписклера, хронический кожно-слизистым кандидоз, синдром Брутона, временная младенческая гипогаммаглобулинемия, синдром Вискотта-Олдрича, атаксия-телангиэктазия, аутоиммунными расстройствами, связанными с коллагенозом, ревматизмом, неврологическими заболеваниями, ишемическим реперфузионное расстройством, ответом на понижение кровяного давления, сосудистой дисфункции, ангиэктазии, ранением тканей, сердечнососудистой ишемией, гипералгезией, мозговой ишемией, и болезнями, сопутствующими васкуляризацией, аллергической гиперчувствительностью, гломерулонефритами, реперфузионными повреждениями, реперфузионными повреждениями миокарда или иных тканей, дерматозами с острыми воспалительными компонентами, острыми гнойными менингитами или иными воспалительными расстройствами центральной нервной системы, синдромами, связанными с переливанием гранулоцитов, индуцируемой цитокинами токсичностью, серьезными острыми воспалениями, хроническими трудноизлечимыми воспалениями, пиелитами, пневмоциррозом, диабетической ретинопатией, диабетическим расстройством крупных артерий, внутриартериальной гиперплазией, язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, вальвулитом и эндометриозом.

Способы лечения рака могут быть оценены по показателям, например, регрессии опухоли, уменьшению веса или размера опухоли, времени прогрессирования, времени выживания, выживанию без прогрессирования, общему показателю ответа, продолжительности ответа, качества жизни, экспрессии и/или активности белка, но не ограничиваясь этими показателями. Поскольку анти-ангиогенные препараты, описанные здесь, нацелены на сосуды опухоли, а не обязательно на сами неопластические клетки, они представляют собой уникальный класс противораковых препаратов и, таким образом, требуют уникальных критериев и определений клинических ответов на препараты. Например, уменьшение опухоли более чем на 50% при 2-мерном анализе является стандартным граничным значением для подтверждения ответа. Однако антагонисты альфа5бета1 и антагонисты VEGF по изобретению могут вызывать подавление распространения метастаз без уменьшения первичной опухоли или могут просто вызывать опухолестатический эффект. Соответственно, могут быть применены подходы к определению эффективности терапии, включая, например, измерение маркеров ангиогенеза в плазме или моче и измерение ответа методом радиологической визуализации.

В зависимости от показаний для лечения и факторов, имеющих значение для

дозировки, с которыми медик-специалист в этой области должен быть знаком, антитела по изобретению будут введены в дозировке, являющейся эффективной для лечения симптомов при одновременной минимизации токсичности и побочных эффектов. Для лечения рака, аутоиммунного заболевания или иммунодефицитного заболевания терапевтически эффективная доза может находиться, например, в диапазоне от 50 мг на дозу до 2,5 г/м². В одном варианте осуществления вводились дозировки от приблизительно 250 мг/м² до приблизительно 400 мг/м² или 500 мг/м². В другом варианте осуществления, дозировка составляет приблизительно 250-375 мг/м². В еще одном варианте осуществления диапазон дозировок 275-375 мг/м².

Методы лечения связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD) могут быть оценены, но не ограничены, уменьшением скорости или предотвращением дальнейшей потери зрения. Для лечения AMD эффективность *in vivo* может быть, например, измерена одним из следующих способов: оценкой среднего изменения лучшей откорректированной визуальной активности (BCVA) от основной линии в течение заданного времени, оценкой относительного числа субъектов, потерявших менее чем 15 символов визуальной активности по сравнению с основной линией в течение определенного времени, оценкой относительного числа субъектов, приобретших число символов визуальной активности, более или равное 15 по сравнению с основной линией в течение определенного времени, оценкой относительного числа субъектов с эквивалентом визуальной активности Снеллена 20/2000 через определенное время, оценкой с помощью опросного листа визуального функционирования NEI, оценкой размера CNV и количества просачивающегося CNV за определенное время по данным флуоресцеиновой ангиографии, и т.п.

Термин «обнаружение» подразумевается включающим определение присутствия или отсутствия вещества или количественного определения количества вещества. Таким образом, термин относится к использованию материалов, композиций и методов в соответствии с представленным изобретением для качественных и количественных определений. В общем, конкретная методика, применяемая для определения, не является критичной для практического осуществления изобретения.

Например, «обнаружение» в соответствии с изобретением может включать: наблюдение присутствия или отсутствия продукта гена альфа5, молекул мРНК или полипептида альфа5; изменение в уровнях полипептида альфа5 или количества, связанного с мишенью; изменения в биологической функции/активности полипептида альфа5. В некоторых вариантах осуществления «обнаружение» может включать обнаружение уровней альфа5 дикого типа (например, уровней мРНК или полипептида). Обнаружение может включать количественное определение изменения (увеличения или уменьшения) любого значения между 10% и 90%, или любого значения между 30% и 60%, или более 100% по сравнению с контролем. Определение может включать количественную оценку изменения любого значения от 2-кратного до 10-кратного, включительно, или более, например 100-кратного.

Термин «метка», когда он использован здесь, относится к обнаруживаемому соединению или композиции, которая конъюгирована напрямую или опосредованно с антителом. Метка может быть обнаружимой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае энзиматической метки, могут катализировать являющееся обнаружимым химическое изменение субстрата, соединения или состава.

Новые антитела против альфа5бета1

Здесь предложены новые антитела, которые могут связывать человеческий альфа5бета1 и конкурентно подавлять связывание антител против альфа5бета1 с человеческим альфа5бета1. В соответствии с одним вариантом осуществления антитела против альфа5бета1 продуцируются гибридомой, выбранной из группы, состоящей из гибридомы, депонированной как Alpha5/beta1 7H5.4.2.8 (ATCC № PTA-7421), и гибридомы, депонированной как Alpha5/beta1 7H12.5.1.4 (ATCC № PTA-7420) в ATCC 7 марта 2006 г. В соответствии с другим вариантом осуществления, антитело продуцируется гибридомой, выбранной из группы, состоящей из гибридомы, депонированной как Alpha5/beta1 7H5.4.2.8 (ATCC № PTA-7421), и гибридомы, депонированной как Alpha5/beta1 7H12.5.1.4 (ATCC № PTA-7420) в ATCC 7 марта 2006 г. В соответствии с еще одним вариантом осуществления, антитело содержит последовательность вариабельного тяжелого (VH) и вариабельного легкого (VL) доменов из антител, продуцируемых гибридомой, депонированной как Alpha5/beta1 7H5.4.2.8 (ATCC № PTA-7421) в ATCC 7 марта 2006 г. В другом варианте осуществления антитело содержит последовательность вариабельного тяжелого (VH) и вариабельного легкого (VL) доменов из антител, продуцируемых гибридомой, депонированной как Alpha5/beta1 7H12.5.1.4 (ATCC № PTA-7420) в ATCC 7 марта 2006 г. Также предполагаются человеческие и химерные формы антител депонированных гибридом.

В соответствии с одним вариантом осуществления, антитело связывается с человеческим альфа5бета1 с Kd между 500 нМ и 1 пМ. В соответствии с другим вариантом осуществления, антитело не связывает альфаVбета3, или альфаVбета5, или альфаVбета1. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело включает последовательность Fc человеческого IgG, например, человеческого IgG1 или человеческого IgG4. В другом варианте осуществления последовательность Fc была модифицирована или изменена другим способом таким образом, что она лишилась эффекторной функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), часто связанной со связыванием с рецепторами Fc (FcR). Существует много примеров изменений или мутаций в последовательностях Fc, которые могут изменить эффекторные функции. Например, WO00/42072 (Presta) и Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) описывают варианты антител с улучшенным или ослабленным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций особым образом приведено здесь в виде ссылки. Антитело может быть в форме Fab, Fab', F(ab)'₂, одноцепочечного Fv (scFv), фрагмента Fv; диатела и линейного антитела. Также, антитело может быть мультиспецифичным антителом, которое связывает альфа5бета1 и является антагонистом альфа5бета1, но также связывает одну или более иных мишеней и подавляет их функцию (например, VEGF). Антитело может быть конъюгировано с терапевтическим агентом (например, цитотоксическим препаратом, радиоизотопом и химиотерапевтическим препаратом) или меткой для обнаружения альфа5бета1 в образцах от пациента или in vivo путем визуализации (например, радиоизотопом, флуоресцентным красителем и ферментом).

Также предполагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против альфа5бета1, экспрессионные векторы, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие один или оба вариабельных домена, и клетки, включающие молекулы нуклеиновой кислоты. Эти антитела могут быть использованы при терапии, описанной здесь, и для определения белка альфа5бета1 в образцах от пациентов (например, FACS, иммуногистохимия (ИГХ), анализ ИФА) или в самих пациентах.

Новые сочетания

Новые сочетания для подавления ангиогенеза и/или сосудистой проницаемости у субъекта, страдающего от заболевания, включают антагонист альфа5бета1 и антагонист VEGF. Антагонист VEGF и антагонист альфа5бета1 могут быть введены в одновременных или последовательных циклах лечения. Подобное комбинированное лечение применимо для лечения болезней, включая те болезни, которые характеризуются ненормальным ангиогенезом и/или сосудистой проницаемостью и страдающие которыми пациенты выиграют от антиангиогенезной терапии. Подобные болезни включают, но не ограничены раком, глазными болезнями и аутоиммунными болезнями. Альтернативно, субъект может подвергаться лечению антагонистом VEGF с последующим введением антагониста альфа5бета1, например лечению антагонистом VEGF до тех пор, пока субъект не перестанет реагировать на лечение антагонистом VEGF, после чего лечение субъекта антагонистом альфа5бета1. В соответствии с одним вариантом осуществления пациент подвергался лечению антагонистом VEGF, когда рак был неинвазивным и антагонистом альфа5бета1, когда рак был инвазивным. Некоторые пациенты, которые имеют повышенные уровни альфа5бета1 изначально или в ответ на терапию антагонистом VEGF относительно не страдающих заболеванием пациентов или контроля, могут быть особенно чувствительны к этому комбинаторному лечению. Предполагаются также комбинации, дополнительно включающие терапевтический препарат (например, антинеопластический препарат, химиотерапевтический препарат, ингибирующий рост препарат и цитотоксический препарат). Например, пациенты, которые должны подвергнуться химиотерапии (например, иринотеканом) и лечению антагонистами альфа5бета1 или которые подвергались химиотерапии и лечению антагонистами альфа5бета1 могут выиграть от терапии антагонистом VEGF. Альтернативно, пациенты, которые подвергались химиотерапии и лечению антагонистами VEGF могут выиграть от терапии антагонистом альфа5бета1. В одном предпочтительном варианте осуществления, антителом против VEGF является антитело Avastin®. В другом предпочтительном варианте осуществления антитела против альфа5бета1 являются описанными здесь антителами против альфа5бета1. Также предполагаются наборы, содержащие антагонист VEGF, антагонист альфа5бета1 и, необязательно, химиотерапевтический препарат.

Фармацевтические композиции

Терапевтические композиции антител, использованные в соответствии с настоящим изобретением, готовятся к хранению путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в виде лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиента в применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный или на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония, хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкиловые парабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды с низким молекулярным весом (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин,

аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды, и другие углеводороды, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие препараты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие обратные ионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-протеиновые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Иллюстративные композиции антител, описанные в WO98/56418, непосредственно приведены здесь в виде ссылки. Лиофилизированные препараты, предназначенные для подкожного введения, описаны в WO97/04801. Подобные лиофилизированные препараты могут быть восстановлены при помощи подходящего растворителя до высоких концентраций белка, восстановленные составы могут быть введены подкожно подвергающемуся здесь лечению млекопитающему.

Описанная здесь композиция может также содержать более одного активного соединения, что необходимо для лечения конкретных показаний, где предпочтительно соединения имеют комплементарные активности, которые не оказывают нежелательного действия друг на друга. Например, может быть желательным также добавление цитотоксического препарата, химиотерапевтического препарата, цитокина или иммуносупрессивного препарата (например, действующего на Т-клетки, такого как циклоспорин или антитело, которое связывает Т-клетки, например, связывающее LFA-1). Эффективное количество подобных других факторов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, типа заболевания или расстройства, подвергающегося лечению, и иных факторов, описанных выше. Они обычно используются в тех же дозировках и с использованием тех же путей введения, что и описанные выше или приблизительно от 1% до 99% использованной ранее дозировки.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, при помощи методик коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы соответственно в коллоидных системах доставки препарата (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или макроэмульсиях. Подобные методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть приготовлены препараты замедленного высвобождения. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые основы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антагонист, эти основы изготовлены в виде сформированных предметов, например, пленок или микрокапсул. Примеры основ для замедленного высвобождения включают полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат), или поли(винилалканоил)), полилактиды (патент США № 3773919) сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, недеградирующий этилен-винилацетат, деградирующие сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT™ (вводимые инъекцией микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролид) и поли-D-(-)-3-гидроксипропионовая кислота.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это может быть легко достигнуто при помощи фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Изделия и наборы

Другой вариант осуществления изобретения это изделие, содержащее материалы,

применимые для лечения опухолей, глазных заболеваний и аутоиммунных заболеваний и связанных состояний. Изделие может включать контейнер и этикетку или вкладыш, вставленный или связанный с контейнером. Применимые контейнеры включают, например, бутылки, пузырьки, шприцы, и т.п. Контейнеры могут быть
5 изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Обычно, контейнер содержит композицию, являющуюся эффективной при лечении состояния и может иметь стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может быть мешком для внутривенных вливаний или флаконом, имеющим пробку, проникаемую
10 при помощи иглы подкожного инъектора). По меньшей мере один активный ингредиент в композиции является антагонистом VEGF или антагонистом альфа5бета1, или агонистом VEGFR, или агонистом альфа5бета1 в соответствии с изобретением. Метка или вкладыш в упаковке будет также содержать инструкции по введению композиции антитела пациенту. Метка или вкладыш могут дополнительно
15 содержать инструкции по введению композиции антител пациенту. Также подразумеваются изделия и наборы, включающие комбинированную терапию, описанную здесь.

Вкладыши к упаковке относятся к инструкциям, обычно включенным в
20 коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях к применению, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждения, касающиеся применения такого терапевтического продукта. В одном варианте осуществления вкладыш в упаковке указывает, что композиция используется для лечения не-ходжкинской лимфомы.

Дополнительно, изделие может далее содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может далее содержать другие материалы, желательные с коммерческой или
30 потребительской точки зрения, включая другие буферы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

Также предлагаются наборы для различных применений, например для выделения или обнаружения альфа5бета1 и/или VEGF у пациентов, возможно в сочетании с другими изделиями. Для выделения и очистки альфа5бета1 набор может содержать
35 антитела против альфа5бета1, связанные со сферами (например, с сефарозными сферами). Могут быть предложены наборы, включающие антитела для детекции и количественной оценки альфа5бета1 и/или VEGF in vitro, например, в ELISA или вестерн-блот. Как в случае с изделием, набор содержит контейнер и метку или
40 вкладыш в упаковку на контейнере или связанный с ним. Например, контейнер содержит композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело против альфа5бета1 в соответствии с изобретением. Могут быть включены дополнительные контейнеры, содержащие, например, растворители или буферы, контрольные антитела. Метка или вкладыш в упаковке может содержать описание композиции, а
45 также инструкции по предполагаемому применению in vitro или диагностического использования.

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела могут быть получены, например, с применением
50 методов, основанных на гибридомах, например, как описанные Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены с применением методов, основанных на рекомбинантной ДНК (патент США № 4816567), или могут быть получены методами, описанными здесь в разделе «Примеры». В методе с использованием

гибридомы мышь, хомяк или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируется иммунизирующим препаратом для стимуляции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с иммунизирующим препаратом. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Иммунизирующий препарат обычно будет включать полипептид или слитный белок из интересующего белка или композицию, включающую белок. Обычно, используются или лимфоциты периферической крови (PBL), если требуются клетки человеческого происхождения, или используются клетки селезенки или лимфатического узла, если в качестве источника желательны млекопитающие, не являющиеся человеком. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией с применением подходящего препарата для слияния, такого как полиэтиленгликоль, для образования клеток гибридомы. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103. Иммортализованные линии клеток обычно являются трансформированными клетками млекопитающих, в частности, клетками миеломы, имеющими происхождение от грызунов, коров или человека. Обычно используются крысиные и мышьиные клетки миеломы. Клетки гибридомы могут быть культивированы в подходящей среде культивирования, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые подавляют рост или выживание неслитных иммортализованных клеток. Например, если в исходных клетках отсутствует фермент гипоксантин гуанин фосфорибозил трансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), эти вещества предотвращают рост клеток с дефицитом HGPRT.

Предпочтительными линиями иммортализованных клеток являются способные эффективно сливаться, поддерживающие стабильную экспрессию высокого уровня антител отобранными продуцирующими антитела клетками и являющиеся чувствительными к среде, такой как среда HAT. Более предпочтительными иммортализованными линиями клеток являются мышьиные линии миеломы, которые могут быть получены, например, из Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California и American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Также была описана продукция человеческих моноклональных антител в клеточных линиях человеческой миеломы и мышьиной-человеческой гетеромиеломы. Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63.

Культуральная среда, в которой были культивированы клетки гибридомы, может быть исследована на присутствие моноклональных антител, направленных против полипептида. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридом, может быть определена методом иммунопреципитации или при помощи исследований связывания *in vitro*, таких как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Подобные методики и анализы известны в области техники. Средство связывания моноклональных антител может быть определено, например, анализом Скетчарда по Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

После идентификации желаемых клеток гибридомы клоны могут быть субклонированы с помощью процедур серийного разведения и выращены с использованием стандартных методов. См. ранее Goding. Подходящая среда культивирования для этой цели включает, например, модифицированную Дульбекко

среду Игла и среду RPMI-1640. Альтернативно, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде асцитов млекопитающих.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть изолированы или очищены из культуральной среды или асцитной жидкости с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография на сефарозе с белком А, гидроксиапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Моноклональные антитела могут быть также получены с применением методов с рекомбинантной ДНК, таких как описаны в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела в соответствии с изобретением, может быть быстро изолирована и секвенирована с применением обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител).

Клетки гибридомы согласно изобретению являются предпочтительным источником такой ДНК. Будучи изолированной, ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которыми затем трансфицируются клетки-хозяева, такие как клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (СНО), или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для достижения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Также ДНК может быть модифицирована, например, путем замещения последовательностями, кодирующими человеческие константные домены тяжелой и легкой цепи гомологичных мышиных последовательностей (патент США № 4816567; Morrison et al., см. выше) или путем ковалентного связывания с кодирующей иммуноглобулин последовательностью всего или части кодирующей последовательности пептида, не являющегося иммуноглобулином. Подобный не являющийся иммуноглобулином полипептид может быть замещен на константный домен согласно изобретению или может быть замещен переменными доменами антигенсвязывающего сайта антитела в соответствии с изобретением для создания химерного бивалентного антитела.

Антитела могут быть моновалентными антителами. Методы получения моновалентных антител известны в области техники. Например, один метод включает рекомбинантную экспрессию легкой цепи иммуноглобулина и модифицированной тяжелой цепи. Тяжелая цепь обычно укорочена в любой точке участка Fc для того, чтобы предотвратить поперечное сшивание тяжелых цепей. Альтернативно, важные цистеиновые остатки замещаются другими аминокислотными остатками или подвергаются делеции для предотвращения поперечного сшивания.

Также для получения моновалентных антител применимы методы *in vitro*. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности фрагментов Fab, может быть выполнено с применением, но не ограничено способами, известными в данной области техники.

Человеческие и гуманизированные антитела

Антитела могут быть гуманизированными антителами или человеческими антителами. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных) антител являются химерными иммуноглобулинами, иммуноглобулиновыми цепочками или их фрагментами (такими как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые обычно содержат минимальную последовательность, происходящую из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антителареципиенты), в которых остатки CDR реципиента заменены на остатки из CDR

нечеловеческого вида (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, имеющего желаемую специфичность, сродство и возможности. В некоторых случаях основания остова Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Гуманизированные антитела могут также включать
5 остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте ни в заимствованных последовательностях CDR или остова. Обычно, гуманизированные антитела могут включать в основном все из, по меньшей мере, одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или в основном все участки CDR соответствуют аналогам
10 нечеловеческого иммуноглобулина, и все или в основном все из участков FR соответствуют аналогам из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела предпочтительно также будут включать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), обычно человеческого иммуноглобулина. Jones et al., Nature. 321: 522-525 (1986);
15 Riechmann et al., Nature. 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).

Некоторые способы гуманизирования нечеловеческих антител описаны в данной области техники и ниже, в примерах. Обычно, гуманизированное антитело имеет один или более введенных в него аминокислотных остатков из источника, не являющегося
20 человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто упоминаются как «импортные» остатки, которые обычно взяты из «импортного» переменного домена. В соответствии с одним вариантом осуществления гуманизация может быть главным образом выполнена по способу Винтера и соавторов (Jones et al., Nature. 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature. 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science,
25 239: 1534-1536 (1988)) путем замены CDR грызуна или последовательностями CDR соответствующих последовательностей в человеческом антителе. Соответственно, подобные «гуманизированные» антитела являются антителами (патент США № 4816567), в которых значительно меньшая, чем целый переменный домен
30 человека, часть замещена соответствующей последовательностью из нечеловеческого вида. На практике, гуманизированные антитела обычно являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки FR замещены остатками с аналогичных участков в антителах грызунов.

В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены человеческие антитела.
35 Например, в настоящее время возможно производить трансгенных животных (например, мышей), которые способны, после иммунизации, производить полный набор человеческих антител при отсутствии эндогенной продукции иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция в гене участка соединения
40 тяжелой цепи (JH) в химерных мышах и мутантах зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антител. Передача набора человеческих генов зародышевой линии иммуноглобулина в подобную мышь-мутанта зародышевой линии приводит к продукции человеческих антител при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:
45 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immune, 7:33 (1993); патенты США № 5545806, 5569825, 5591669 (все принадлежат GenPharm); 5545807; и WO 97/17852. Альтернативно, человеческие антитела могут быть получены путем введения локусов человеческого иммуноглобулина в трансгенных животных,
50 например, мышей, у которых эндогенные гены иммуноглобулинов частично или полностью инактивированы. При стимуляции наблюдалась продукция человеческих антител, сильно напоминающая наблюдаемую у человека во всех отношениях, включая перестройку генов, сборку, и представления репертуара антител. Этот подход

описан, например, в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 5661016, и в следующих научных публикациях: Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol*, 13: 65-93 (1995).

Альтернативно, для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из репертуара генов вариабельных доменов (V) иммуноглобулинов от неиммунизированных доноров может быть использована технология фаговых дисплеев (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]). В соответствии с одним вариантом осуществления этой методики, последовательности домена V антитела клонируются с сохранением рамки в ген большого или малого белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и представлены в виде функциональных фрагментов антител на поверхности фаговой частицы. Фаговые дисплеи могут быть выполнены в различных форматах, например, как описано ниже в разделе Примеров или как рассмотрено, например, в Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Некоторые источники сегментов гена V могут быть использованы для фагового дисплея. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) выделили широкий набор антиоксазолонных антител из небольшой случайной комбинаторной библиотеки V генов, полученных из селезенок иммунизированных мышей. Может быть сконструирован набор генов V от неиммунизированных человеческих доноров, после чего антитела против широкого спектра антигенов (включая собственные антигены) могут быть выделены с использованием, по существу, способов, описанных Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См., также патенты США № 5565332 и 5573905.

Как обсуждалось ранее, человеческие антитела могут также вырабатываться активированными *in vitro* В-клетками (см. патенты США 5567610 и 5229275).

Человеческие антитела могут также быть получены с применением различных способов, известных в области техники, включая библиотеки фаговых дисплеев. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Также доступны методы изготовления человеческих моноклональных антител Cole et al. и Boerner et al. Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner et al., *J. Immunol*, 147(1): 86-95 (1991).

Мультиспецифичные антитела

Мультиспецифические антитела являются моноклональными, предпочтительно человеческими или гуманизированными, антителами, которые имеют специфичность связывания с двумя или более различными антигенами (например, биспецифические антитела имеют специфичность связывания с двумя или более различных антигенов). Например, одна из специфичностей связывания может быть как у антитела против альфа5бета1, другая может быть как у любого другого антигена. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления другой антиген является белком клеточной поверхности, реципиентом или субъединицей рецептора. Например, белок клеточной поверхности может быть клеточным рецептором естественной клетки-киллера. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления, биспецифическое антитело согласно данному изобретению может связывать альфа5бета1 и VEGF.

Были описаны примеры методов изготовления биспецифических антител. Традиционно, рекомбинантное получение биспецифических антител основано на

совместной экспрессии двух пар тяжелая/легкая цепь иммуноглобулина, где две тяжелые цепи имеют различную специфичность. Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983). По причине случайного набора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, эти гибридомы (квадромы) потенциально продуцируют смесь из десяти различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы обычно проводится с применением этапов аффинной хроматографии. Сходная процедура раскрыта в WO 93/08829, опубликованном 13 мая 1993, и в Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Вариабельные домены антител с желаемой специфичностью связывания (участками соединения антиген-антитела) могут быть слиты с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Предпочтительно, слияние производится с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающей по меньшей мере часть шарнирного участка и участки СН2 и СН3. Предпочтительно, чтобы первый константный участок тяжелой цепи (СН1), содержащий участок, необходимый для связывания легкой цепи, присутствовал по меньшей мере в одном продукте слияния. ДНК, кодирующие слитые тяжелые цепи иммуноглобулина и, если это требуется, легкую цепь иммуноглобулина, вставляются в отдельные экспрессионные векторы и совместно трансфицируются в подходящий организм-хозяин. Для более детального описания получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

Также были описаны различные способы изготовления и изолирования биспецифических фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела могут быть получены с применением лейциновых застежек-молний. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Лейциновые пептиды-застежки из белков Fos и Jun были связаны с фрагментами Fab' двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител были восстановлены на участке шарнира для образования мономеров, после чего окислены заново для образования гетеродимеров антител. Этот способ также может быть использован для производства гомодимеров антител. Технология «диател», описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), предложила альтернативный механизм изготовления биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат VH, соединенный с VL через линкер, который является слишком коротким для того, чтобы позволить спаривание двух доменов одиночной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены образовывать пары с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, таким образом образуя два антигенсвязывающих участка. Также была описана другая стратегия изготовления биспецифических фрагментов антител путем использования одноцепочечных димеров Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Также рассматриваются антитела, имеющие более двух валентностей. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Гетероконъюгатные антитела

Гетероконъюгатные антитела состоят из двух ковалентно связанных антител. Такие антитела были, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения инфекции ВИЧ. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. Предполагается, что антитела могут быть получены in vitro с применением методов, известных в химии синтетических белков, включая методы, вовлекающие поперечно сшивающие препараты. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с использованием реакции обмена

дисульфида или путем формирования тиоэфирной связи. Примеры подходящих для этой цели реактивов включают имиотиолят и метил-4-меркаптобутиримидат, и раскрыты, например, в патенте США № 4676980.

Создание эффекторных функций

5 Может быть желательным изменить антитело согласно изобретению в отношении его эффекторной функции для улучшения, например, эффективности антитела при лечении рака. Например, в участок Fc может быть введен один или несколько цистеиновых остатков, таким образом делая возможным образование на этом участке
10 дисульфидной связи между цепями. Полученные таким образом гомодимерные антитела могут иметь улучшенную способность к интернализации и/или увеличение комплемент-опосредованного лизиса клеток и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). См. Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с увеличенной
15 противоопухолевой активностью могут также быть получены с применением гетеробифункциональных поперечных сшивок, как описано в Wolff et al., Cancer Research. 53: 2560-2565 (1993). Альтернативно, могут быть сконструированы антитела, которые имеют двойные участки Fc и могут таким образом обладать увеличенными
20 способностями к лизису с участием комплемента и ADCC. См., Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

Для улучшения связывания с FcR (например, FcγR, FcRn) могут быть проведены мутации или изменения последовательностей участка Fc. В соответствии с
25 одним вариантом осуществления, антитело согласно данному изобретению имеет по меньшей мере одну измененную по сравнению с нативным IgG или исходным антителом эффекторную функцию, выбранную из группы, состоящей из ADCC, CDC и улучшенного связывания с FcRn. Примеры некоторых полезных специфических мутаций описаны, например, в Shields, RL et al. (2001) JBC 276(6):6591-6604; Presta, L.G.,
30 (2002) Biochemical Society Transactions 30(4):487-490; и публикации WO00/42072.

В соответствии с одним вариантом осуществления, мутация рецептора Fc является заменой не менее чем в одном положении, выбранном из группы, состоящей из: 238,
239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283,
35 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 участка Fc по системе нумерации EU.

Иммуноконъюгаты

40 Изобретение также имеет отношение к иммуноконъюгатам, включающим антитело, конъюгированное с цитотоксическим препаратом, таким как химиотерапевтический препарат, токсином (например, имеющим ферментативную активность токсином бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагментом), или радиоактивным изотопом (например,
45 радиоконъюгат).

Химиотерапевтические препараты, применяемые при создании таких иммуноконъюгатов, были описаны выше. Имеющие ферментативную активность токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают дифтерийную
50 А-цепь, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А эндотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модециина, альфа-сакрин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин,

ингибитор из *Sarapara officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотехены. Для производства радиокоњуогированных антител доступны разнообразные радионуклиды. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического препарата изготавливаются с применением различных бифункциональных соединяющихся с белком веществ, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как гидрохлорид диметиладипимидата), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толиен 2,6-диизосукцинат), и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифторо-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science. 238: 1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентаацетилловая кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего соединения для конъюгации радионуклеотида с антителом. См., WO94/11026.

В другом варианте осуществления, антитело может быть конъюгировано с «рецептором» (таким как стрептавидин) для использования при предварительном нацеливании на опухоль, когда пациенту вводится конъюгат антитело-рецептор, затем несвязанный конъюгат удаляется из циркуляции с использованием очищающего препарата, после чего вводится «лиганд» (например, авидин), конъюгированный с цитотоксическим препаратом (например, радионуклеотидом).

Иммунолипосомы

Антитела, раскрытые в данном изобретении могут быть также изготовлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитела, изготовлены способами, известными в данной области техники, такими, как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); и патентах США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

Применяемые на практике липосомы могут быть получены методом обратного фазового испарения с применением липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин, и ПЭГ-производного фосфатидилэтаноламина (PEG-PE). Липосомы выдавливаются через фильтры с определенным размером пор для получения липосом с желаемым диаметром. Фрагменты Fab' антител по представленному изобретению могут быть конъюгированы в липосомы, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), путем проведения реакции дисульфидного обмена. В липосоме возможно содержится химиотерапевтический препарат (такой как доксорубин). См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

Фармацевтические композиции антител и полипептидов

Антитела специфически связываются с полипептидами, указанными в данном описании, а также другие молекулы, идентифицированные путем отбора по результатам исследований, описанных в данном изобретении ранее, могут быть назначены для лечения различных расстройств, как описано выше и ниже в форме фармацевтических композиций.

Липофектины или липосомы могут быть использованы для доставки полипептидов

или антител или композиций в соответствии с данным изобретением в клетки. Когда используются фрагменты антител, предпочтителен наименьший ингибирующий фрагмент, который специфически связывается с доменом связывания белка-мишени. Например, на основе последовательностей переменного участка антитела могут
5 быть сконструированы молекулы пептида, которые сохраняют способность связывать белковую последовательность-мишень. Подобные пептиды могут быть синтезированы химически или получены с применением технологий рекомбинантной ДНК, см., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

10 Состав, описанный здесь, может также содержать более одного активного соединения, если это необходимо для лечения конкретных симптомов, предпочтительно это соединения, имеющие дополняющую активность, которые не оказывают нежелательного воздействия друг на друга. Альтернативно, или в
15 дополнение, композиция может содержать препарат, который усиливает ее действие, такой как, например, цитотоксический препарат, химиотерапевтический препарат, или рост-ингибирующий препарат. Соответственно, такие молекулы присутствуют в составе в количествах, являющихся эффективными для намеченного назначения.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные,
20 например, при помощи методик коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки препарата (например, липосомах, альбуминовых микросферах,
25 микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или макроэмульсиях. Подобные методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, см. выше.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это может быть легко достигнуто при помощи фильтрования через стерильные фильтрующие мембраны.

30 Могут быть приготовлены препараты замедленного высвобождения. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые основы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, эти основы изготовлены в виде сформированных предметов, например, пленок или микрокапсул. Примеры основ для замедленного высвобождения включают полиэферы, гидрогели
35 (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат), или поли(винилалканоил)), полилактиды (патент США № 3773919) сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ этил-L-глутамата, недеградирующий этилен-винилацетат, деградирующие сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOTTM (вводимые инъекцией
40 микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, способны высвободить молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели
45 высвобождают белки за более короткие периоды времени. Когда инкапсулированные антитела остаются в теле в течение долгого времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможных изменениях в иммуногенности. В зависимости от вовлекаемого механизма могут быть разработаны рациональные стратегии для
50 стабилизации. Например, если будет обнаружено, что механизм агрегации заключается в формировании межмолекулярных S-S связей вследствие тио-дисульфидного взаимного обмена, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов,

контроля содержания влаги, применения подходящих добавок и разработки специфических составов полимерного матрикса.

Диагностическое использование и визуализация

Меченые антитела и их производные и аналоги, которые специфически связываются с полипептидом, могут быть использованы в диагностических целях для обнаружения, диагностики или отслеживания болезней и/или расстройств, связанных с экспрессией, отклонениями экспрессии и/или активностью полипептидов в соответствии с изобретением. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, антитела в соответствии с данным изобретением могут быть использованы в диагностических исследованиях или визуализирующих исследованиях, вовлекающих введение антител субъекту. Изобретение предлагает способ обнаружения отклонений экспрессии полипептида VEGF или альфа5бета1, включающий (а) изучение экспрессии полипептида в клетках (например, в тканях) или жидкостях тела индивидуума с применением одного или более антител в соответствии с данным изобретением и (b) сравнения уровня экспрессии гена со стандартным уровнем экспрессии гена, где увеличение или уменьшение уровня экспрессии исследуемого гена по сравнению со стандартным уровнем экспрессии показательны в отношении отклонений экспрессии.

Антитела в соответствии с данным изобретением могут быть использованы для исследования уровней белка в биологическом образце с применением классических иммунологических методов, известных специалистам в данной области техники (например, см. Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Другие основанные на антителах методы обнаружения экспрессии генов белка включают иммунологические исследования, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и радиоиммунный анализ (РИА). Пригодные для анализа с применением антител метки известны в области техники и включают ферментативные метки, такие как оксидазу глюкозы; радиоизотопы, такие как йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In), и технеций ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru ; люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцин, и родамин, и биотин.

Для меченых антител согласно изобретению могут применяться известные в области техники методы. Такие методы включают, но не ограничены, использованием бифункциональных конъюгирующих препаратов (см., например, патенты США №№ 5756065; 5714631; 5696239; 5652361; 5505931; 5489425; 5435990; 5428139; 5342604; 5274119; 4994560; и 5808003; содержание каждого из которых приведено здесь в виде ссылки в полном объеме.

Диагностика заболевания или расстройства, связанного с экспрессией или отклонениями экспрессии VEGF и/или альфа5бета1 у животного, предпочтительно млекопитающего, и наиболее предпочтительно человека, может включать этап обнаружения молекул альфа5бета1 и/или VEGF у млекопитающего. В одном варианте осуществления, после введения антагониста VEGF диагностика включает (а) введение (например, парентерально, подкожно или внутривенно) млекопитающему эффективного количества меченого антитела против альфа5бета1; (b) ожидание в течение временного интервала после введения для того, чтобы позволить меченым молекулам преимущественно сконцентрироваться на участках в субъекте, где экспрессируется молекула альфа5бета1 (и позволить концентрации несвязанной меченой молекулы снизиться до фонового уровня); (с) определение фонового уровня;

и (d) определение меченой молекулы у субъекта, при этом выявление меченой молекулы у субъекта выше фонового уровня указывает, что субъект имел определенное заболевание или расстройство, связанное с экспрессией или aberrантной экспрессией альфа5бета1. Фоновый уровень может быть определен с помощью различных способов, включая сравнение количества обнаруженной меченой молекулы со стандартным значением, ранее определенным для конкретной системы.

В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления, экспрессия или сверхэкспрессия полипептида альфа5бета1 определяется в диагностических или прогностических исследованиях после введения терапевтического препарата-антагониста VEGF путем оценки уровней альфа5бета1, присутствующего на поверхности клетки (например, путем иммунохимического исследования с применением антител против альфа5бета1). Альтернативно или дополнительно, можно измерить уровни кодирующей полипептид альфа5бета1 нуклеиновой кислоты или мРНК в клетке, например при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием основанного на нуклеиновой кислоте зонда, соответствующего кодирующей альфа5бета1 нуклеиновой кислоте или комплементарной ей (FISH; см. WO98/45479 опубликовано в октябре 1998), саузерн блота, нозерн блота, или методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), таких как количественная ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Можно также изучать чрезмерную экспрессию альфа5бета1 путем измерения «слушивающегося» антигена в биологических жидкостях, таких как сыворотка, например, с использованием анализов, основанных на антителах (см. также, например, патент США № 4933294, выданный 12 июня 1990; WO91/05264, опубликованный 18 апреля 1991; патента США 5401638, выданный 28 марта 1995; и Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Помимо перечисленных выше анализов, специалисту-практику доступны различные исследования *in vivo*. Например, можно подвергнуть клетки в организме млекопитающего обработке антителами, которые возможно помечены обнаружимой меткой, например, радиоактивным изотопом, после чего связывание антител с клетками млекопитающего может быть оценено, например, путем внешнего сканирования радиоактивности или путем анализа биопсии, взятой у млекопитающего, ранее обработанного антителами.

Все публикации (включая патенты и патентные заявки), цитированные здесь, введены таким образом в своей полноте в виде ссылок, включая в особенности, предварительную заявку США № 60/784704, поданную 21 марта 2006, предварительную заявку США № 60/785330, поданную 22 марта 2006 г., и предварительную заявку США № 60/871743, поданную 22 декабря 2006 г.

Следующие последовательности ДНК были депонированы на условиях Будапештского Соглашения в Американскую Коллекцию Типовых Культур (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA, как описано ниже:

Материал	Номер депозита	Дата депонирования
Alpha5/beta1 7H5.4.2.8	PTA-7421	7 марта 2006
Alpha5/beta1 7H12.5.1.4	PTA-7420	7 марта 2006

Депонирование было проведено на условиях Будапештского соглашения по международному признанию депозитов микроорганизмов для целей патентных процедур и Правил на основании этого соглашения (Будапештское соглашение). Это гарантирует поддержание жизнеспособной культуры депозитов в течение 30 лет с момента депонирования. Депозиты были сделаны доступными АТСС на условиях

Будапештского соглашения и являются субъектом соглашения между Genentech, Inc. и АТСС, которое гарантирует постоянную и неограниченную доступность потомков культуры депозитов для общества с момента выдачи соответствующего патента США или с момента публикации любой патентной заявки США или иностранной, в зависимости от того, что произойдет раньше, и гарантирует доступность потомства для имеющих право доступа, определенное Комиссаром по патентам и торговым маркам в соответствии с 35 U.S.C. 122 и соответствующим ему правилам Комиссара (включая 37 C.F.R. 1.14 со специальной ссылкой на 886 OG 638).

Уполномоченный со стороны, представляющей данную заявку, согласился, что в случае если культура или материал депозита погибнет, или будет потерян, или разрушен в процессе культивирования при приемлемых условиях, материалы будут быстро заменены по извещению на другие такие же. Доступность депонированных материалов не должна быть истолкована как лицензия на использование изобретения в нарушение прав, данных властью любого правительства в соответствии с его патентными законами.

Коммерчески доступные реагенты, упоминаемые в Примерах, были использованы в соответствии с инструкциями производителя, если не указано иное. Источником клеток, обозначенных в последующих примерах и в спецификации по номерам доступа АТСС, является Американская Коллекция Типовых Культур, Manassas, VA. Если не указано иначе, настоящее изобретение использует стандартные процедуры технологии рекомбинантной ДНК, такие как те, что описаны здесь выше и в следующих руководствах: Sambrook et al., выше; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991.

В данной спецификации и формуле изобретения слово «содержать» или вариации, такие как «включает» или «включающий», должны пониматься как означающие включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Предшествующее текстовое описание считается достаточным для того, чтобы позволить специалисту в данной области техники осуществить изобретение на практике. Последующие Примеры предложены только для иллюстративных целей и не предполагаются ограничивающими область действия представленного изобретения любым образом. Более того, различные модификации изобретения в дополнение к показанным и описанным здесь будут очевидны специалистам в данной области техники из предшествующего описания и попадают в область действия прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Восстановление популяции экспрессирующих альфа5бета1 клеток стромы после терапии против VEGF

Секции ксенотрансплантатов человеческой колоректальной карциномы HT-29, которые были подвергнуты монотерапии антителом против VEGF B20-4.1 в бестимусных мышцах, были окрашены на экспрессию антител против альфа5бета1. По сравнению с контрольной группой, обработанной контрольным антителом (антителом против амброзии полыннолистной), в данном исследовании монотерапия B20-4.1 давала среднее время до конечной точки (ТТЕ), которое

соответствовало отсутствующей или минимальной активности. Опухоли измерялись два раза в неделю на протяжении 58 дней. Животные были подвергнуты эвтаназии, когда их опухоли достигли объема конечной точки 1000 мм³ или на 58 день, в зависимости от того, что случилось раньше, после чего (ТТЕ) было вычислено для каждой мыши. Результат лечения был определен по проценту задержки роста опухоли (%TGD), определяемому как процентное увеличение в среднем ТТЕ у подвергнутых лечению мышей по сравнению с контрольными, различия считались значащими при $0,01 \leq P \leq 0,05$, и высокозначимыми при $P \leq 0,01$ с использованием анализа Логранка. Среднее значение ТТЕ контрольной группы составляло 20,6 дней. Лечение при помощи монотерапии В20-4.1 давало среднее значение ТТЕ 20,1 дней, что соответствует отсутствию активности.

На фигуре 1 показаны секции опухоли, окрашенные антителами против альфа5бета1. Наблюдалось увеличенное восстановление популяции клеток стромы после лечения против VEGF. Эти стромальные клетки были положительными в отношении интегрина альфа5бета1 (светло-зеленое окрашивание).

Пример 2. Антитела против альфа5бета1

Мышам был введен очищенный человеческий альфа5бета1 (Chemicon CC1027).

Были выделены клетки плазмоцитомы, экспрессирующие антитела против альфа5бета1 и трансформированы в клеточные линии гибридомы. Две клеточные линии гибридом, обозначенные 7H5.4.2.8 и 7H12.5.1.4, были помещены в АТСС, см. выше. Антитела, полученные из гибридомы 7H5.4.2.8, являлись mIgG2a антителами Каппа (также упоминаемыми здесь как «антитела 7H5»). Антитела, полученные из гибридомы 7H12.5.1.4, являлись mIgG2b антителами Каппа (также упоминаемыми здесь как «антитела 7H12»).

Пример 3. Исследования прямого связывания с клетками HUVEC

Культуры тканей, содержащие растущие человеческие клетки эндотелия пупочной вены (HUVEC), были дважды промыты ФСБ. Клетки были отделены от культурального флакона при помощи 3-4 мл раствора 5 мМ ЭДТА/ФСБ. Клетки были перемешаны со свежей средой для культивирования. Было определено количество клеток в аликвоте смеси. Клетки были центрифугированы и промыты отмывочным буфером (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 7,5) один раз. Концентрация клеток была подобрана таким образом, что клетки могли быть высеяны в 25 мкл на лунку на 96-луночные планшеты MSD с высоким связыванием в количестве 25000 клеток на лунку или 4000 клеток на лунку в 384-луночный планшет (Cat #L11XB-1 или #L11XB-2 соответственно, Meso Scale Diagnostics, LLC). Клетки были инкубированы в течение 1 часа при комнатной температуре для того, чтобы произошел захват. Для блокирования лунки в лунку было добавлено 25 мкл базового буфера (30% фетальной телячьей сыворотки (FBS) в TBS (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl) +1 мМ CaCl₂/1 мМ MgCl₂, pH 7,5), после чего планшет был инкубирован при комнатной температуре от 30 минут до 1 часа.

Была приготовлена серия разведений антител против альфа5бета1 в буфере для анализа (TBS с 1 мМ CaCl₂/1 мМ MgCl₂, pH 7,2 + 2-4% ФСБ) для получения различных концентраций антител. Лунки были промыты дважды буфером для промывки, после чего остатки жидкости были удалены при помощи впитывающего материала. В лунку было добавлено 25 мкл разведений антител, после чего планшет инкубировали на льду в течение одного часа. Затем лунки были трижды промыты TBS.

25 мкл раствора хmuFc-sulfo-tag с концентрацией 0,5 мкг/мл было добавлено в каждую лунку, после чего планшет инкубировали на льду в течение от 45 минут до

одного часа (xmuFc-sulfo-tag представляет собой антитела козы против IgG мыши, номер по каталогу R23-AC-5). Добавляли MSD-SA-tag (номер по каталогу R32-21-AD-5) и инкубировали на льду от 45 минут до 1 часа. Лунки были трижды промыты TBS. В каждую лунку было добавлено 150 мкл 2х буфера для считывания (4х буфер для считывания MSD, разведенный dH₂O до 2х, № по каталогу R92TD-1 (без поверхностно-активных веществ)). Последующий электролюминесцентный (ECL) сигнал был измерен с помощью фотодиодов и выражен в относительных единицах света с использованием сканера MSD (протокол по умолчанию 6000). На фигуре 2 показаны результаты исследований по прямому связыванию с клетками HUVEC. EC50 антитела 7H5 составляла 0,22 нМ. EC50 антитела 7H12 составляла 0,38 нМ.

Пример 4. Исследование FACS антител против альфа5бета1

Антитела 7H12 или 7H5 были инкубированы или с клетками RAJI (клеточной линией, которая не экспрессирует мРНК альфа5бета1), или с клетками HUVEC (клеточная линия, которая экспрессирует высокие уровни мРНК альфа5бета1) в 100 мкл. Связанные клетки были обнаружены с применением конъюгированных вторичных антител. На фигуре 3 показано при помощи анализа FACS, что 7H12 и 7H5 связываются с клетками HUVEC, но не с клетками RAJI. С использованием тех же методов с синовиоцитами кролика (HIG-82) или клетками макаки-резус (CL-160) фибробласты Macaca mulatta или CRL-1780 клетки эндотелия сетчатки), мы наблюдали связывание 7H12 и 7H5 с клетками кролика или обезьяны.

Пример 5. Адгезия клеток к фибронектину в присутствии антител против альфа5бета1

Фибронектин (Sigma F1141 (бычий) или Roche 1080938 (человеческий)) был разведен до 1 мкг/мл в натрий-карбонатном буфере. В 96-луночный планшет NUNC maxisorp было добавлено 100 мкл раствора фибронектина на лунку, после чего планшет был оставлен для связывания при 4°C в течение ночи ((96-луночные иммунологические планшеты NUNC MaxiSorp N/Ster 439454 (VWR 62409-002)). Затем лунки были промыты фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и заблокированы 1% БСА (Sigma A9418) в течение не менее 30 минут. Затем планшеты были промыты три раза ФСБ. В каждую лунку было добавлено 20000 клеток HUVEC, после чего проводилась инкубация с различными концентрациями 7H5 или 7H12 в среде для роста, содержащей 1,4 мМ MgCl₂ и 1,4 мМ CaCl₂. Затем инкубационная смесь была добавлена к покрытому фибронектином планшету. Приблизительно 20000 клеток в той же среде для роста были добавлены в каждую контрольную лунку без добавления ингибирующих антител.

Планшеты были центрифугированы в течение 5 мин при 140 g для синхронизации контакта клеток с субстратом. Клетки были инкубированы в CO₂ инкубаторе в течение разных отрезков времени (от 0 до 120 мин). Время инкубации изменялось для каждой клеточной линии. Затем планшеты были промыты ФСБ три раза. Вся жидкость была удалена из ячеек, после чего планшет был заморожен при -80°C. Планшеты были оттаяны при комнатной температуре. В лунки был добавлен буфер CyQuant (Molecular Probes CyQuant C7026), после чего планшет был инкубирован при комнатной температуре в течение 10 мин. Было проведено измерение OD. На фигуре 4 показано, что IC50 антитела 7H5 составила 0,85 мкг/мл (3,44 нМ), а IC50 антитела 7H12 составила 0,7 мкг/мл (4,38 нМ).

Пример 6. Исследования размножения с использованием клеток HUVEC

96-луночные планшеты были покрыты фибронектином (1 мкг/мл) в течение ночи. Затем планшет был промыт ФСБ. В каждую из 96 лунок было добавлено 3000-5000

эндотелиальных клеток (ЕС), после чего планшет был оставлен для протекания полного прикрепления клеток к лункам. Были добавлены антитела против альфа5 (включая контрольные изотипы). Для каждого условия было использовано 3 лунки. Затем клетки были инкубированы с антителами в течение 1-24 часов. Антитела против интегрин альфа5бета1 были протестированы в нескольких концентрациях (например, 0 мкг/мл, 4 мкг/мл, 16 мкг/мл, 60 мкг/мл 120 мкг/мл).

Затем клетки были помечены BrdU путем инкубации их с 2 мкл исходного раствора BrdU (25 мг/мл в ФСБ) в 1 мл среды для культуры тканей (EGM2 + все дополнительные питательные вещества от Clonetics (№ по каталогу CC-4176). После этой инкубации клетки были зафиксированы 4% PFA, обработаны 1 н. HCl в течение 20 мин, несколько раз промыты ФСБ, после чего блокированы 10% козьей сывороткой (ФСБ с 0,2% Тритона) в течение 1-2 часов. Затем клетки были окрашены моноклональными антителами против BrdU (№ по каталогу BD 347580, 1:40) ФСБ с 0,2% Тритона и 5% козьей сыворотки), после чего инкубированы в течение ночи при 44°C. На следующий день клетки были промыты ФСБ 3 раза и инкубированы с конъюгированными с Alexa-594 вторичными антителами против кролика (1:800) при комнатной температуре в темноте в течение 4 часов. Лунки были снова промыты и инкубированы с DAPI (1:10000 в ФСБ) в течение 10 мин. После последней промывки ФСБ общее число клеток в лунке было подсчитано путем фотографирования окрашивания DAPI при 5х. Клетки, которые были положительными по BrdU, на тех же участках были сфотографированы с использованием красного светофильтра. Размножение было оценено как процент клеток, положительных по BrdU на участке. Затем результаты были проанализированы с помощью программы Excel. На фигуре 5А показано общее количество клеток HUVES через 32 часа при начальном количестве 5000 клеток. На фигуре 5В показано общее количество клеток HUVES через 24 часа при концентрации антител 20 мкг/мл.

Пример 7. Протокол исследования миграции

Клетки HUVES были выращены до образования сплошного слоя в EGM2 с добавлением всех дополнительных питательных веществ от Clonetics (№ по каталогу CC-4176) на 24-луночных планшетах, покрытых 5 мкг/мл фибронектина. Клетки в центре каждой лунки были соскоблены при помощи 2 мкл наконечника пипетки, удаленные соскабливанием клетки были смыты. В различные лунки была добавлена среда для культивирования клеток с контрольным антителом, 7Н5 или 7Н12. Все тестированные антитела были использованы с концентрацией 20 мкг/мл. Затем клеткам было позволено расти в течение от 1 до 2 дней. За травмированными участками проводилось наблюдение. На фигуре 6 показана фотография миграции клеток HUVES на 5 мкг/мл фибронектина с 20 мкг/мл антител против альфа5 (7Н5) в ЕСМ-2 на 0 часов и на 30 часов. Фигура 7 представляет собой диаграмму % миграции через 30 часов для клеток, обработанных антителами 7Н5 или 7Н12.

Пример 8. Исследования апоптоза активированных клеток HUVES с помощью иммуноокрашивания каспазы-3

96-луночные планшеты были покрыты фибронектином (1 мкг/мл) в течение ночи. Планшеты были промыты ФСБ. Затем в каждую из 96 лунок были высеяны 3000-5000 клеток HUVES и выращены в течение ночи в полной среде (среда EBM-2 (Cambrex CC-3156) с EGM-2 SingleQuots (Cambrex CC-4176)). Если для исследований апоптоза будут использованы мышинные эндотелиальные клетки 2Н-11, среда будет средой 50/50 с 10% FBS.

На следующий день в одном наборе лунок среда была замещена на

бессывороточную и проведена инкубация клеток в течение 4-6 часов, чтобы лишить клетки питания и привести их в неразмножающееся состояние. Другой набор лунок поддерживался в полной среде и представлял активно размножающиеся клетки. После 4-6 часов были добавлены антитела (включая контрольные изотипы). Обычно, для каждого состояния были использованы 3 лунки. Затем лунки были инкубированы с антителами в течение 1-48 часов. Антитела против интегрина альфа5бета1 обычно были тестированы в следующих концентрациях: 0 мкг/мл, 4 мкг/мл, 16 мкг/мл, 60 мкг/мл и 120 мкг/мл.

После инкубации клетки были зафиксированы 4% PFA, блокированы 10% козьей сывороткой (ФСБ с 0,2% Тритоном) в течение 1-2 часов, после чего окрашены моноклональным антителом, которое специфически распознает активированную форму Каспазы-3 (например, кроличьим антителом против активной каспазы-3 от Bio Vision, разведенным 1:50 в ФСБ с 0,2% Тритона и 5% козьей сыворотки). Антитела против каспазы-3 и фиксированные клетки были инкубированы при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки были промыты ФСБ 3 раза и инкубированы с конъюгированным с Alexa-594 вторичным антителом против кролика (1:800) в течение 4 часов при комнатной температуре в темном месте. Лунки были снова промыты и инкубированы с DAPI (1:10000 в ФСБ) в течение 10 мин. После последней промывки ФСБ, общее число клеток в лунке было подсчитано путем фотографирования окрашивания DAPI при 5x. Клетки, которые давали положительный ответ в исследовании на активную каспазу-3 на тех же участках, были сфотографированы с использованием красного светофильтра. Размножение было оценено как процент клеток, положительных в исследовании на активную каспазу-3 на участке. Затем результаты были проанализированы с помощью программы Excel. На фигуре 8 показано, что 7H5 и 7H12 активно не индуцируют апоптоз.

Пример 9. Колометрическое исследование каспазы 3/7 HUVEC

Были проведены исследования активности каспазы 3/7 с применением антител 7H5 и 7H12 (Анализ на каспазу3/7 Apo-One от Promega, см. Technical Bulletin № 295 для получения инструкций по проведению стандартного анализа в 96 лунках).

Обычно, 96-луночные планшеты были покрыты 1 мкг/мл фибронектина в течение ночи. Планшеты были промыты ФСБ. Затем были посеяны 3000-5000 клеток HUVEC на каждую из 96 лунок, после чего выращивались в течение ночи в полной среде (среда EBM-2 (Cambrex CC-3156) с EGM-2 SingleQuots (Cambrex CC-4176)). Если для исследований апоптоза будут использованы мышинные эндотелиальные клетки 2H-11, среда будет средой 50/50 с 10% FBS.

На следующий день в одном наборе лунок среда была замещена на бессывороточную и проведена инкубация клеток, чтобы лишить клетки питания и привести их в неразмножающееся состояние. Другой набор лунок поддерживался в полной среде и представлял активно размножающиеся клетки. После 4-6 часов были добавлены антитела (включая контрольные изотипы). Обычно, для каждого состояния были использованы 3 лунки. Затем клетки были инкубированы с антителами в течение 24-48 часов. Антитела против интегрина альфа5бета1 обычно были тестированы в следующих концентрациях: 0 мкг/мл, 4 мкг/мл, 16 мкг/мл, 60 мкг/мл и 120 мкг/мл.

После этого инкубирования в каждую лунку было добавлено 100 мкл реагента на каспазу 3/7 Apo-One, после чего содержимое планшета было подвергнуто осторожному перемешиванию с использованием планшетного шейкера при 300 об/мин в течение 30 секунд. Затем планшет был инкубирован при комнатной

температуре от 1 до 8 часов, после чего были сняты данные с использованием планшетного сканера. Была измерена флуоресценция в каждой лунке при возбуждении светом с длиной волны 485 нм и излучении с длиной волны 530 нм.

Флуоресцентный сигнал, возникающий в результате расщепления субстрата каспазы 3/7, означал апоптоз. На фигуре 9 показано, что 7Н5 и 7Н12 не вызывают активного апоптоза.

Пример 10. Изучение образования трубок

Может быть исследована способность антител против альфа5бета1 подавлять образование трубок. Далее приведен пример исследования образования трубок на основе роста клеток HUVEC и исследования формирования трубок, описанного Nakatsu et al. (2003) *Microvascular Research* 66 (2003) 102-112.

Обычно клетки HUVEC могут быть смешаны с покрытыми детраном микроносителями Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) в концентрации 400 клеток на микрошарик в 1 мл среды EGF-2. Микрошарики с клетками могут подвергаться осторожному встряхиванию каждые 20 минут в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂. После инкубирования, микрошарики могут быть перенесены в культуральный флакон на 25 см² (BD Biosciences, Bedford, MA) и оставлены на 12-16 ч в 5 мл среды EGM-2 при 37°C и 5% CO₂. На следующий день микрошарики с клетками могут быть промыты три раза 1 мл EGM-2 и ресуспендированы при концентрации 200 покрытых клетками частиц/мл в 2,5 мг/мл фибриногена (Sigma, St. Louis, MO). Пятьсот микролитров раствора фибриногена с микрошариками было добавлено к 0,625 единицам тромбина (Sigma) в одной лунке 24-луночного культурального планшета. Фибриноген с микрошариками может образовывать сгустки в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем при 37°C и 5% CO₂ в течение 20 минут. В каждую лунку может быть добавлен один миллилитр EGM-2 (содержащей 2% FBS), после чего уравновешен с фибриновым сгустком в течение 30 минут при 37°C и 5% CO₂. Среда была удалена из ячейки и заменена 1 мл свежей среды. Приблизительно двенадцать тысяч клеток фибробластов кожи (Detroit 551, ATCC, Rockville, MD) могут быть посеяны на поверхность сгустка. Среда может подвергаться замене через день. Пробы с микрошариками могут отслеживаться в течение 7 дней.

Покрытые HUVEC частицы могут быть культивированы в фибриновых гелях при наличии или в отсутствие 500 мкл антител против альфа5бета1 (7Н5 и 7Н12) на поверхности геля в течение 2-3 дней, после чего перенесены на платформу Nikon Eclipse TE300, снабженного осями в нескольких измерениях и поддерживаться при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 часов. Финальная концентрация используемых антител может быть вычислена, принимая во внимание объем фибринового геля, т.е. конечная концентрация антител = общий вес антител/объем среды + объем фибринового геля. С использованием программного обеспечения Metamorph можно делать снимки множества частиц каждые 20 минут. Количественная оценка сосудов in vitro может быть произведена с использованием изображений частиц высокого разрешения (например, микроскоп Olympus IX70 с объективом 4x). Может быть определено количество зачатков на каждой частице по сравнению с необработанным контролем, зачаток сосуда может быть определен как сосуд с длиной, эквивалентной диаметру частицы. Длина зачатка сосуда может быть измерена в условных единицах.

Пример 11. Исследования комбинирования на моделях опухолей на основе ксенотрансплантатов и аллотрансплантатов.

Конкурентное и последовательное назначение терапии антагонистами альфа5бета1

и VEGF может быть оценено на ксенотрансплантатных/аллотрансплантатных моделях опухолей. Предпочтительно, модели имеют низкий или отсутствующий ответ на монотерапию антагонистом VEGF. Далее приведены примеры моделей, которые могут быть использованы: (a) аллотрансплантат Fo5 у бестимусных голых мышей (опухоль молочной железы, полученная от трансгенной мыши mmtv-Her2) (Finkle, D., et al., (2004) Clin. Cancer Res. 10:2499-2511); (b) ксенотрансплантат HT29 у бестимусных голых мышей (человеческая колоректальная линия); и (c) RIP-TbAg (опухоль поджелудочной железы на модели Tg). Лечение может быть назначено внутрибрюшинно, подкожно или внутривенно. Например, антитела против VEGF могут быть назначены в дозе 10 мг/кг раз в неделю или 5 мг/кг дважды в неделю. Количество вводимого антагониста альфа5бета1, такого как антитело, может быть определено, основываясь на его аффинности и активности. В одном эксперименте антагонист VEGF и антагонист альфа5бета1 могли быть введены по совместному графику в течение 5-6 недель. Альтернативно или дополнительно, антагонист VEGF и антагонист альфа5бета1 могли быть введены последовательно (например, антитела против VEGF в течение трех недель с последующим дозированием антител против альфа5бета1 в течение трех недель).

Эффективность лечения может быть оценена основываясь, кроме всего прочего, на прогрессировании опухоли, кровоснабжении опухоли, плотности сосудов опухоли, морфологии и/или выживанию. Прогрессирование опухоли может быть измерено, например, по объему опухоли и/или весу опухоли. Для оценки сосудистых изменений, сопутствующих неопластическому прогрессированию, могут быть использованы перфузии ФИТЦ-лецитина, а также окрашивание сосудистых маркеров.

Пример 12. Модель рака груди человека - MDA-MB231

Самкам голых мышей HRLN были в бок подкожно введены 5×10^6 клеток рака груди человека (HRLN представляет собой наименование линии). Опухолям позволили расти до тех пор, пока они не достигли среднего размера 80-120 мм³. Затем несущие опухоль мыши были разделены на 4 группы, лечение было начато, когда средний объем опухоли в группе составил приблизительно 100 мм³.

Объемы опухолей измерялись во время исследований два раза в неделю. Измерение объема опухолей проводилось с использованием стандартного метода с применением штангенциркуля. Моноклональные антитела хомяка против мышинового интегрин альфа5, известные как 10E7, были получены в Genentech. Конечная точка эксперимента была достигнута, когда масса опухоли составляла 1,5 грамма или по истечении 60 дней, в зависимости от того, что случалось раньше. В некоторых случаях наблюдение за реагирующими на терапию проводилось дольше. По достижении конечной точки животные были подвергнуты эвтаназии.

Детали лечения описаны ниже.

(1) Контрольная группа: были введены контрольные моноклональные антитела против амброзии полыннолистной (10 мг/кг, внутрибрюшинно (вб), раз в неделю).

(2) Группа единичного препарата против VEGF: введены моноклональные антитела против VEGF B20.4.1 (10 мг/кг, вб, раз в неделю).

(3) Комбинированная группа: B20.41. (10 мг/кг, вб, раз в неделю) и моноклональные антитела хомяка против мышинового интегрин альфа5 10E7 (10 мг/кг, вб, два раза в неделю).

(4) Группа единичного препарата против интегрин альфа5: моноклональные антитела хомяка против мышинового интегрин альфа5 10E7 (10 мг/кг, вб, два раза в неделю).

Данные контрольной группы:

День исследования номер животного	1 TV (мм ³)	4 TV (мм ³)	9 TV (мм ³)	13 TV (мм ³)	16 TV (мм ³)	20 TV (мм ³)	23 TV (мм ³)	27 TV (мм ³)
1	63	75	196	405	550	486	600	1080
2	63	75	126	196	320	320	446	527
3	75	126	288	666	666	936	1080	2048
4	75	126	196	320	320	446	527	936
5	75	126	288	446	486	787	908	1764
6	88	144	221	288	288	405	550	550
7	88	144	320	550	726	1008	1352	2025
8	88	144	144	446	600	1268	1268	1913
9	108	144	245	486	650	700	908	1437
10	144	162	320	527	527	847	1352	2138
среднее	86,5	126,6	234,4	432,8	513,2	720,2	898,9	1441,6
SEM	7,7	9,3	22	43,5	49,7	96,6	112,3	198,2
N	10	10	10	10	10	10	10	10

Данные группы единичного препарата против VEGF:

День исследования номер животного	1 TV (мм ³)	4 TV (мм ³)	9 TV (мм ³)	13 TV (мм ³)	16 TV (мм ³)	20 TV (мм ³)	23 TV (мм ³)	27 TV (мм ³)
1	63	108	144	320	405	550	256	500
2	63	63	100	162	221	288	288	550
3	75	196	365	405	500	320	500	550
4	75	75	196	256	288	500	550	1099
5	75	126	196	320	500	500	550	787
6	88	144	221	320	352	446	446	600
7	88	196	365	405	405	666	726	864
8	88	196	288	320	352	384	288	365
9	108	172	256	500	405	320	288	320
10	144	245	416	567	750	968	1296	1296
среднее	86,5	152	254,6	357,5	417,8	494,1	518,8	693
SEM	7,7	18,7	32,6	36,9	45,8	64,5	99,1	100
N	10	10	10	10	10	10	10	10

Данные группы препарата против VEGF и альфа5бета1:

День исследования номер животного	1 TV (мм ³)	4 TV (мм ³)	9 TV (мм ³)	13 TV (мм ³)	16 TV (мм ³)	20 TV (мм ³)	23 TV (мм ³)	27 TV (мм ³)
1	63	63	63	63	63	108	126	108
2	63	108	172	256	288	288	288	288
3	75	126	126	221	245	245	320	320
4	75	75	75	126	196	288	245	446
5	75	108	172	405	352	650	650	908
6	88	196	221	320	320	288	196	196
7	88	75	196	256	196	288	288	446
8	88	88	144	320	320	288	320	405
9	108	126	144	196	256	320	320	486
10	144	221	270	446	600	650	600	787
среднее	86,5	118,5	158,1	260,8	283,6	341,3	335,3	438,8
SEM	7,7	16,5	19,9	37,3	44	54,7	52,2	78,1
N	10	10	10	10	10	10	10	10

Данные группы единичного препарата против интегрин альфа5:

День исследования номер животного	1 TV (мм ³)	4 TV (мм ³)	9 TV (мм ³)	13 TV (мм ³)	16 TV (мм ³)	20 TV (мм ³)	23 TV (мм ³)	27 TV (мм ³)
1	63	75	196	320	486	787	1008	2025
2	63	108	126	365	365	726	1008	1352
3	75	75	144	288	288	550	600	1008
4	75	108	144	320	320	847	1152	1960
5	75	108	172	365	365	550	486	1152
6	88	196	352	650	787	908	1352	1666
7	88	100	162	245	352	486	1764	Конечная точка 12.08.06, опухоль превысила 1500 мм ³
8	88	126	162	320	446	486	650	650
9	108	288	446	600	1008	1352	936	3179
10	144	162	245	384	352	486	486	288
среднее	86,5	134,6	214,8	385,6	476,7	717,7	944,2	1475,6
SEM	7,7	20,7	33,1	42	74,2	86,7	129,7	286,4
N	10	10	10	10	10	10	10	9

Эти предварительные данные показывают ранние признаки комбинированной активности антагонистов альфа5 и VEGF.

После окончания исследования были вычислены средние объемы опухоли для каждой группы (фигура 11А). Также были построены диаграммы Каплана-Мейера, показывающие процент животных, остающихся в эксперименте как функцию от времени (фигура 11В). Данные показывают, что антитела против интегрин $\alpha 5\beta 1$ увеличивают эффективность антагониста VEGF на модели рака груди.

Пример 13. 7Н12 и бевацизумаб на модели заживления раны уха кролика

Новозеландские белые кролики были взвешены и анестезированы изофлюораном. У каждого кролика с внутренней поверхности и по краям обеих ушных раковин была выстрижена шерсть. Оставшаяся шерсть была удалена с операционных полей депилирующим лосьоном. Операционные поля были очищены бетадиновым скрабом с последующим смачиванием спиртом. Круглый 8 мм прокалывающий инструмент для биопсии был использован для получения в каждом ухе раны глубиной до хряща. Лежащий ниже перихондрий был удален при помощи периостального подъемника и тонких ножниц. На каждую рану был помещен адгезивный перевязочный материал Orsite[®]. После чего кролик был оставлен до выхода из-под наркоза.

Ежедневно перевязочный материал Orsite[®] удалялся, раны осматривались, локально применялось лечение, и накладывался свежий перевязочный материал. Размер раны определялся путем измерения диаметра раны на 0 (немедленно после операции), 7, 10, 14 и 18 день.

Группы лечения были следующими:

Бевацизумаб (антитело против VEGF) 100 мкл в 30 мкл в каждую рану ежедневно (n=4)

7Н12 (антитело против альфа5бета1) 100 мкг в 30 мкл в каждую рану ежедневно (n=4)

Бевацизумаб 100 мкг в 15 мкл и 7Н12 100 мкг в 15 мкл в каждую рану ежедневно (n=4)

Трастузумаб (антитело против HER2) 100 мкг в 30 мкл в каждую рану ежедневно (n=3)

Данные показывают, что комбинированная терапия антагонистом VEGF и антагонистом альфа5бета1 имела поразительный эффект на эту модель ангиогенеза по сравнению с препаратами по одному (фиг. 10).

Пример 14. Комбинированная терапия антителами против альфа5бета1 и антителами против VEGF при раке кишечника

Самкам мышей HRLN nu/nu было введено 1 мм³ фрагментов опухоли HT29 (опухоль кишечника) подкожно в бок. Опухолям позволили расти до тех пор, пока они не достигли среднего размера 80-120 мм³, после лечения. Затем несущие опухоль мыши были разделены на 4 группы:

Группа	Число мышей	Режим лечения 1				Режим лечения 2			
		Препарат	мг/кг	Путь	График	Препарат	мг/кг	Путь	График
1	10	Контроль	10	вб	1 x нед x 7	ФСБ	-	вб	2 x нед x 7
2	10	B20-4.1	10	вб	1 x нед	ФСБ	-	вб	2 x нед
3	10	B20-4.1	10	вб	1 x нед	10E7	10	вб	2 x нед
4	10	ФСБ	-	вб	-	10E7	10	вб	2 x нед

Измерение объема опухоли проводилось дважды в неделю с применением стандартного метода измерения штангенциркулем. Моноклональные антитела хомяка против мышинового альфа5, известные как 10E7, были получены в Genentech. В качестве контрольного IgG были использованы моноклональные антитела против амброзии полыннолистной. Вес тела был измерен 5 раз в течение первых 2 дней, после этого два раза в неделю до конца исследований. Эксперимент оканчивался при объеме опухоли 1 грамм или на 90 день, в зависимости от того, что наступало раньше.

Некоторые реагирующие на лечение животные наблюдались дольше. По достижении конечной точки животные были подвергнуты эвтаназии. Дозировка составляла 10 мл/кг (или 200 мкл на 20 граммовую мышь), объем был подобран в соответствии с весом тела. Для животных, показывающих полную регрессию (CR), в конечной точке ткани с участка имплантации опухоли были собраны и зафиксированы формалином с последующим хранением в 70% EtOH для дальнейшего изучения. Все образцы для заморозки были помещены в криомолд, обернуты в фольгу и быстро заморожены в жидком азоте.

После конечной точки исследования, были вычислены средние объемы опухоли для каждой группы (фигура 12A). Также были построены диаграммы Каплана-Мейера, показывающие процент животных, остающихся в эксперименте как функцию времени (фигура 13B). Данные показывают, что антитело против интегрин $\alpha 5\beta 1$ увеличивает эффективность VEGF на модели рака кишечника.

Пример 15. Антитела против альфа5бета1 и химиотерапия при раке кишечника.

Самкам мышей HRLN nu/nu было введено 5×10⁶ клеток опухоли HCT116 (опухоль кишечника) подкожно в бок. Опухолям позволили расти до тех пор, пока они не достигли среднего размера 80-120 мм³, после чего была начата терапия. Затем несущие опухоль мыши были разделены на 4 группы:

Группа	Число мышей	Режим лечения 1				Режим лечения 2			
		Препарат	мг/кг	Путь	График	Препарат	мг/кг	Путь	График
1	10	ФСБ	-	вб	2 x нед x7	-	-	вб	-
2	10	10E7	10	вб	2 x нед x7	-	-	вб	-
3	10	ФСБ	-	вб	2 x нед x7	иринотекан	100	вб	1 x нед x 3
4	10	10E7	-	вб	2 x нед x7	иринотекан	100	вб	1 x нед x 3

Измерение объема опухоли проводилось дважды в неделю с применением стандартного метода измерения штангенциркулем. Моноклональные антитела хомяка против мышинового альфа5, известные как 10E7, были получены в Genentech. Вес тела был измерен 5 раз в течение первых 2 дней, после этого два раза в неделю до конца исследований. Эксперимент оканчивался при объеме опухоли 1,5 грамма или на 60 день, в зависимости от того, что наступит раньше. Некоторые реагирующие на лечение животные наблюдались дольше. По достижении конечной точки животные были подвергнуты эвтаназии. Дозировка была 10 мл/кг (или 200 мкл на 20 граммовую мышь), объем был подобран в соответствии с весом тела. 10E7 вводились за 30 минут до введения иринотекана. Для животных, показывающих полную регрессию (CR), в конечной точке ткани с участка имплантации опухоли были собраны и зафиксированы формалином с последующим хранением в 70% EtOH для дальнейшего изучения. Все образцы для заморозки были помещены в криомолд, обернуты в фольгу и быстро заморожены в жидком азоте.

После конечной точки исследования, были вычислены средние объемы опухоли для каждой группы (фигура 13А). Также были построены диаграммы Каплана-Мейера, показывающие процент животных, остающихся в эксперименте как функцию времени (фигура 13В). Данные показывают, что антитела против интегрина альфа5бета1 не увеличивают эффективность действия химиотерапевтического препарата (иринотекана) на модели рака кишечника, но также и не препятствует действию химиотерапевтического препарата. Наблюдения согласовывались с нашими предположениями о том, что повреждение сосудов, происходящее до лечения антагонистом альфа5бета1, может быть весьма полезным при антиангиогенезе, а в частности при антиангиогенезе в онкологическом окружении. Подобное повреждение сосудов может быть вызвано антагонистом VEGF, таким как антитело AVASTIN®. Сам по себе химиотерапевтический препарат в данной модели не вызывает заметного повреждения сосудов. Должно предполагаться применение всех этих препаратов (антагонист VEGF/антагонист альфа5бета1/химиотерапевтический препарат) одновременно или последовательно таким образом, что антагонист VEGF присутствует и вызывает сосудистые повреждения.

Пример 16. Графики Скетчарда для альфа5бета1

Антитела против альфа5бета1 были йодированы с использованием метода Iodogen, радиоактивно меченые антитела были очищены от свободного $^{125}\text{I-Na}$ при помощи гель-фильтрации с применением колонки PD-10. Клетки R9ab, клеточная линия фибробластов кролика (приобретенная у ATCC, No.CCL-193) были высеяны в количестве приблизительно 50000 на лунку в 24-луночные планшеты и инкубированы в течение 48 часов в 5% CO_2 при 37°C. Клетки были промыты три раза буфером для связывания (50:50 DMEM/среда F12, содержащая 2% FBS и 50 мМ HEPES, pH 7,2), после чего инкубированы на льду в течение 15 минут. Промытые клетки были инкубированы в течение 4 часов на льду с приблизительно 50 пМ ^{125}I -моноклональных антител против альфа5бета1, содержащих уменьшающиеся концентрации немеченых моноклональных антител против альфа5бета1, разведенные серийно 0,5 мкМ в буфере для связывания в 13 концентрациях, отобранных в трех повторностях. Клетки были промыты три раза буфером для связывания, после чего солибулизированы 200 мкл лизирующего буфера с SDS (1% SDS, 8 М мочевины, 100 мМ глицина, pH 3,0). Была определена радиоактивность лизатов клеток на гамма-счетчике Wallac Wizard 1470. Данные по связыванию были оценены с использованием программы Genentech «NewLigand», которая использует алгоритм аппроксимации

кривой Мансона и Робарда (Munson, P. and Robard, D. (1980) Anal. Biochem. 107: 220-239)

для определения сродства связывания антитела и концентрации участков связывания. На фигурах 14 и 15 показано, что в этих исследованиях связывания антитела 7H5 имеют Kd 0,10 нМ, а антитела 7H12 имеют Kd 0,30 нМ соответственно.

5 Пример 17. Исследования картирования эпитопов/конкурентного связывания IgG против интегрина альфа5бета1

10 Сначала серия трехкратных разведений IgG против интегринa $\alpha 5\beta 1$ была инкубирована в 96-луночном планшете Nunc Maxisorp, покрытом антигеном - человеческим интегрином $\alpha 5\beta 1$ (1 мкг/мл, R&D) в буфере PBST (ФСБ и 0,5% (вес/объем) БСА, и 0,05% (объемных) Твин 20) в течение 1-2 часов при комнатной температуре, с последующим добавлением 0,3 нМ биотинилированного hIgG1 h7H5.v1 (варианта антитела 7H5, полученного Genentech, Inc.), который сначала был определен по субмаксимальному сигналу связывания (50-70%), в течение 15 минут. Затем планшет был промыт 5 раз буфером PBT (ФСБ и 0,05% (объемных) Твин 20). Связанные биотинилированные h7H5.v1 hIgG1 были обнаружены при помощи конъюгированной со стрептавидином пероксидазы хрена (Pierce), разведенной 1:2500 в буфере PBST, проявленной с помощью субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) в течение приблизительно 5 минут, реакция была прекращена 1,0 М H_3PO_4 , после чего проведены измерения на спектрофотометре при 450 нм. Кривые были подобраны с применением программы подбора кривых с нелинейной регрессией и четырьмя параметрами (Kaleidagraph, Synergy Software).

25 На фигуре 16 показано, что связанные h7H5.v1 конкурируют с увеличивающимися количествами холодного m7H5. Фактически, кривая конкуренции m7H5 была почти идентичной кривой конкуренции h7H5.v1 (данные не показаны). Холодные m7H12 также конкурировали с биотин-h7H5.v1 при связывании с альфа5бета1, демонстрируя, что эпитопы связывания альфа5бета1 h7H5.v1 и m7H12 перекрываются. С другой стороны, контрольное антитело не конкурировало со связанным h7H5.v1.

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Genentech, Inc.

<120> КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
 5 АНТАГОНИСТОВ АЛЬФА5БЕТА1

<130> P2320R1

<150> US 60/784704
 10 <151> 2006-03-21

<150> US 60/785,330
 <151> 2006-03-22

<150> US 60/871743
 15 <151> 2006-12-22

<160> 5

<210> 1
 <211> 124
 <212> Белок
 20 <213> Mus musculus

<400> 1
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 25 20 25 30

Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn
 30 50 55 60

Ser Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys
 65 70 75

Ser Gln Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser
 80 85 90

35 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr
 95 100 105

Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 110 115 120

40 Thr Val Ser Ser

<210> 2
 <211> 108
 <212> Белок
 45 <213> Mus musculus

<400> 2
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15

50

Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

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

5 Asn Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 65 70 75

10 Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 80 85 90

Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105

Glu Ile Lys

15

<210> 3
 <211> 451
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Синтетический полипептид

<400> 3
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 1 5 10 15

25 Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

30 Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn
 50 55 60

Ser Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys
 65 70 75

35 Ser Gln Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser
 80 85 90

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr
 95 100 105

Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 110 115 120

40 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 125 130 135

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 140 145 150

45 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 155 160 165

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

50

RU 2 465 282 C2

	170		175		180
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val				
	185		190		195
5	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp				
	200		205		210
	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys				
	215		220		225
10	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly				
	230		235		240
	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				
15	260		265		270
	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly				
	275		280		285
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe				
	290		295		300
20	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln				
	305		310		315
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys				
	320		325		330
25	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly				
	335		340		345
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu				
	350		355		360
30	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly				
	365		370		375
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln				
	380		385		390
35	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp				
	395		400		405
	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg				
	410		415		420
	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
	425		430		435
40	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly				
	440		445		450

Lys

45 <210> 4
 <211> 215
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Синтетический полипептид

<400> 4

5 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro
 35 40 45
 10 Asn Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 65 70 75
 15 Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 80 85 90
 Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105
 20 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 110 115 120
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 125 130 135
 25 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 140 145 150
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 155 160 165
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 170 175 180
 30 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 185 190 195
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 200 205 210
 35 Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 5

<211> 232

<212> Белок

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полипептид

<400> 5

45 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30
 50

Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn
 5 50 55 60
 Ser Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys
 65 70 75
 Ser Gln Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser
 10 80 85 90
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr
 95 100 105
 Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 15 110 115 120
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 125 130 135
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 20 140 145 150
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 155 160 165
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 25 170 175 180
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 185 190 195
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 30 200 205 210
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 215 220 225
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 35 230

Формула изобретения

1. Антитело против альфа5бета1, продуцируемое гибридомой, депонированной под
 40 номером доступа ATCC № PTA-7421, где антитело представляет собой IgG2 и имеет
 значение Kd 0,10 нМ, измеренное с использованием клеток R9ab с номером доступа
 ATCC № CCL-193 согласно методу Скетчарда.

2. Антитело против альфа5бета1, продуцируемое гибридомой, депонированной под
 45 номером доступа ATCC № PTA-7420, где антитело представляет собой IgG2 и имеет
 значение Kd 0,30 нМ, измеренное с использованием клеток R9ab с номером доступа
 ATCC № CCL-193 согласно методу Скетчарда.

3. Антитело, конъюгированное с терапевтическим средством, для ингибирования
 ангиогенеза и/или сосудистой проницаемости, где антитело продуцируется
 50 гибридомой, депонированной под номером доступа ATCC № PTA-7421, или
 гибридомой, депонированной под номером доступа ATCC № PTA-7420, где антитело
 представляет собой IgG2, где антитело, продуцируемое гибридомой ATCC №
 PTA-7421, имеет значение Kd 0,10 нМ, и антитело, продуцируемое гибридомой ATCC

№ РТА-7420, имеет значение Kd 0,30 нМ, что измерено с использованием клеток R9ab с номером доступа АТСС № ССL-193 согласно методу Скетчарда.

4. Антитело по п.3, где терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из цитотоксического средства, радиоизотопа и химиотерапевтического средства.

5. Антитело, конъюгированное с меткой, для применения в диагностике заболевания, связанного с экспрессией альфа5бета1, где антитело продуцируется гибридомой, депонированной под номером доступа АТСС № РТА-7421, или гибридомой, депонированной под номером доступа АТСС № РТА-7420, где антитело представляет собой IgG2, где антитело, продуцируемое гибридомой АТСС № РТА-7421, имеет значение Kd 0,10 нМ, и антитело, продуцируемое гибридомой АТСС № РТА-7420, имеет значение Kd 0,30 нМ, что измерено с использованием клеток R9ab с номером доступа АТСС № ССL-193 согласно методу Скетчарда.

6. Антитело по п.5, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоизотопа, флуоресцентного красителя и фермента.

7. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по п.1 или 2.

8. Экспрессионный вектор, кодирующий молекулу нуклеиновой кислоты по п.7.

9. Рекombинантная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.7.

10. Клетка по п.9, где клетка является гибридомой, депонированной под номером доступа АТСС № РТА-7421, или гибридомой, депонированной под номером доступа АТСС № РТА-7420.

11. Способ получения антитела, включающий культивирование клеток по п.9 или 10 и выделение антител из клеточной культуры.

12. Фармацевтическая композиция для ингибирования ангиогенеза и/или сосудистой проницаемости, включающая эффективное количество антитела по п.1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ обнаружения белка альфа5бета1 в образце от пациента *in vitro* путем приведения образца в контакт с антителом по п.1 или 2 и обнаружения антитела против альфа5бета1, связанного с белком альфа5бета1.

14. Способ по п.13, где антитело используется в иммуногистохимических исследованиях (ИГХ) или в исследованиях с использованием ИФА.

15. Применение антитела по п.1 или 2 при производстве лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза и/или проницаемости сосудов у субъекта.

16. Применение антитела по п.1 или 2 при производстве лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта, где заболевание сопровождается патологическим ангиогенезом или патологической проницаемостью сосудов.

17. Применение антитела против альфа5бета1 по п.1 или 2 в производстве лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза и/или проницаемости сосудов у субъекта, страдающего от заболевания, сопровождающегося патологическим ангиогенезом или патологической проницаемостью сосудов, где антитело против альфа5бета1 по п.1 или 2 вводят указанному субъекту в сочетании с антагонистом VEGF.

18. Применение по п.17, где заболевание выбрано из рака, заболевания глаза и аутоиммунного заболевания.

19. Применение по п.17, где субъекту вводят антагонист VEGF, а затем антитело против альфа5бета1.

20. Применение по п.17, где антагонист VEGF и антитело против альфа5бета1 вводят субъекту одновременно.

21. Применение по п.17, где субъект подвергается лечению антагонистом VEGF до тех пор, пока субъект не перестает реагировать на лечение антагонистом VEGF, после чего субъект подвергается лечению антителом против альфа5бета1.

22. Применение по п.17, где заболевание представляет собой рак, и субъект подвергается лечению антагонистом VEGF, когда рак не является инвазивным, и лечению антителом против альфа5бета1, когда рак является инвазивным.

23. Применение по п.17, где субъект имеет повышенные уровни альфа5бета1 в пораженной ткани по сравнению с тканью субъекта, не страдающего от болезни.

24. Применение по п.17, где субъекту дополнительно вводят терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из анти-неопластического средства, химиотерапевтического средства, ингибирующего рост средства и цитотоксического средства.

25. Применение по п.17, где антагонист VEGF представляет собой бевацизумаб.

26. Применение по п.17, где антитело против альфа5бета1 конъюгировано с цитотоксическим средством.

27. Применение по п.26, где цитотоксическое средство представляет собой радиоактивный изотоп, химиотерапевтическое средство или токсин.

28. Фармацевтическая композиция для ингибирования ангиогенеза и/или сосудистой проницаемости, содержащая эффективное количество антагониста VEGF, эффективное количество антитела против альфа5бета1 по п.1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Набор для обнаружения альфа5бета1 у субъекта, который подвергался лечению антагонистом VEGF, содержащий

антитело против альфа5бета1 по п.1 или 2 и

инструкции по обнаружению альфа5бета1 у субъекта, который подвергался лечению антагонистом VEGF.

30. Применение композиции по п.28 при производстве лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза и/или сосудистой проницаемости у субъекта, страдающего заболеванием.

31. Применение по п.30, где заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, заболевания глаза и аутоиммунного заболевания.

32. Применение по п.30, где заболевание выбрано из группы, состоящей из солидной опухоли, метастатической опухоли, опухоли мягких тканей, заболевания, связанного с неоваскуляризацией глаза, воспалительного заболевания, сопровождаемого патологическим ангиогенезом, заболевания, возникающего после трансплантации субъекту, и заболевания, сопровождающегося патологическим развитием сосудисто-волокнистой ткани.

33. Применение по п.31, где рак выбран из группы, состоящей из рака груди, рака шейки матки, рака кишечника, рака легких, неходжжкинской лимфомы (NHL), почечноклеточного рака, рака простаты, рака печени, рака головы и шеи, меланомы, рака яичника, мезотелиомы, рака мягких тканей и множественной миеломы.

34. Применение по п.30, где заболевание выбрано из группы, состоящей из ретинопатии, вызванной возрастом дегенерации желтого пятна, рубеоза, псориаза, псориатического артрита и воспалительных заболеваний почек, гемолитического уремического синдрома, диабетической нефропатии, артрита, воспалительной болезни кишечника, хронического воспаления, хронического отслоения сетчатки, хронического увеита, хронического витрита, отторжения трансплантата роговицы, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации трансплантата роговицы, болезни

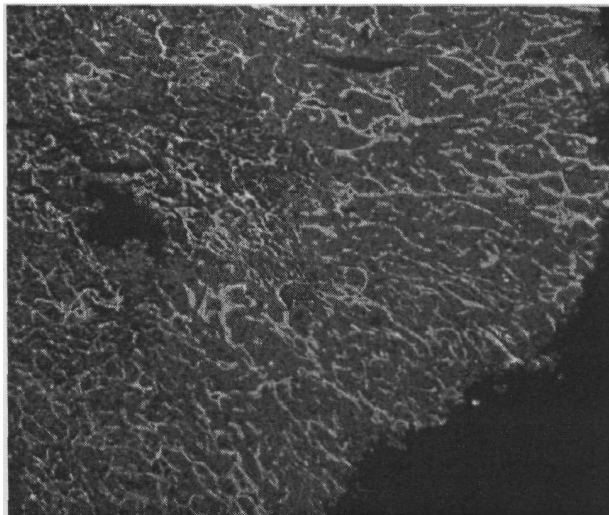
Крона, миопии, глазной неоваскулярной болезни, остеоартритов, болезни Педжета, пемфигоида, полиартрита, постлазерной радиальной кератотомии, неоваскуляризации сетчатки, синдрома Шегрена, язвенного колита, отторжения трансплантата, воспаления легких, нефротического синдрома, отека, асцитов, ассоциированных со злокачественными опухолями, удара, ангиофибромы и неоваскулярной глаукомы.

35. Применение антитела по п.1 или 2 при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего от заболевания, где субъект реагировал на лечение заболевания антагонистом VEGF, но частично или полностью перестал реагировать на антагонист VEGF.

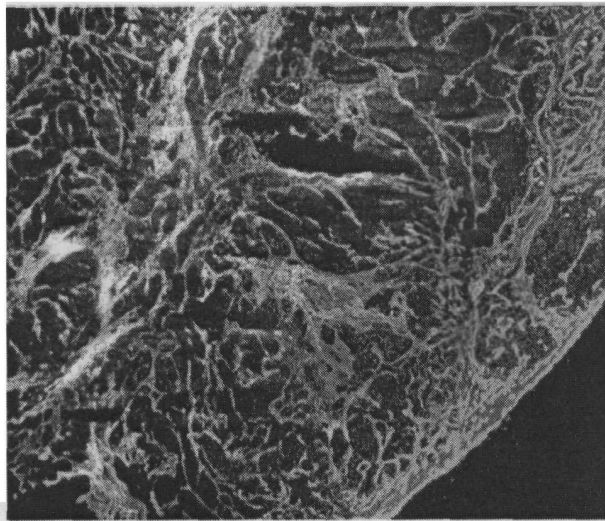
36. Применение по п.35, где субъект имеет повышенные уровни альфа5бета1 в пораженной болезнью ткани по сравнению с субъектом, не страдающим заболеванием.

37. Применение по п.36, где субъекту дополнительно вводят терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из антинеопластического средства, химиотерапевтического средства, ингибирующего рост средства и цитотоксического средства.

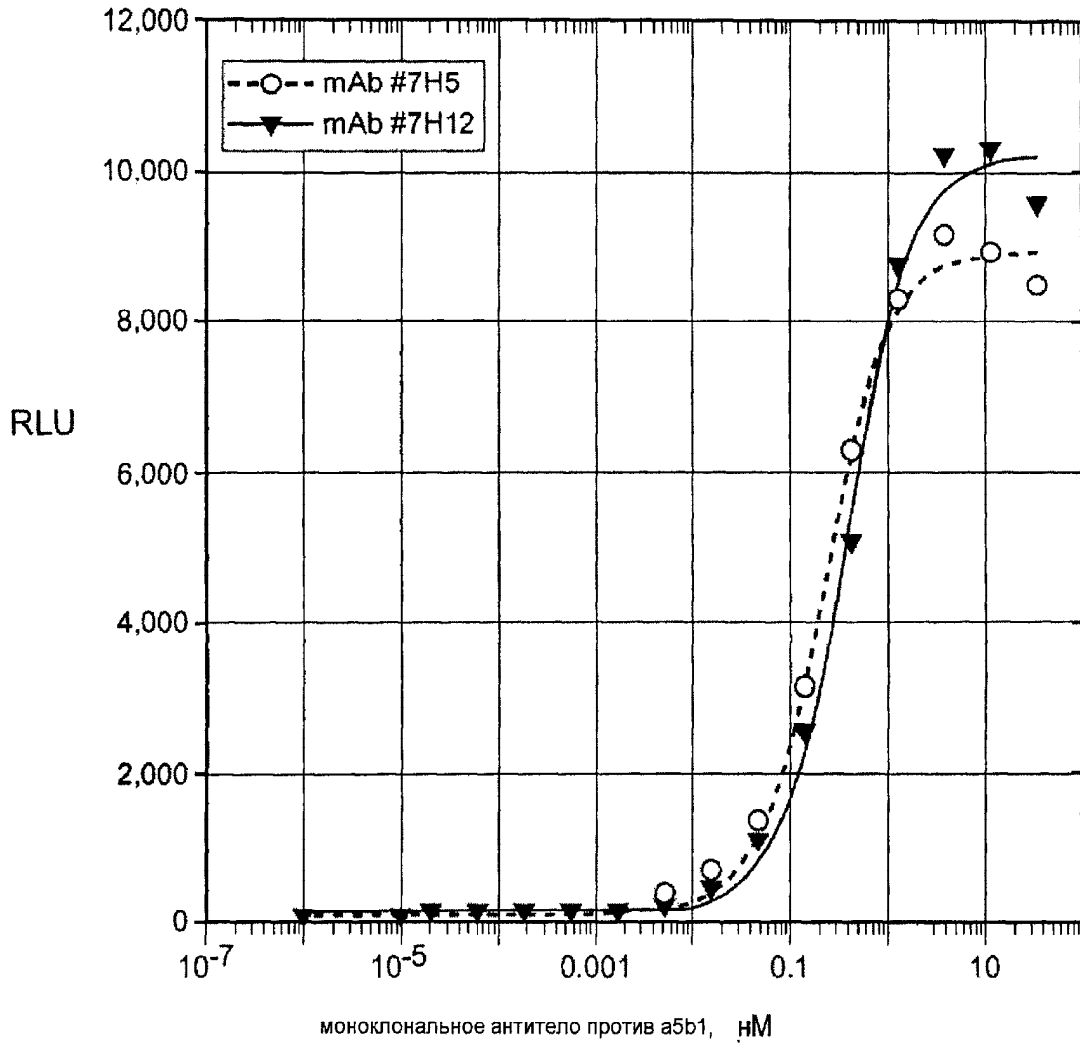
Против Ragweed



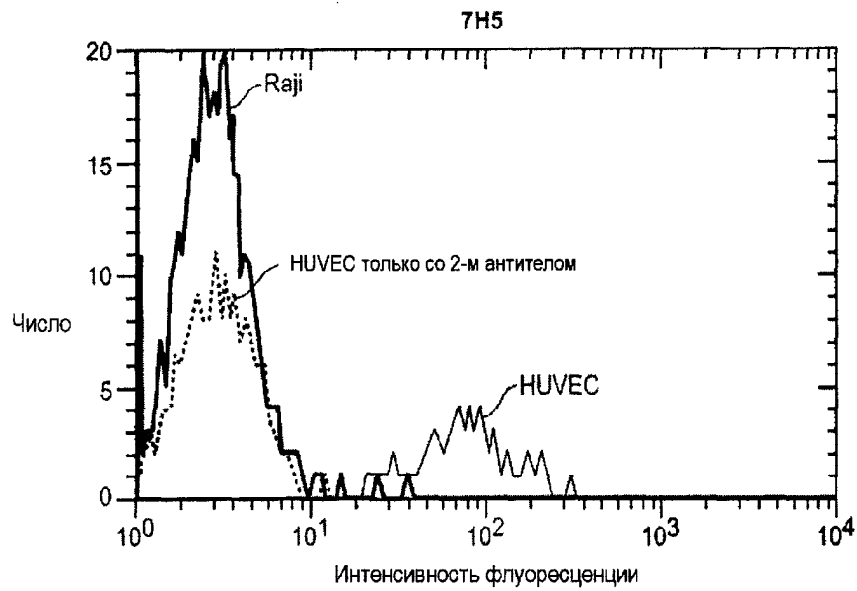
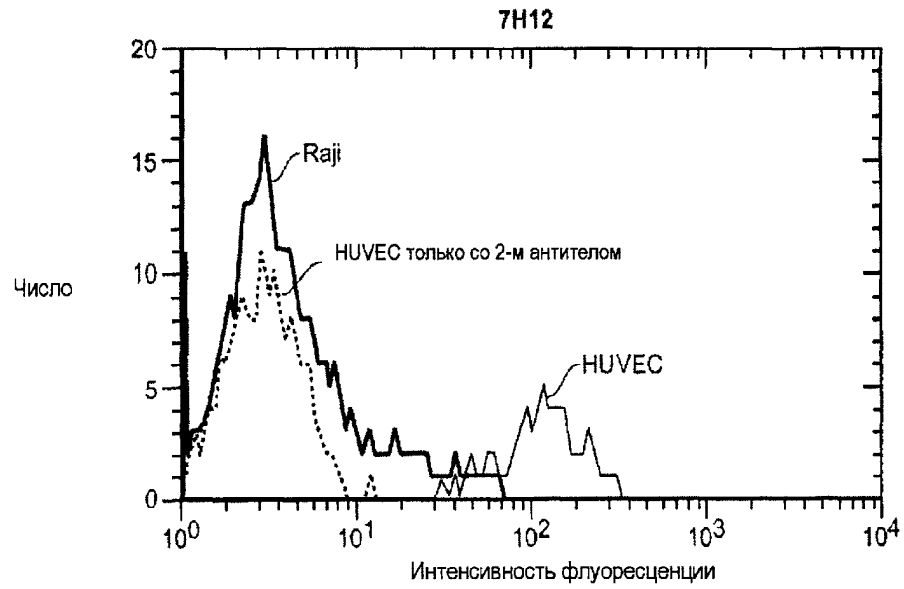
Против VEGF (B20.4.1)



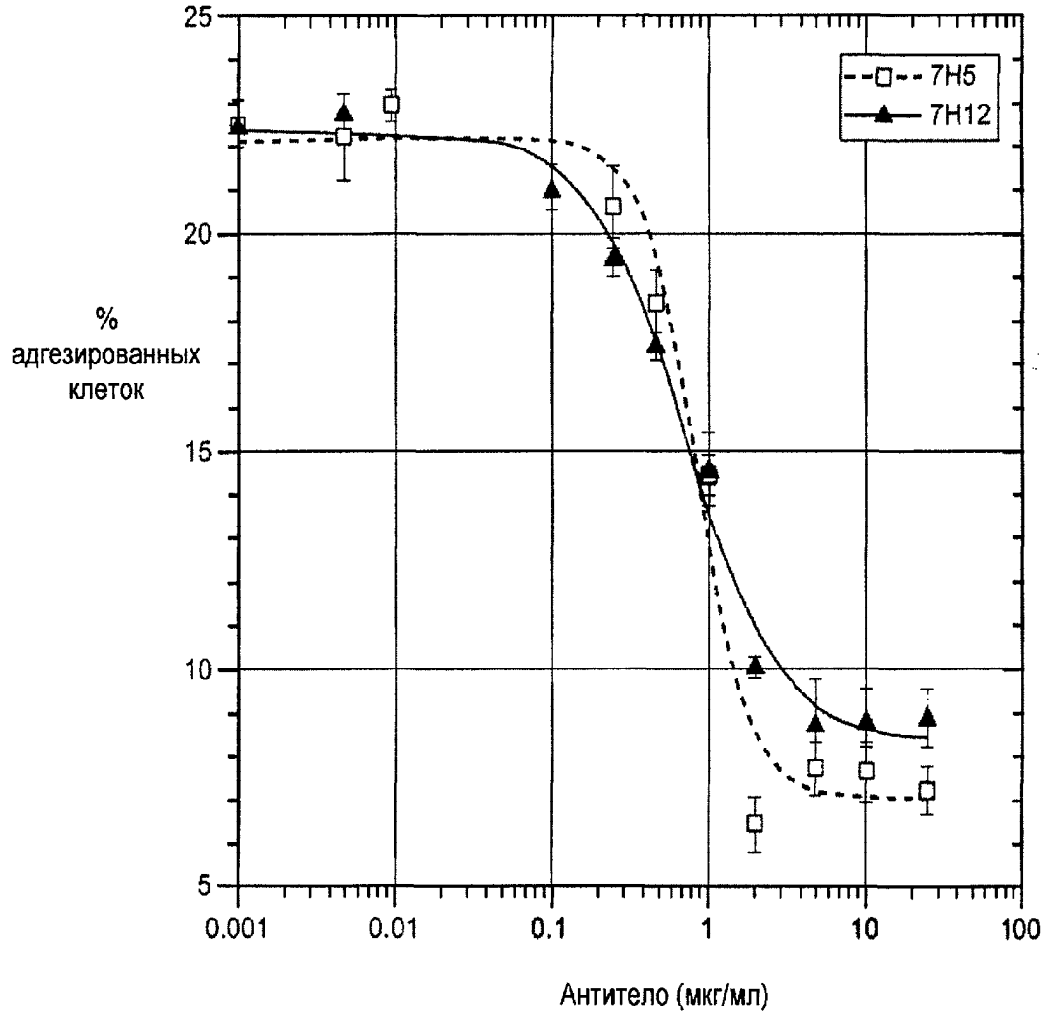
ФИГ.1



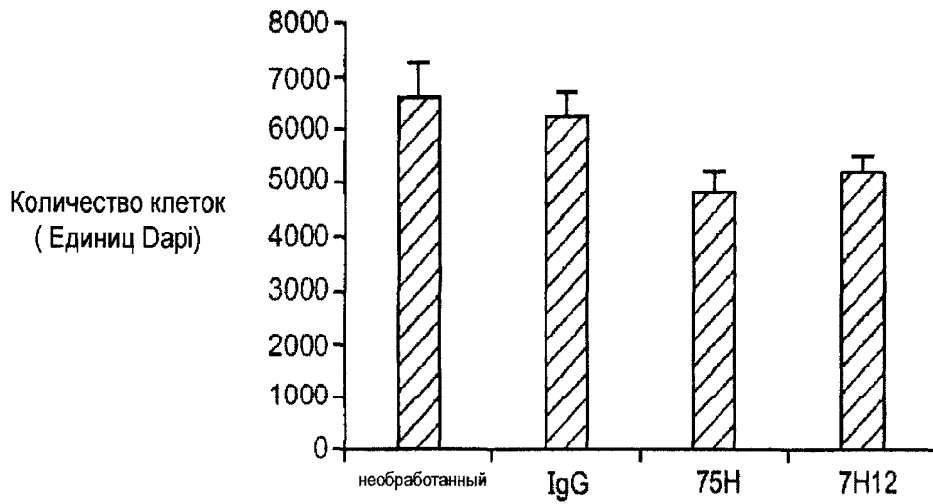
ФИГ.2



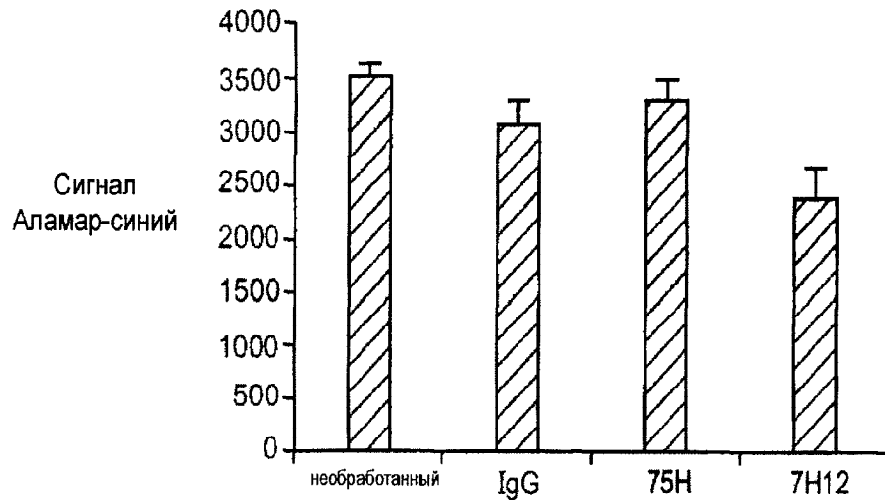
ФИГ.3



ФИГ.4



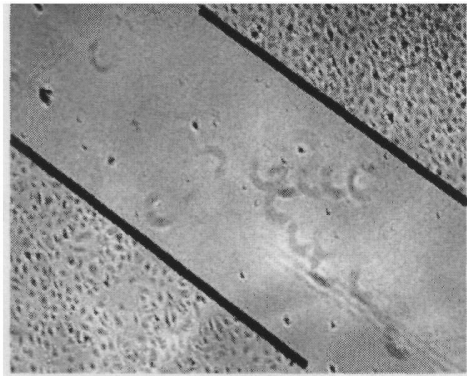
ФИГ.5А



ФИГ.5В

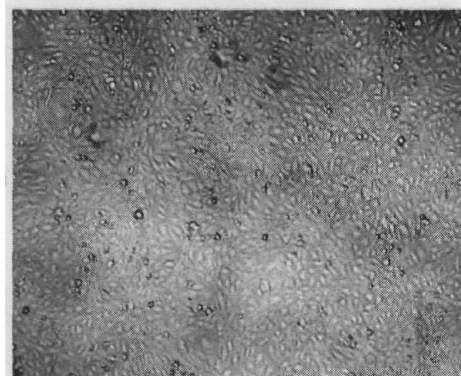
Контрольное IgG

0 ч



ФИГ.6А

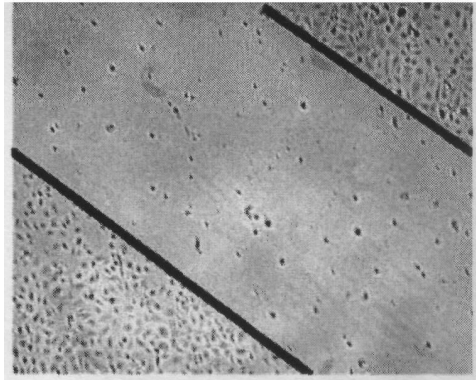
30 ч



Контрольное IgG

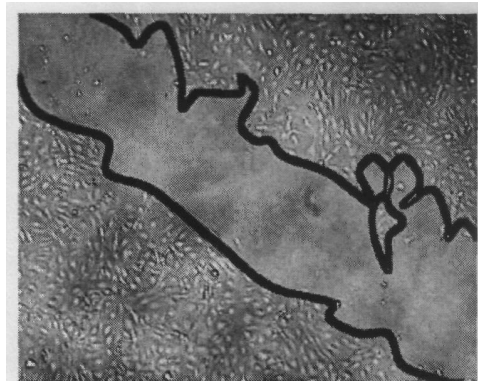
ФИГ.6В

7H5



0 ч

ФИГ.6С

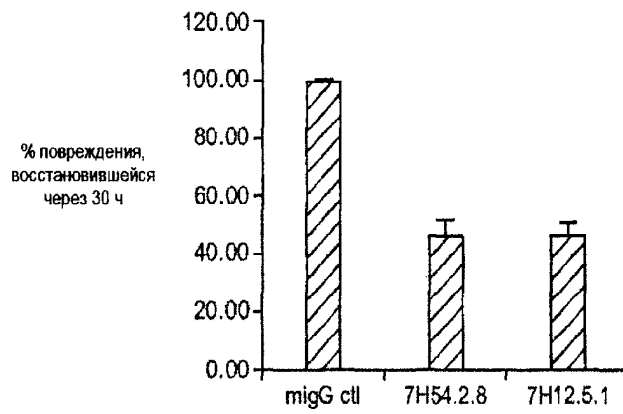


30 ч

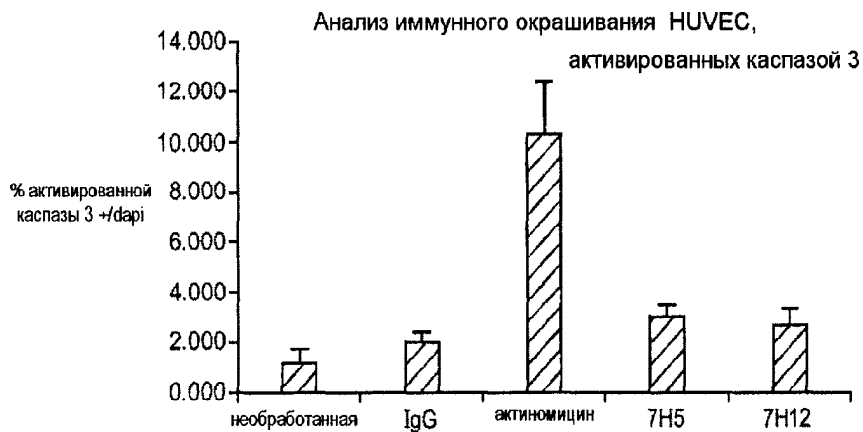
7H5

ФИГ.6D

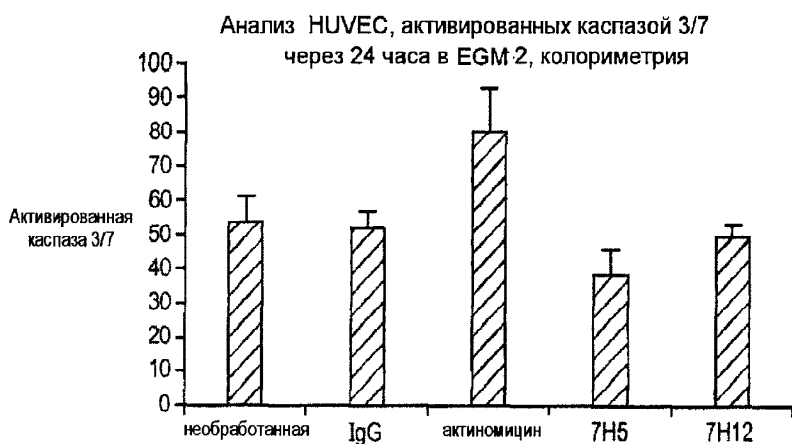
Анализ миграции HUVEC при заживлении раны



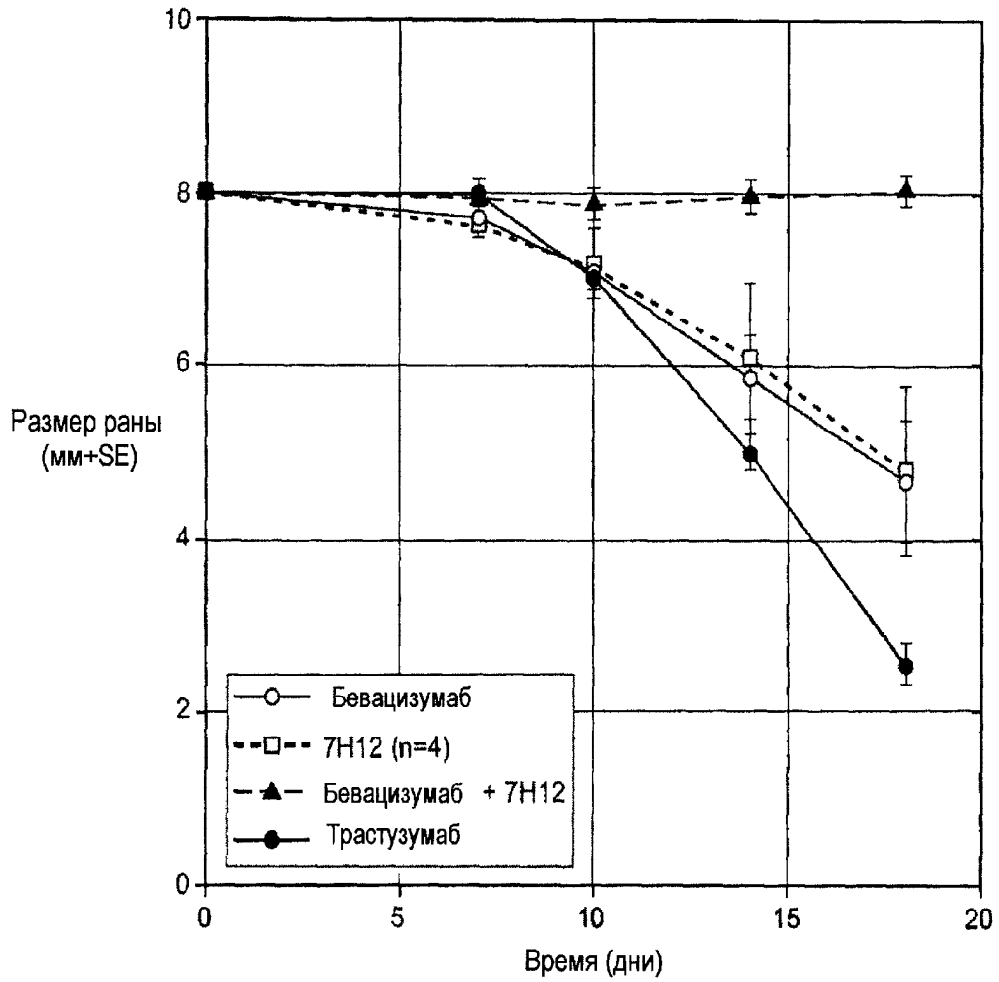
ФИГ.7



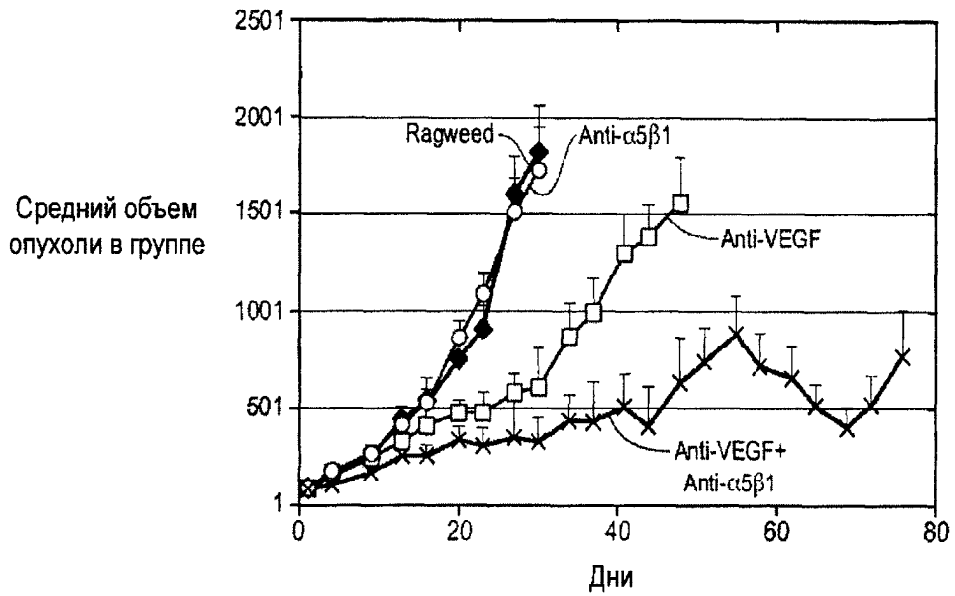
ФИГ.8



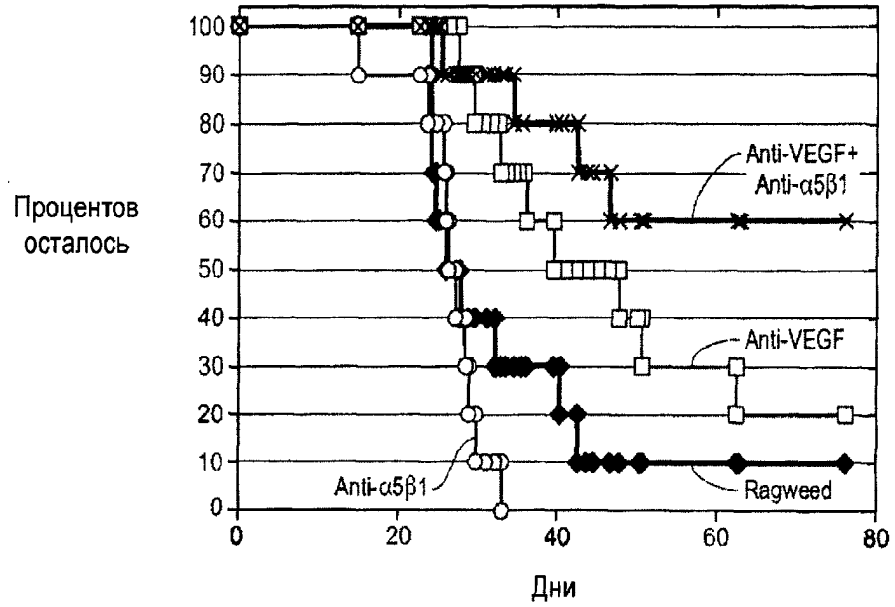
ФИГ.9



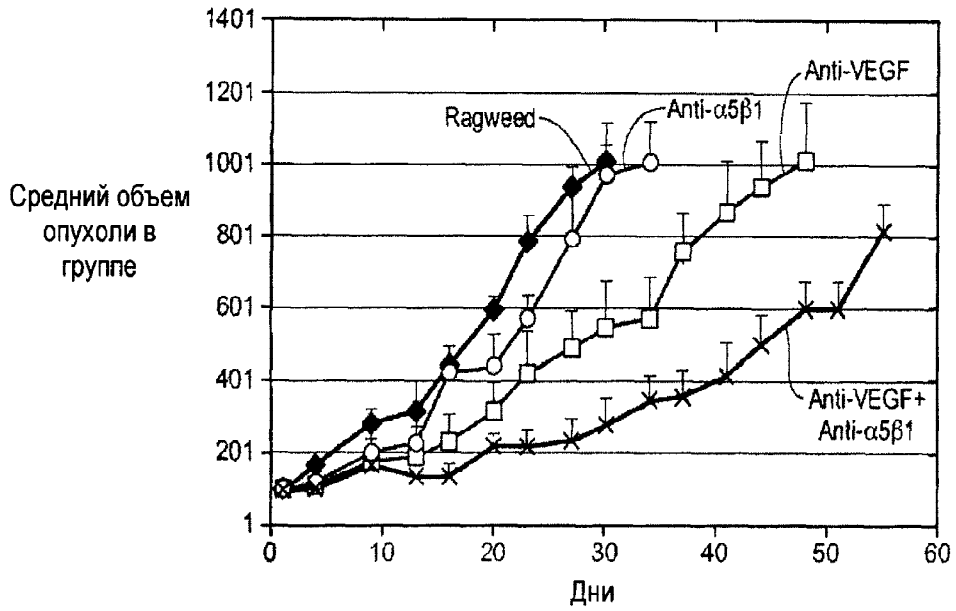
ФИГ.10



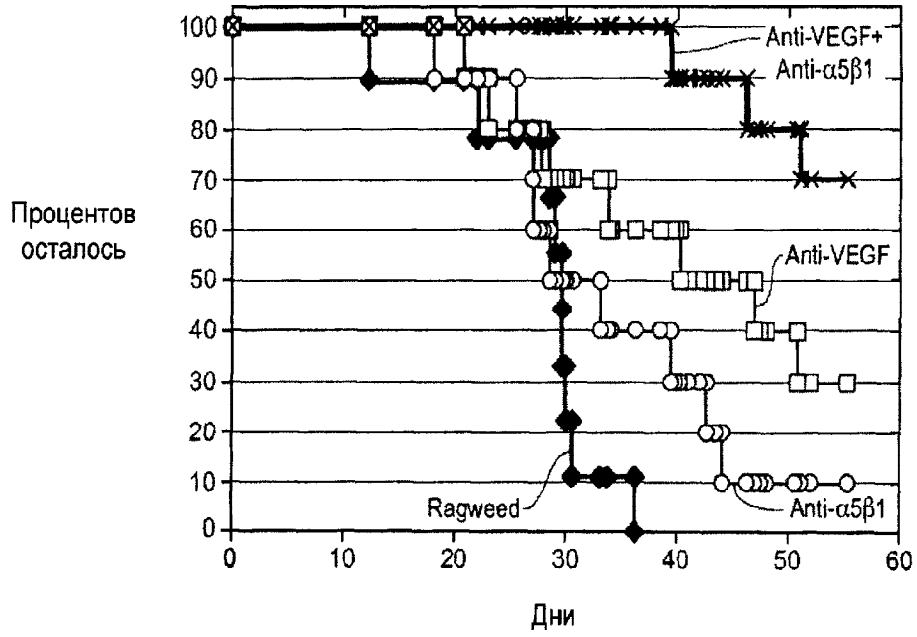
ФИГ.11А



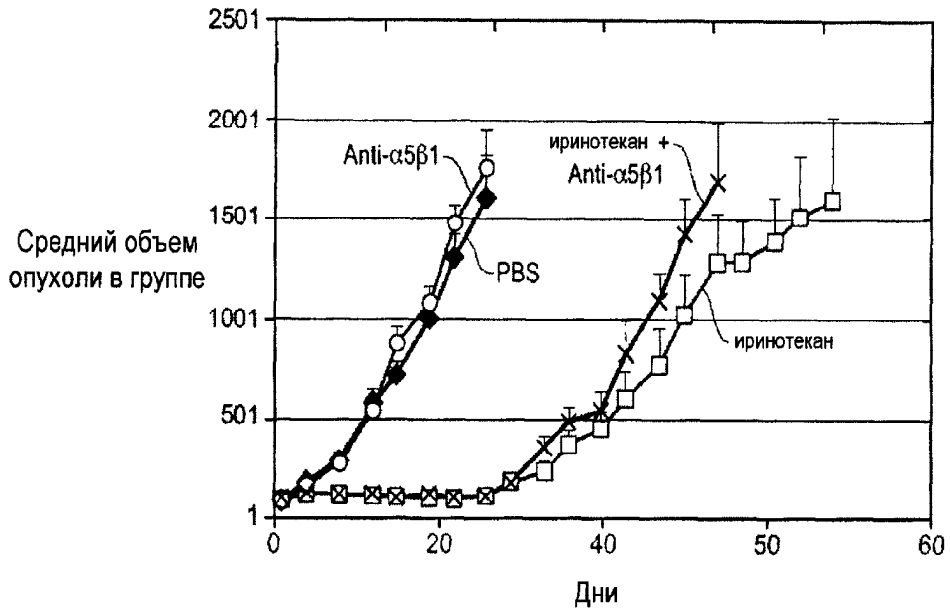
ФИГ.11В



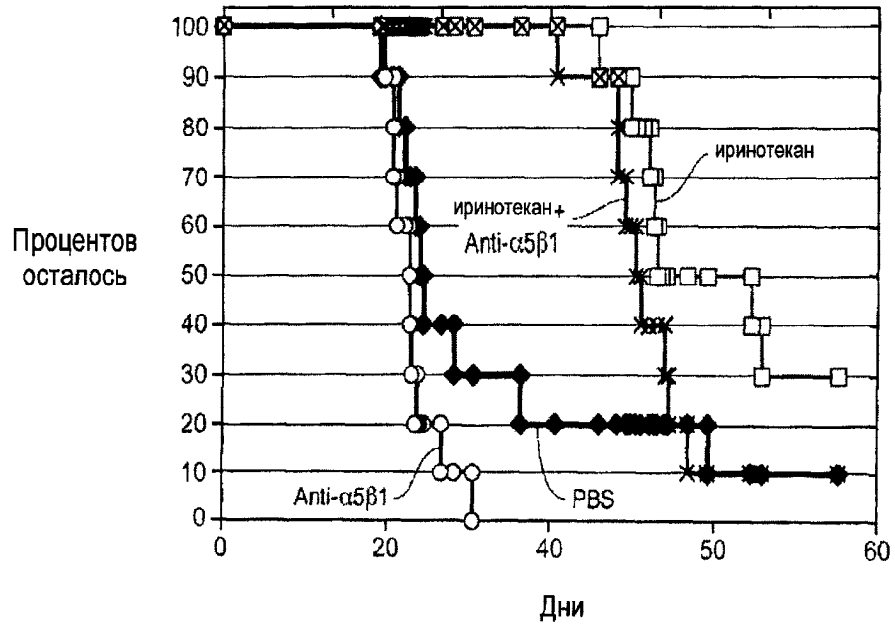
ФИГ.12А



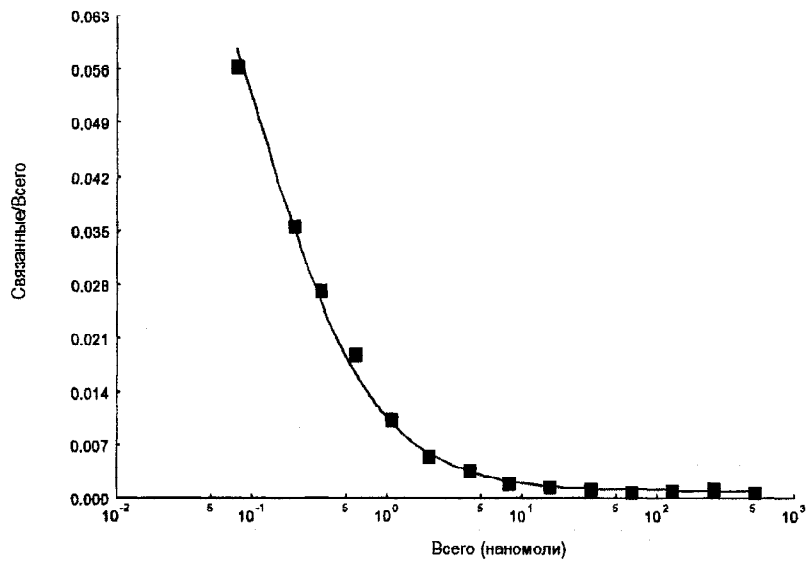
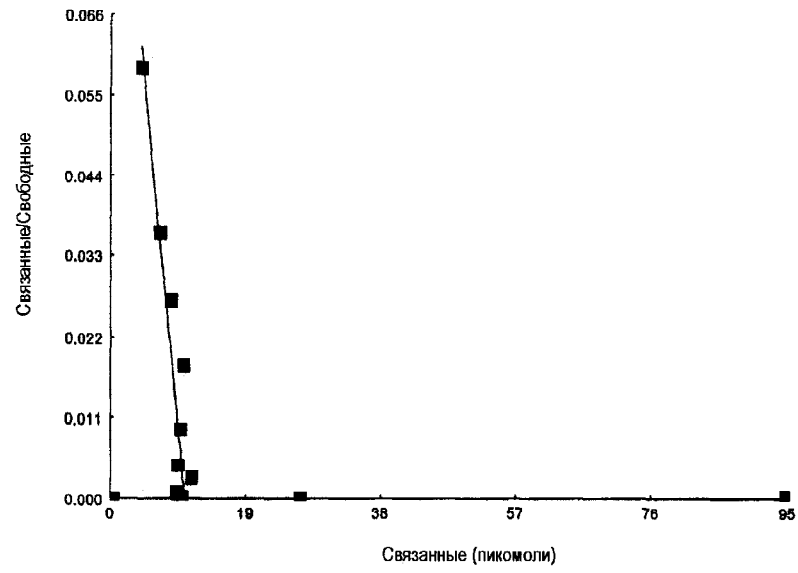
ФИГ.12В



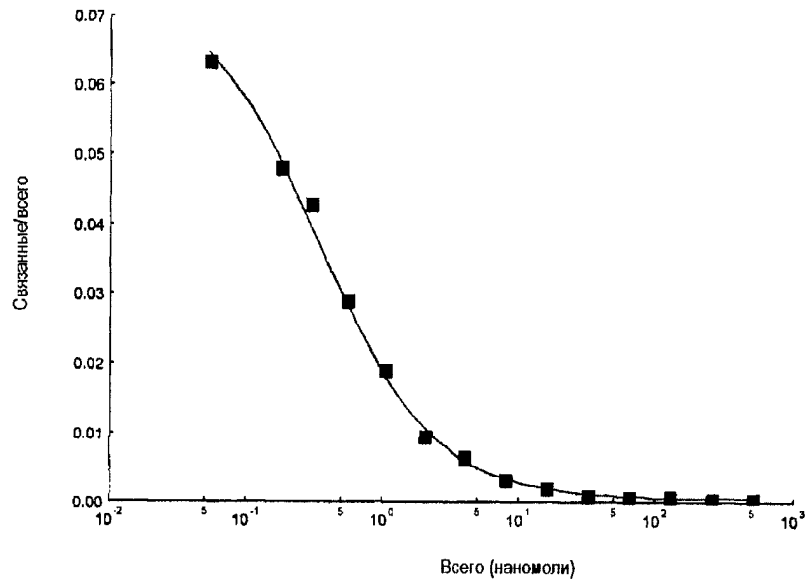
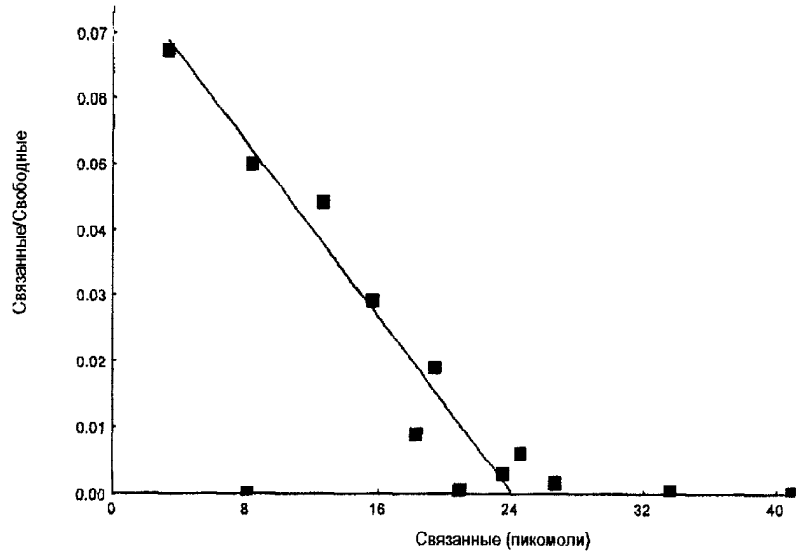
ФИГ.13А



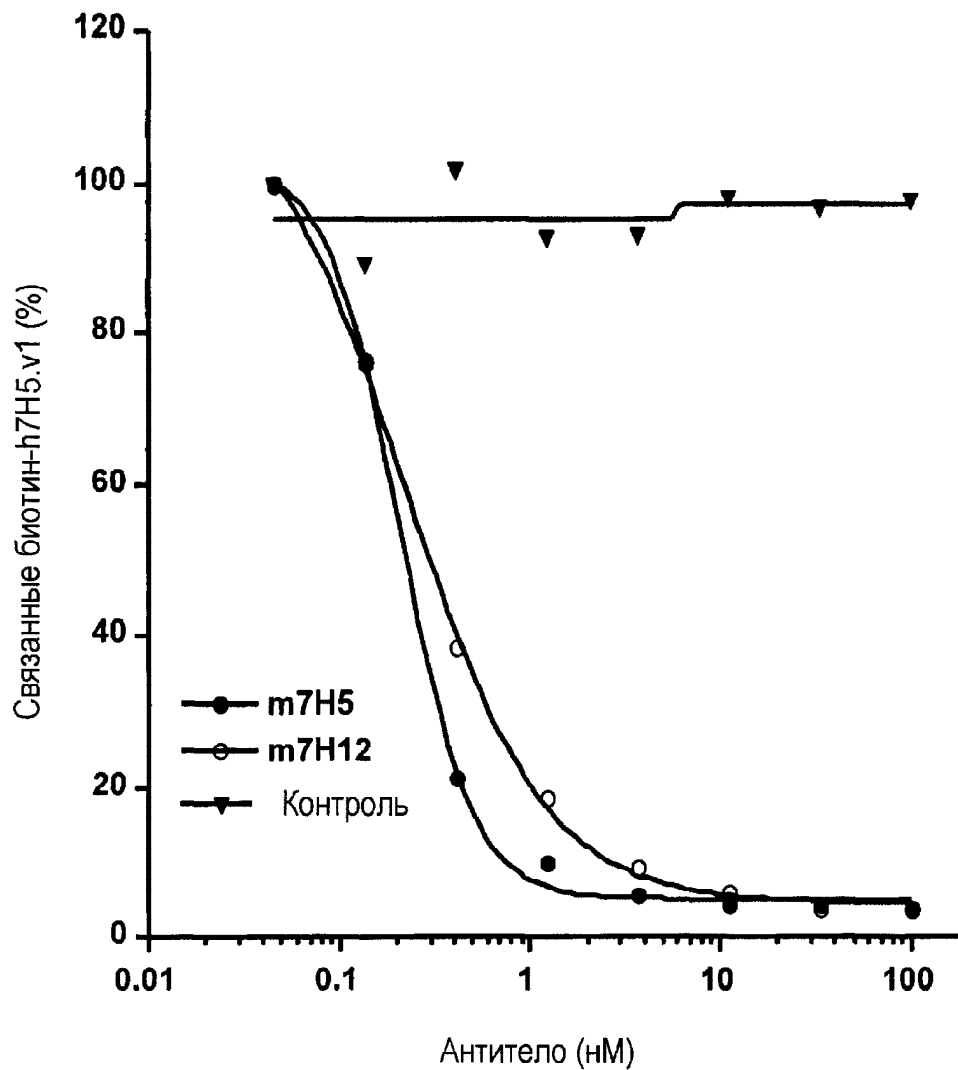
ФИГ.13В



ФИГ.14



ФИГ.15



ФИГ.16