



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115789** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00
A61P 27/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 01709	(72) Винахідник(и): Бенедікт С'юзанн (US), Меннінг Марк Корнелл (US), Мерфі Браян М. (US), Ріал Шарон (US), Тейер Чарлз (US)
(22) Дата подання заявки: 05.09.2013	(73) Власник(и): ТРЕЙКОН ФАРМАСУТИКАЛЗ, ІНК., 8910 University Center Lane, Suite 700, San Diego, CA 92122, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.12.2017	(74) Представник: Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 61/697,111	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010039873 A2, 08.04.2010 WO 2011022339 A1, 24.02.2011 WO 2011041441 A1, 07.04.2011 WO 2010032059 A2, 25.03.2010 Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics / D. Lowe, K. Dudgeon, R. Rouet et. al. // Advances in protein chemistry and structural biology. – 2011. - Vol. 84. - P. 42-61
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 05.09.2012	
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 12.05.2015, Бюл.№ 9	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2017, Бюл.№ 24	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2013/058265, 05.09.2013	

(54) КОМПОЗИЦІЯ АНТИТІЛА ДО CD105 ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується композиції, що містить від приблизно 25 до приблизно 100 мг/мл антитіла до CD105, від 10 до 20 мМ буферного агента, до приблизно 240 мМ поліолу та рН від приблизно 4,0 до приблизно 5,5; де буферним агентом є ацетат, гістидин або фосфат, де поліол є цукром, і де композиція підтримує стабільність та ефективність антитіла до CD105. Також винахід стосується заздалегідь наповненого шприца, придатного для внутрішньовенного або інтравітrealного введення, що включає дану композицію, та застосування композиції у формуванні лікарського засобу для лікування захворювання, пов'язаного з ангиогенезом.

UA 115789 C2

Модель регулювання ангиогенезу з допомогою CD105 (Ендогліну)

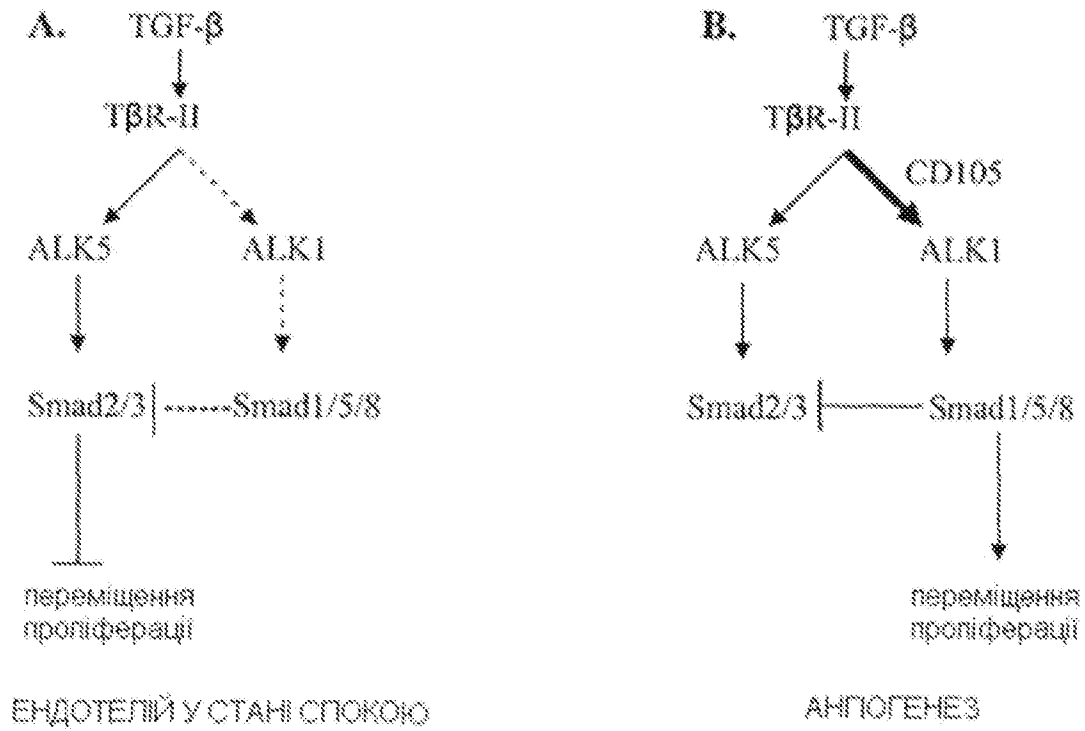


Fig. 2

[0001] Ця заявка містить перелік послідовностей, який був представлений у форматі ASCII з допомогою програмного додатку EFS-Web та є включеним сюди у вигляді посилання в повному обсязі. Зазначена копія ASCII, створена 4 вересня 2013 р., отримала назву 35882-714.601_SL.txt та має розмір 22121 байт.

[0002] Рак є другою головною причиною смерті людини після серцево-судинних захворювань, та кожен рік мільйони людей вмирають від цієї хвороби. Тільки у Сполучених Штатах кожного року рак викликає смерть значно більш, ніж півмільйона осіб разом з появою приблизно 1,4 мільйонів нових встановлених випадків цього захворювання. У той час, як кількість смертельних випадків від серцево-судинних захворювань значно скорочується, кількість смертей від раку звичайно зростає, та у багатьох країнах рак вже є головною причиною смерті.

[0003] Крім того, загальний досвід навіть тих хворих на рак, яким спочатку вдалося вижити після первинної стадії захворювання, показав, що їх життя різко змінилося. Багато хворих на рак відчують сильні побоювання, обумовлені усвідомленням можливості повторення хвороби або невдалого лікування. Також багато хворих на рак після лікування відчують значне фізичне виснаження.

[0004] Взагалі кажучи, основною проблемою у лікуванні найбільш смертоносних видів раку є відсутність ефективної та нетоксичної системної терапії. Рак є складним захворюванням, що характеризується наявністю генетичних мутацій, які призводять до неконтрольованого росту клітин. Ракові клітини є присутніми у всіх організмах, та в нормальних умовах їх надмірний ріст жорстко регулюється різними фізіологічними факторами.

[0005] Ангіогенез є фізіологічним процесом, при якому з вже існуючих судин розвиваються нові кровоносні судини. Припускають, що ангіогенез відіграє важливу роль у розвитку як нормальних, так і патологічних процесів. Наприклад, ангіогенні процеси є залученими до розвитку судинних систем тваринних органів та тканин.

[0006] У разі виникнення деяких патологічних станів стимулювання ангіогенезу є засобом забезпечення належного постачання крові та поживних речовин до клітин всередині ураженої тканини. Багато з цих патологічних станів охоплюють проліферацію та/або регулювання аберантних клітин. Солідні види раку та ексудативна дегенерація жовтої плями залежать від задіяння нового кровопостачання для подовження росту, а також утворення метастазу.

[0007] Заявленим винаходом створені нові композиції анти-CD105 антитіл, попередньо заповнені шприці, які містять ці композиції та застосування цих композицій у лікуванні пов'язаних з ангіогенезом розладів. Заявленим винаходом створені композиції, які можуть бути застосовані для внутрішньовенного або внутрішньоочного введення, наприклад, для лікування пов'язаних з CD105 онкологічних захворювань та офтальмологічних станів.

[0008] У одному аспекті передбачено композицію, яка містить приблизно 1-150 мг/мл анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту, до приблизно 100 мМ буферизуючого агента, до приблизно 1 М поліолу, та має pH у межах приблизно 4,0-7,5.

[0009] У одному аспекті, композиція в процесі отримання є стійкою речовиною, яку можна піддати перевірці з допомогою загальноприйнятих засобів. Щодо стійкості композиції протягом часу, то принаймні 95% анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту може знаходитися у вигляді мономерів протягом принаймні приблизно 12-місячного зберігання при температурі приблизно 2-8°C, як було виміряно шляхом ексклюзійної хроматографії (SEC). У деяких втіленнях буферизуючим агентом такої композиції є гістидин або фосфатно-сольовий буфер. Також щодо стійкості композиції протягом часу слід зазначити, що принаймні 90% анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту може знаходитися у вигляді мономерів протягом принаймні приблизно 6-місячного зберігання при температурі приблизно 25°C, як було виміряно ексклюзійної хроматографії (SEC). У деяких втіленнях буферизуючим агентом таких композицій є ацетат.

[0010] Крім того, анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент виявляє приблизно 50-150% зв'язування в результаті CD105 ІФА перевірки на зв'язувальну властивість після зберігання при температурі приблизно 2-8°C протягом принаймні 12 місяців.

[0011] Середня ізоелектрична точка (pI) анти-CD105 антитіла може дорівнювати приблизно 8.7-9.2 після принаймні приблизно 12-місячного зберігання при температурі приблизно 2-8°C, як було визначено, шляхом наприклад, капілярного електрофорезу-ізоелектричного фокусування.

[0012] Будь-якому фахівцю буде зрозуміло, що анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент може зберігати стійкість протягом принаймні приблизно 12 місяців, принаймні приблизно 18 місяців, принаймні приблизно 24 місяців, принаймні приблизно 30 місяців, принаймні приблизно 36 місяців або більше.

[0013] Композиція може містити принаймні 95% анти-CD105 антитіл у вигляді мономерів, як

було виміряно шляхом SEC під час циклів заморожування-відтавання цієї речовини. Альтернативним чином або додатково композиція може містити принаймні 95% анти-CD105 антитіл у вигляді мономерів, як було виміряно шляхом SEC при їх струшуванні.

[0014] Анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент може містити будь-яку послідовність, яка має CDR-ділянки, здатні до зв'язування з CD105. У одному необмеженому втіленні анти-CD105 антитіло містить легколанцюгову змінну ділянку (V_L), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 1; легколанцюгову сталу ділянку (C_L), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 2; важколанцюгову змінну ділянку (V_H), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 3; та сталу ділянку (F_C), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 4 (Див., наприклад, Фіг. 1).

[0015] У іншому необмеженому втіленні анти-CD105 антитіло містить ділянку V_L CDR1, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 5; ділянку V_L CDR2, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 6; ділянку V_L CDR3, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 7; ділянку V_H CDR1, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 8; ділянку V_H CDR2, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 9; та ділянку V_H CDR3, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 10.

[0016] Виділені гуманізовані, деімунізовані анти-CD105 антитіла можуть містити важколанцюгову змінну ділянку, як має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 11 та легколанцюгову змінну ділянку, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 12. Інші необмежені приклади гуманізованих-деімунізованих важких ланцюгів охоплюють, але без обмеження, послідовності SEQ ID №№: 13, 14, 15 та 16. Інші необмежені приклади гуманізованих-деімунізованих легких ланцюгів охоплюють, але без обмеження, послідовності SEQ ID №№: 17, 18, 19, 20, 21, 22, та 23. Ці послідовності наведені нижче у Прикладі 17.

[0017] Композиція може містити приблизно 1-150 мг/мл анти-CD105 антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів або будь-яку їх кількість, включаючи, але без обмеження приблизно 2 мг/мл, приблизно 5 мг/мл, приблизно 7.5 мг/мл, приблизно 10 мг/мл, 20 мг/мл, приблизно 25 мг/мл, приблизно 30 мг/мл, приблизно 35 мг/мл, приблизно 40 мг/мл, приблизно 45 мг/мл, приблизно 50 мг/мл, приблизно 55 мг/мл, приблизно 60 мг/мл, приблизно 65 мг/мл, приблизно 70 мг/мл, приблизно 75 мг/мл, приблизно 80 мг/мл, приблизно 85 мг/мл, приблизно 90 мг/мл, приблизно 95 мг/мл, приблизно 100 мг/мл, приблизно 105 мг/мл, приблизно 110 мг/мл, приблизно 115 мг/мл, приблизно 120 мг/мл, приблизно 125 мг/мл, приблизно 130 мг/мл, приблизно 135 мг/мл, приблизно 140 мг/мл, приблизно 145 мг/мл, приблизно 150 мг/мл або більше.

[0018] У одному втіленні композиція містить приблизно 25 мг/мл анти-CD105 антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів.

[0019] У іншому втіленні композиція містить приблизно 50 мг/мл анти-CD105 антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів.

[0020] У іншому втіленні композиція містить приблизно 100 мг/мл анти-CD105 антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів

[0021] Композиції, подібні описаним тут можуть містити буферизуючий агент, як-то, наприклад, гістидин, ацетат, цитрат або фосфат. У одному втіленні композиція містить приблизно 5 мМ, приблизно 7.5 мМ, приблизно 10 мМ, приблизно 12.5 мМ, приблизно 15 мМ, приблизно 17.5 мМ, 20 мМ, приблизно 22.5 мМ, приблизно 25 мМ, приблизно 30 мМ, приблизно 35 мМ, приблизно 40 мМ, приблизно 45 мМ, приблизно 50 мМ, приблизно 55 мМ, приблизно 60 мМ, приблизно 65 мМ, приблизно 70 мМ, приблизно 75 мМ, приблизно 80 мМ, приблизно 85 мМ, приблизно 90 мМ, приблизно 95 мМ або приблизно 100 мМ гістидину, ацетату, цитрату або фосфату.

[0022] Композиції можуть бути отримані для будь-якого відомого для антитіл типу введення, які охоплюють, але без обмеження, ін'єкцію у склоподібне тіло та внутрішньовенне введення.

[0023] Створені тут композиції можуть додатково містити прийнятний носій або наповнювач, включаючи будь-який носій або наповнювач, який є фармацевтично прийнятним носієм або наповнювачем та який є прийнятним для введення пацієнту.

[0024] У одному втіленні передбачена тут композиція є ізотонічною. Термін "ізотонічний" означає, що інтересуюча композиція має по суті такий саме осмотичний тиск, як і людська кров. Головним чином ізотонічні композиції мають осмотичний тиск приблизно 250-350 міліосмолей (мОсм). Ізотонічність можна виміряти з застосуванням газопарових або кріоскопічних осмометрів. Наприклад, у іншому втіленні, передбачена там композиція є гіпертонічною. Якщо "ізотонічна" композиція є такою, що має по суті такий саме осмотичний тиск, як і людська кров, то, відповідно, термін "гіпертонічна" застосовують для описання композиції, осмотичний тиск

якого перевищує осмотичний тиск людської крові.

[0025] Передбачена тут композиція може містити поліол з концентрацією, меншою, ніж 1 М. Наприклад, композиція може містити поліол з концентрацією приблизно 50 мМ, приблизно 75 мМ, приблизно 100 мМ, приблизно 150 мМ, приблизно 200 мМ, приблизно 225 мМ, приблизно 240 мМ, приблизно 250 мМ, приблизно 300 мМ, приблизно 350 мМ, приблизно 400 мМ, приблизно 450 мМ, приблизно 500 мМ, приблизно 550 мМ, приблизно 600 мМ, приблизно 650 мМ, приблизно 700 мМ, приблизно 750 мМ, приблизно 800 мМ, приблизно 850 мМ, приблизно 900 мМ, приблизно 950 мМ, приблизно 1 М або яка дорівнює будь-якому цілому числу у цих межах. У одному втіленні ізотонічну композицію отримують з сіллю з концентрацією приблизно 100-175 мМ, наприклад, композицію, яка містить менш, ніж 300 мМ поліолу отримують у ізотонічному стані з сіллю з концентрацією приблизно 130 мМ.

[0026] У одному аспекті, поліол для застосування у передбачених тут композиціях може бути цукром, як-то, наприклад, невідновлювальним цукром. Типові приклади невідновлювальних цукрів охоплюють, але без обмеження, трегалозу та цукрозу. Наприклад, композиція може містити приблизно 200 мМ - 300 мМ трегалози або цукрози. У одному втіленні композиція може містити приблизно 240 мМ трегалози або цукрози.

[0027] Альтернативним чином, цукор може бути сорбітом у кількості (з концентрацією) приблизно 200-300 мМ. У одному втіленні композиція може містити приблизно 240 мМ сорбіту.

[0028] Додатковими необмеженими прикладами передбаченої тут композиції є будь-які з композицій 1-39 у Таблиці 1.

[0029] Передбачена тут композиція може мати рН приблизно 4,0-7,5. У одному втіленні передбачена тут композиція може мати рН приблизно 4,5, приблизно 5,0, приблизно 5,5, приблизно 6,0, приблизно 6,5 або приблизно 7,0.

[0030] У одному втіленні створені тут композиції не містять поверхнево-активну речовину, але вибірково, у деяких випадках, поверхнево-активна речовина може бути включеною до складу композицій. Необмежені приклади поверхнево-активних речовин охоплюють полісорбат 20, полісорбат 80 та Pluronic® F68.

[0031] Також винаходом передбачено попередньо наповнений шприц, прийнятний для внутрішньовенного введення або введення у скловидне тіло, який містить описану тут композицію. Такі попередньо наповнені шприці можуть бути запакованими та обладнаними маркуванням для застосування у лікуванні пов'язаного з ангіогенезом стану, як-то будь-якого з описаних тут станів. Також пакування можуть містити інструкції по зберіганню та застосуванню. Також передбачено пакування, яке містить один або декілька попередньо заповнених шприців, прийнятних для внутрішньовенного введення або до введення у скловидне тіло, що містять композиція за будь-яким з попередніх пунктів.

[0032] Одне втілення цієї заявки передбачає застосування будь-якої з описаних тут композицій для отримання лікарського препарату для лікування описаних тут розладів. Лікарські препарати можуть бути отримані у залежності від фізичних характеристик пацієнта/суб'єкта, який потребує лікування та можуть бути отримані у вигляді однієї або декількох композицій. Лікарські препарати можуть бути запакованими у прийнятне пакування з відповідним маркуванням для розподілу у клініки та лікарні, яке містить вказівки по лікуванню розладу у суб'єкта. Лікарські препарати можуть бути запакованими у вигляді однієї або декількох одиниць. Також пакування може містити інструкції по дозуванню та застосуванню описаних тут композицій.

[0033] Заявленим винаходом передбачено спосіб лікування захворювання, пов'язаного з ангіогенезом у пацієнта (суб'єкта), який потребує такого лікування, який полягає у введенні зазначеному пацієнту описаної тут композиції. Такі композиції можуть бути введені пацієнту або внутрішньовенно або шляхом введення у скловидне тіло.

[0034] Описані тут захворювання, пов'язані з ангіогенезом можуть бути, наприклад, раком або метастазами. У одному втіленні рак є твердою пухлиною. Прийнятні для лікування види раку охоплюють, наприклад, пухлини на основі епітеліальної тканини.

Необмежені прийнятні для лікування приклади захворювань на рак охоплюють, але без обмеження, рак легенів, гінекологічні злоякісні хвороби, меланому, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак яєчника, рак матки, рак товстої кишки, рак передміхурової залози, рак нирок, рак голови, рак підшлункової залози, рак печінки (гепатоцелюлярний рак), рак шиї, рак нирок (нирково-клітинний рак), саркому, мієлому та лімфому. Композиції для лікування раку або метастазів можуть бути введені пацієнту внутрішньовенно.

[0035] Альтернативним чином, описане тут пов'язане з ангіогенезом захворювання може бути, наприклад, офтальмологічним станом. Офтальмологічні стани охоплюють, але без обмеження, вікову макулодистрофію, діабетичну ретинопатію, макулярний набряк та/або

хоріоїдальну неоваскуляризацією Вікова макулодистрофія може сухою та вологою. Композиції для лікування офтальмологічного стану можуть бути введені пацієнту у скловидне тіло.

[0036] З допомогою таких способів композицію можна вводити пацієнтові один або більше разів. Наприклад, композицію можуть вводити раз на день, раз на тиждень, раз на місяць, раз на два місяці, раз на два місяці, раз на три місяці, раз на чотири місяці, через кожні 5 місяців або раз на 6 місяців. Схеми лікування можуть бути збільшені або зменшені в разі необхідності в залежності від реакції пацієнта на лікування.

[0037] У одному аспекті композицію вводять аж до усунення однієї або декількох ознак або симптомів пов'язаного з ангиогенезом захворювання.

[0038] Щодо офтальмологічних станів, то одна або більше ознак або симптомів таких станів може охоплювати, але без обмеження, пов'язане з очної хворобою скорочення кровоносних судин, пригнічення проліферації ендотеліальних клітин, чіткі ознаки або симптоми кровотечі, лікування помутніння зору, забезпечення затримки втрати зору, поліпшення зору, підвищення гостроти зору, зменшення макулярного набряку та/або запобігання витоку кровоносних судин.

[0039] Відносно раку або метастазів слід зазначити, що лікування може привести до покращення стану пацієнта та його результати можна оцінити шляхом визначення появи одного або декількох наступних факторів, як-то зниження клітинної проліферації, зниження кількості клітин, збільшення апоптозу або зниження виживання принаймні частини клітин, уражених клітинним проліферативним розладом.

[0040] Лікування може привести до часткового або до повного усунення пухлин або метастазів та/або до подовження строку життя пацієнта.

[0041] У одному втіленні після введення пацієнту однієї або декількох доз композиції тривалість або суворість однієї або декількох ознак або симптомів скорочується приблизно на 2%, приблизно на 5%, приблизно на 10%, приблизно на 15%, приблизно на 20%, приблизно на 25%, приблизно на 30%, приблизно на 35%, приблизно на 40%, приблизно на 45%, приблизно на 50%, приблизно на 55%, приблизно на 60%, приблизно на 65%, приблизно на 70%, приблизно на 75%, приблизно на 80%, приблизно на 90%, приблизно на 95% або приблизно на 100%.

[0042] У іншому втіленні після введення пацієнту однієї або декількох доз композиції тривалість або суворість однієї або декількох ознак або симптомів скорочується приблизно у 2 рази, приблизно у 5 разів, приблизно у 10 разів, приблизно у 15 разів, приблизно у 20 разів, приблизно у 25 разів, приблизно у 30 разів, приблизно у 35 разів, приблизно у 40 разів, приблизно у 45 разів, приблизно у 50 разів, приблизно у 55 разів, приблизно у 60 разів, приблизно у 65 разів, приблизно у 70 разів, приблизно у 75 разів, приблизно у 80 разів, приблизно у 90 разів, приблизно у 95 разів, приблизно у 100 разів або більше.

[0043] Заявленим винаходом передбачено спосіб лікування офтальмологічного стану у пацієнта, який того потребує, який полягає у введенні зазначеному пацієнту описаної тут композиції, в результаті чого одна або декілька ознак або симптомів зазначеного офтальмологічного стану покращуються шляхом лікування. Введення композиції також може бути здійснено у скловидне тіло.

[0044] Також заявленим винаходом передбачено спосіб запобігання або лікування раку або метастазів у суб'єкта, який цього потребує, який полягає у введенні пацієнту описаної тут композиції, в результаті чого виникає покращення однієї або декількох ознак або симптомів вказаного раку або метастазів. Введення композиції може бути внутрішньовенним.

[0045] У передбачених тут способах призначений для лікування суб'єкт може бути людиною або твариною. Створені тут композиції можуть бути введені один або багато разів залежно від стану здоров'я пацієнта, розвитку захворювання або стану та від ефективності лікування. Відповідні узгодження в ході терапії та лікування можуть бути здійснені впродовж курсу лікування (наприклад, шляхом змінення дозування антитіл у композиції).

[0046] Заявленим винаходом передбачено спосіб моніторингу ефективності одного або кількох з будь-яких передбачених тут способів. Рівні розчинного CD105 корелюють з виживанням пацієнтів, хворих на рак та можуть піддани моніторингу перед та протягом терапії, отже вони можуть бути свідченням того, що терапевтичний режим є ефективним для лікування пацієнта. Процедури, описані тут, можуть включати в себе один або більше додаткових етапів лікування.

Включення шляхом посилання.

[0047] Всі зазначені у цій заявці публікації, патенти та патентні заявки включені сюди у вигляді посилання в такій самій мірі, як якщо б кожна окрема публікація, патент або заявка на патент була б конкретно та індивідуально зазначена включеною шляхом посилання.

Стислий опис фігур.

[0048] Нові ознаки втілень докладно наведені у доданій Формулі Винаходу. Краще розуміння особливостей та переваг цих втілень може бути отримано шляхом посилання на подальший докладний опис, який містить ілюстративні втілення, у яких застосовано принципи втілень та доданими кресленнями, у яких:

[0049] У Фіг. 1A-J наведені зразкові амінокислотні послідовності описаного тут анти-CD105 антитіла (TRC105). У Фіг. 1A наведено послідовність типового змінного легкого (VL) ланцюга анти-CD105 антитіла (SEQ ID №: 1); у Фіг. 1B наведено послідовність типового сталого легкого ланцюга (CL) анти-CD105 антитіла (SEQ ID №: 2); у Фіг. 1C наведено послідовність типового змінного важкого (VH) ланцюга анти-CD105 антитіла (SEQ ID №: 3); та у Фіг. 1D наведено послідовність типового сталого гамма-1 важкого ланцюга анти-CD105 антитіла (SEQ ID №: 4). У Фіг. 1E-G, відповідно, наведені CDR 1, 2 та 3 типового змінного легкого (VL) ланцюга. У Фіг. 1H-J, відповідно, наведені CDR 1, 2 та 3 типового змінного важкого (VH) ланцюга.

[0050] У Фіг. 2 наведено діаграму шляху сигналування TGF- β /ALK5. Шлях TGF- β /ALK5 (A) веде до пригнічення клітинної проліферації. Шлях TGF- β /ALK1 (B) викликає проліферацію ендотеліальних клітин та потребує наявності CD105 (ендогліну) для сигналування ALK1. Пунктирними лініями позначені неактивні або заблоковані шляхи. Напівжирна стрілка вказує на стимулювання шляху сигналування.

[0051] Слід розуміти, що застосована у цьому документі термінологія наведена з метою опису лише певних втілень та не призначена для обмеження. Крім того, слід розуміти, що у практичному втіленні цих винаходів можуть бути застосовані численні способи та матеріали, які є подібними до описаних тут.

[0052] У відповідності з цією заявкою також можуть бути застосовані способи звичайної клітинної біології, молекулярної біології, мікробіології та застосування рекомбінантних ДНК, як повністю описано у цій галузі.

[0053] Як застосовано у цій заявці та у доданій Формулі Винаходу, одиничні значення можуть охоплювати також посилання на множину, якщо тільки у контексті ясно не зазначено іншого. Отже, наприклад, посилання на "спосіб" охоплює один або декілька способів та/або етапів описаного тут типу та/або які стануть очевидними для фахівців в даній галузі після читання цієї заявки.

[0054] Анти-CD105 антитіла можуть бути застосовані для лікування або запобігання різних форм розладів, пов'язаних з ангіогенезом. Тут описані способи лікування різних форм раку, твердих пухлин, метастазів тощо шляхом введення описаних тут композицій.

[0055] Як тут застосовано, термін "антитіло" має відношення до імуноглобуліну (Ig), який є природним або частково або повністю має синтетичне походження. Термін також охоплює будь-який поліпептид або білок, який має зв'язувальний домен, який є антиген-зв'язуючим доменом або є гомологічним цьому домену. Термін також охоплює "антиген-зв'язувальні фрагменти" та інші взаємозамінні терміни для позначення подібних зв'язувальних фрагментів, як-то описані нижче.

[0056] Нативні антитіла та нативні імуноглобуліни звичайно є гетеротетрамерними глікобілками розміром приблизно у 150,000 Да, які складаються з двох ідентичних легких (L) ланцюгів та двох ідентичних важких (H) ланцюгів. Кожен легкий ланцюг звичайно є приєднаним до важкого ланцюга з допомогою одного ковалентного дисульфідного зв'язку, тоді як число дисульфідних зв'язків варіює серед важких ланцюгів різних ізотипів імуноглобуліну. Кожен важкий та легкий ланцюг також має регулярно розташовані всередині дисульфідні містки. Кожен важкий ланцюг має на одному кінці змінний домен ("V_H" або "VH"), за яким знаходиться кілька сталих доменів ("C_H" або "CH"). Кожен легкий ланцюг має на одному кінці змінний домен ("V_L" або "VL") та сталий домен ("C_L" або "CL") на іншому кінці, сталий домен легкого ланцюга є вирівняним з першим сталим доменом важкого ланцюга та змінний домен легкого ланцюга є вирівняним зі змінним доменом важкого ланцюга. Вважається, що окремі амінокислотні залишки утворюють поверхню поділу між легко- та важколанцюговим змінними доменами.

[0057] Як тут застосовано, терміни "синтетичний полінуклеотид," "синтетичний ген" або "синтетичний поліпептид," означають, що відповідна полінуклеотидна послідовність або її частина або амінокислотна послідовність або її частина є отриманою з послідовності, розробленої або синтезованої de novo або зміненою порівняно до еквівалентної послідовності природного походження. Синтетичні полінуклеотиди (антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти) або синтетичні гени можуть бути отримані з допомогою відомих у цій галузі способів, включаючи, але без обмеження, хімічний синтез нуклеїнових кислот або амінокислотних послідовностей. Синтетичні гени звичайно відрізняються від генів природного походження на амінокислотному або на полінуклеотидному рівні (або на обох рівнях) та, як правило,

розташовані у контексті синтетичних послідовностей, контролюючих експресію. У порівнянні з природним геном, полінуклеотидні послідовності синтетичного гена не обов'язково кодують білки з різними амінокислотами. Наприклад, вони можуть також містити синтетичні полінуклеотидні послідовності, які включають різні кодони, але кодують ту ж саме амінокислоту (тобто нуклеотидні змінення, які являють собою "мовчазні" мутації на амінокислотному рівні).

[0058] Щодо антитіл, то термін "змінний домен" має відношення до змінних доменів антитіл, які є залученими у зв'язуванні та мають відношення до специфічності кожного окремого антитіла до свого окремого антигену. Однак, мінливість є нерівномірно розподіленою по довжині змінних доменів антитіл, а скоріше, вона є сконцентрованою у трьох сегментах, які мають назву гіперзмінних ділянок (також відомі як CDR) в обох змінних доменах легкого та важкого ланцюга. Набагато більш консервативні частини змінних доменів отримали назву "каркасних ділянок" або "FR." Кожен зі змінних доменів немодифікованих важкого та легкого ланцюгів містить чотири FR (FR1, FR2, FR3 та FR4), в основному приймаючих бета-листову конфігурацію, яка переважається з трьома CDR, які утворюють петлі, що з'єднують та, у деяких випадках, складають частину бета-листової структури. CDR у кожному ланцюзі утримуються разом в безпосередній близькості від FR та, разом з CDR з іншого ланцюга, сприяють утворенню антиген-зв'язуючої ділянки антитіла (див. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest ("Послідовності білків, цікавих з імунологічної точки зору"), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), pages 647-669).

[0059] Застосовані тут терміни "гіперзмінна ділянка" та "CDR" мають відношення до амінокислотних залишків антитіл, відповідних за зв'язування з антигеном. CDR містять амінокислотні залишки з трьох послідовностей ділянок, які комплементарно зв'язуються з антигеном та відомі під назвами CDR1, CDR2, та CDR3 для кожного з V_H та V_L ланцюгів. Звичайно ділянки CDR у змінному домені легкого ланцюга приблизно відповідають залишкам 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) та 89-97 (CDRL3) та ділянки CDR у змінному домені важкого ланцюга звичайно приблизно відповідають залишкам 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) та 95-102 (CDRH3) (згідно з Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest ("Послідовності білків, цікавих з імунологічної точки зору"), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Зрозуміло, що ділянки CDR різних антитіл можуть містити вставки, отже нумерація амінокислот може відрізнитися. Система нумерації Kabat враховує ці вставки з допомогою схеми нумерації, у якій застосовано букви, прикріплені до певних залишків (наприклад, 27A, 27B, 27C, 27D, 27E, та 27F у CDRL1 легкого ланцюга) для відображення будь-яких вставок у нумераціях між різними антитілами. Альтернативним чином, згідно до системи нумерації від Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987), звичайно ділянки CDR у змінному домені легкого ланцюга приблизно відповідають залишкам 26-32 (CDRL1), 50-52 (CDRL2) та 91-96 (CDRL3) та ділянки CDR у змінному домені важкого ланцюга звичайно приблизно відповідають залишкам 26-32 (CDRH1), 53-55 (CDRH2) та 96-101 (CDRH3).

[0060] Як тут застосовано, "каркасна ділянка" або "FR" має відношення до каркасних амінокислотних залишків, які утворюють частину антиген-зв'язуючої кишені або щілини та амінокислотні залишки у петельній ділянці або можуть або не можуть контактувати з антигеном. Звичайно каркасні ділянки містять ділянки, які розташовані між CDR. У змінному домені легкого ланцюга, FR-ділянки звичайно приблизно відповідають залишкам 0-23 (FRL1), 35-49 (FRL2), 57-88 (FRL3) та 98-109 та у змінному домені важкого ланцюга FR-ділянки звичайно приблизно відповідають залишкам 0-30 (FRH1), 36-49 (FRH2), 66-94 (FRH3) та 103-133 (згідно з Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest ("Послідовності білків, цікавих з імунологічної точки зору"), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Як обговорювалося вище щодо нумерації Kabat для легкого ланцюга, система нумерації Kabat також подібним чином враховує вставки для важкого ланцюга (наприклад, 35A, 35B CDRH1 у важкому ланцюзі). Альтернативним чином, згідно до системи нумерації від Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987), звичайно FR-ділянки у змінному домені легкого ланцюга приблизно відповідають залишкам 0-25 (FRL1), 33-49 (FRL2) 53-90 (FRL3), та 97-109 (FRL4) та звичайно FR-ділянки у змінному домені важкого ланцюга приблизно відповідають залишкам 0-25 (FRH1), 33-52 (FRH2), 56-95 (FRH3), та 102-113 (FRH4).

[0061] Сталі домени (Fc) антитіл безпосередньо не залучені до зв'язування антитіл з антигеном, але вони часто демонструють різні ефекторні функції, як-то участь антитіл у залежній від антитіл клітинній токсичності шляхом взаємодії з, наприклад Fc-рецепторами (FcR). Fc-домени також можуть збільшувати біодоступність антитіл у кровотоці після введення пацієнту. Заміщення мишачого Fc-домену Fc-доменом людини може також зменшити побічні НАМА-реакції.

[0062] У залежності від амінокислотної послідовності сталого домену своїх важких ланцюгів,

імуноглобуліни можуть бути розподілені на різні класи. Існує 5 головних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG, та IgM та деякі з них також додатково можуть бути розділені на підкласи (підтипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, та IgA2. Сталі домени важкого ланцюга (Fc), які відносяться до різних класів імуноглобулінів отримали, відповідно, назви α , δ , ϵ , γ та μ .
 5 Субодиничні структури та тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів є добре відомими.

[0063] Беручи за основу амінокислотні послідовності їх сталих доменів, "легкі ланцюги" антитіл будь-яких видів хребетних тварин можна віднести до одного із двох чітко відокремлених типів, які отримали назву каппа або ("κ") та лямбда або ("λ").

10 [0064] Терміни "антиген-зв'язувальна частка антитіла," "антиген-зв'язуючий фрагмент," "антиген-зв'язуючий домен," "фрагмент антитіла" або "функціональний фрагмент антитіла" тут застосовані взаємозамінно для позначення одного або декількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Необмежені приклади фрагментів антитіла, які охоплюються цими термінами охоплюють, але без обмеження, (i) фрагмент Fab, моновалентний фрагмент, який складається з доменів V_L , V_H , C_L та C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, бівалентний фрагмент, який містить два фрагменти Fab, приєднані через дисульфідний місток до шарнірної ділянки; (iii) фрагмент Fd, який складається з доменів V_H та C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, який містить домени V_L та V_H у складі одного "плеча" антитіла, (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544 546), який містить домен V_H ; та (vi) виділений CDR. Додатково це визначення охоплює "половинні" антитіла, які містять одиничний важкий та одиничний легкий ланцюги та інші форми антитіл з одиничними ланцюгами, як-то діатіла.

15 [0065] Функціональні групи $F(ab')_2$ та "Fab" можуть бути отримані шляхом обробки імуноглобулінів протеазою, як-то пепсином та папаїном та містять фрагменти антитіл, отримані шляхом розщеплення імуноглобуліну поруч з дисульфідними зв'язками, розташованими між шарнірними ділянками у кожному з двох важких ланцюгів. Наприклад, папаїн розщеплює IgG перед дисульфідними зв'язками, розташованими між шарнірними ділянками у кожному з двох важких ланцюгів з отриманням двох гомологічних фрагментів антитіла, у яких легкий ланцюг, що складається з V_L та C_L (легколанцюгова стала ділянка), та фрагмент важкого ланцюга, що складається з V_H та ділянки C_{H1} ($\gamma 1$) у сталій ділянці важкого ланцюга є з'єднаними у C-кінцевих ділянках дисульфідним зв'язком.

20 Кожен з цих двох гомологічних фрагментів антитіла має назву Fab'. Пепсин розщеплює IgG за дисульфідними зв'язками, розташованими між шарнірними ділянками у кожному з двох важких ланцюгів з отриманням фрагменту антитіла, трохи довшого, ніж фрагмент, у якому два зазначених вище фрагмента Fab' є з'єднаними у шарнірній ділянці. Цей фрагмент антитіла отримав назву $F(ab')_2$.

25 [0066] Фрагмент Fab також містить сталий домен легкого ланцюга та перший сталий домен (C_{H1}) важкого ланцюга. Фрагменти Fab' відрізняються від фрагментів Fab додаванням кількох залишків на C-кінці домену C_{H1} важкого ланцюга, включаючи один або декілька цистеїнів з шарнірної ділянки антитіла. Фрагмент Fab', у якому цистеїновий залишок(залишки) сталих доменів несуть вільну тіолову групу має у цьому документі назву Fab'-SH.

30 [0067] Фрагменти антитіл $F(ab')_2$ спочатку були отримані у вигляді пар фрагментів Fab', які мають між ними шарнірні цистеїни. Також відомі інші хімічні поєднання фрагментів антитіл.

35 "Fv" є фрагментом антитіла, який містить повний сайт впізнавання антигену та антиген-зв'язуючий сайт. Ця ділянка складається з димеру одного важкого ланцюга та одного змінного домену легкого ланцюга, щільно поєднаних нековалентним або ковалентним шляхом (дисульфідно зв'язаний Fvs було описано у науковій літературі, див. Reiter et al. (1996) Nature Biotechnology 14:1239-1245). Він знаходиться у такій конфігурації, що три CDR кожного змінного домену взаємодіють для визначення антиген-зв'язуючого сайту на поверхні димеру V_H - V_L . Сукупним чином, комбінація одного або декількох CDR з кожного V_H та V_L ланцюга наділяє антитіло антиген-зв'язуючою специфічністю. Наприклад, має бути зрозуміло, що у разі перенесення ланцюгів V_H та V_L реципієнта або їх антиген-зв'язуючих фрагментів однієї наявності CDRH3 та CDRL3 може бути достатньо для надання антитілу антиген-зв'язуючої специфічності та ці комбінації CDR можуть бути перевірені на зв'язування, спорідненість тощо з застосуванням будь-якого з описаних тут способів. Навіть одиничний змінний домен (або половина фрагменту Fv, яка містить тільки три специфічні для антигену CDR-ділянки) має здатність до впізнавання та зв'язування антигену, хоча скоріше він має нижчу спорідненість, ніж при поєднанні з другим змінним доменом. Крім того, хоча два домени фрагменту Fv (V_L та V_H) кодуються окремими генами, вони можуть бути з'єднані з застосуванням рекомбінантних технологій через синтетичний лінкер, що дозволяє тримати їх у вигляді єдиного білкового ланцюга, у якому ділянки V_L та V_H спаровуються з утворенням моновалентних молекул

(відомих, як одиничний ланцюг Fv (scFv); Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; та Osbourn et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16:778). Такі молекули scFv також охоплюються терміном "антиген-зв'язуюча частина" антитіл. Для отримання векторів експресії, що кодують повні молекули Ig (наприклад, IgG) або інших ізотипів, до Fc-ділянки кДНК або геномних послідовностей можуть бути приєднані будь-які послідовності V_H- та V_L-специфічних scFv. Послідовності V_H та V_L також можуть бути застосовані для отримання Fab, Fv або інших фрагментів Igs з допомогою або хімії білків або способів рекомбінантної ДНК.

[0068] "Одноланцюгові Fv" або "sFv" фрагменти антитіл містять домени V_H та V_L антитіл, які знаходяться у одиничному поліпептидному ланцюзі. У деяких втіленнях поліпептид Fv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами V_H та V_L, який дозволяє sFv утворювати бажану структуру для зв'язування антигену. Огляд різних sFv, див., наприклад, у книзі Pluckthun A. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies ("Фармакологія моноклональних антитіл"), Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0069] Термін "AVIMER™" має відношення до класу терапевтичних білків людського походження, які не мають відношення до антитіл та фрагментів антитіл та складаються з декількох модулярних та багаторазових зв'язуючих доменів, позначених як А-домени (також позначених, як модуль класу А, повтор комплементарного типу або LDL-рецепторний домен класу А). Також їх можна отримати з зовнішньоклітинних рецепторних доменів людини з допомогою фаг-дисплею або перемішування екзонів in vitro (Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-1494; Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24:220). Отримані білки можуть містити багато незалежних зв'язуючих доменів, які можуть демонструвати спорідненість (у деяких випадках, субнаномольну) та специфічність, яка є підвищеною у порівнянні з білками, що зв'язують одиничний епітоп. Див., наприклад, патентні заявки США U.S. Patent Application Publ. №№. 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0053973 та 2005/0089932, 2005/0048512, та 2004/0175756, кожен з яких повністю включено сюди шляхом посилання.

[0070] Кожен з відомих 217 А-доменів людини містить ~35 амінокислот (~4 кДа); та ці домени відокремлені лінкерами, які в середньому займають 5 амінокислот у довжину. Нативні А-домени швидко та ефективно згортаються у однорідну та стійку структуру, яка насамперед є опосередкованою через зв'язування кальцію та утворення дисульфідних зв'язків. Ця загальна структура вимагає наявності консервативної скелетної характерної послідовності довжиною лише у 12 амінокислот. Кінцевим результатом є одиничний білковий ланцюг, який містить багато доменів, кожен з яких демонструє окрему функцію. Кожен домен білків незалежно зв'язується та енергетичні внески кожного домену є адитивними. Ці білки отримали назву авимерів ("AVIMER™") через авидність мультимерів.

[0071] Термін "діатіла" має відношення до маленьких фрагментів антитіл з двома антиген-зв'язуючими сайтами, які містять важколанцюговий змінний домен (V_H), приєднаний до змінного домену легкого ланцюга (V_L) у складі того ж саме поліпептидного ланцюга (V_H-V_L). з допомогою лінкера, який є занадто коротким, щоб дозволити спарювання двох доменів на одному ланцюзі, внаслідок чого домени змушені спаровуватися з комплементарними доменами іншого ланцюга та створювати два антиген-зв'язуючих сайти. Діатіла більш докладно описані у, наприклад, EP 404,097; WO 93/11161; та Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444 6448 (1993).

[0072] Антиген-зв'язуючі поліпептиди також містять важколанцюгові димери, як-то, наприклад, антитіла верблюдових та акул. Антитіла верблюдових та акул містять гомодимерну пару двох ланцюгів V-подібних та C-подібних доменів (та ніколи не мають легких ланцюгів). Ділянка V_H важколанцюгового димеру IgG верблюдових не може утворювати гідрофобні взаємодії з легким ланцюгом, оскільки ділянка важкого ланцюга, яка звичайно контактує з легким ланцюгом у них замінена гідрофільними амінокислотними залишками. Домени V_H важколанцюгового димеру IgG отримали назву доменів V_{HH}. Ig-NAR акул містить гомодимер одного змінного домену (який отримав назву "домен V-NAR") та п'ять C-подібних сталих доменів (домени C-NAR). Різноманітність набору антитіл у верблюдових обумовлена наявністю CDR 1, 2 та 3 у ділянках V_H або V_{HH}. CDR3 у ділянці V_{HH} верблюдових відрізняється відносно великою довжиною, яка сягає у середньому 16 амінокислот (Muylldermans et al., 1994, Protein Engineering 7(9): 1129) на відміну від ділянок CDR3 антитіл багатьох інших видів, наприклад, CDR3 мишачого домену V_H (довжиною у 9 амінокислот). Бібліотеки змінних ділянок антитіл тварин родини верблюдових, які зберігають свою різноманітність in vivo можуть бути отримані, наприклад, з допомогою способів, наведених у патентній заявці США U.S. Patent Application Ser. No. 20050037421.

[0073] "Химерні" форми антитіл іншого, окрім людини походження (наприклад, мишачих) охоплюють химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, отриману з Ig-імуноглобулінів

тваринного походження. Здебільшого химерні антитіла є мишачими антитілами, у яких принаймні частка сталої ділянки імуноглобуліну (Fc), звичайно людського імуноглобуліну є вставленою замість мишачої Fc-ділянки. Більш детально див. Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

[0074] Як тут застосовано, термін “моноклональне антитіло” має відношення до антитіл, отриманих з популяції суттєво гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла у складі популяції є ідентичними, виключаючи можливі мутації, які трапляються в природі, що можуть бути присутніми у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, оскільки вони спрямовані до одиничного антигенного сайту. Крім того, на відміну до композицій традиційних (поліклональних) антитіл, які можуть містити різні антитіла безпосередньо до різних сайтів зв'язування (епітопів), кожне моноклональне антитіло є спрямованим лише до одиничного сайту зв'язування антигена. Визначення “моноклональне” вказує на характер антитіла, отриманого з практично гомогенної популяції антитіл та не повинно бути тлумачено так, як вимагає отримання антитіла будь-яким певним способом. Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути отримані з допомогою гібридомного способу, який першим описали Kohler et al., Nature 256:495 (1975) або можуть бути отримані шляхом застосування технологій рекомбінантних ДНК (див., наприклад, Патент США U.S. Pat. No. 4,816,567). У деяких втіленнях моноклональні антитіла можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл з допомогою способів, описаних, наприклад, у Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) та Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

[0075] Антитіла можуть бути виділені та очищені з культурального супернатанту або згаданого вище асцити шляхом осадження насиченим сульфатом амонію, шляхом еуглобулінового висолювання, з допомогою способу з застосуванням капроевої кислоти, каприлової кислоти, іонообмінної хроматографії (DEAE або DE52) або афінної хроматографії з застосуванням анти-Ig колонки або колонки з білком A, G або L, як більш детально описано нижче.

[0076] При конструюванні імуноглобулінової молекули, її змінні ділянки або частини можуть бути злиті, зв'язані або іншим чином приєднані до однієї або до декількох її сталих ділянок або частин для отримання будь-якого з описаних тут антитіл. Це може бути досягнуто з допомогою різних відомих у цій галузі способів, в тому числі, але без обмеження, способів молекулярного клонування або прямого синтезу нуклеїнових кислот, які кодують молекули.

[0077] Як тут застосовано, термін “імунореактивний” має відношення до зв'язуючих агентів, антитіл або їх фрагментів, які є специфічними до послідовності амінокислотних залишків (“сайт зв'язування” або “епітоп”), навіть якщо вони є перехресно-реактивними до інших пептидів/білків та які є нетоксичними у кількостях, у яких їх отримують для введення людині. Термін “зв'язування” має відношення до безпосереднього з'єднання двох молекул з допомогою, наприклад, взаємодій, опосередкованих ковалентним, електростатичним, гідрофобним, іонним та/або водневим зв'язком у фізіологічних умовах та включаючи такі взаємодії, як сольові та водні містки та будь-які інші звичайні засоби зв'язування. Термін “переважно зв'язує” означає, що зв'язуючий агент зв'язується з сайтом зв'язування з більшою спорідненістю, ніж він зв'язується зі сторонніми амінокислотними послідовностями. Спорідненість може бути принаймні у 1 рази більшою, принаймні у 2 рази більшою, принаймні у 3 рази більшою, принаймні у 4 рази більшою, принаймні у 5 разів більшою, принаймні у 6 разів більшою, принаймні у 7 разів більшою, принаймні у 8 разів більшою, принаймні у 9 разів більшою, у 10 разів більшою, принаймні у 20 разів більшою, принаймні у 30 разів більшою, принаймні у 40 разів більшою, принаймні у 50 разів більшою, принаймні у 60 разів більшою, принаймні у 70 разів більшою, принаймні у 80 разів більшою, принаймні у 90 разів більшою, принаймні у 100 разів більшою або принаймні у 1000 разів більшою, ніж спорідненість зв'язуючого агента до сторонніх амінокислотних послідовностей. Терміни “імунореактивний” та “переважно зв'язує” тут застосовано взаємозамінно.

[0078] Як тут застосовано, термін “спорідненість” має відношення до константи рівноваги для оборотного зв'язування двох агентів та є вираженою у вигляді K_d . Спорідненість зв'язувального білка до ліганда, як-то спорідненість антитіла для епітопу може дорівнювати, приблизно 100-0.1 наномоль (нМ), приблизно 100 нМ - 1 пікомоль (пМ) або приблизно 100 пМ - 1 фемтомоль (фМ). Як тут застосовано, термін “авидність” має відношення до стійкості комплексу двох або більше агентів до дисоціації після розведення. Виявлені спорідненості можуть бути визначені з допомогою імуоферментного аналізу (ІФА) або будь-якого іншого способу, відомого будь-якому фахівцю у цій галузі. Значення авидностей можуть бути визначені з допомогою, наприклад, аналізу Скетчарда або будь-якого іншого способу, відомого

будь-якому фахівцю у цей галузі.

[0079] "Епітоп" має відношення до частини антигену або іншої макромолекули, здатної утворювати зв'язувальну взаємодію зі змінною ділянкою зв'язувальної кишені антитіла. Такі зв'язувальні взаємодії можуть проявлятися у вигляді міжмолекулярного контакту з одним або декількома амінокислотними залишками однієї або декількох CDR-ділянок. Зв'язування антигену може охоплювати, наприклад, CDR3 або пару CDR3 або, у деяких випадках може охоплювати взаємодії, до яких залучено до шести CDR-ділянок ланцюгів V_H та V_L. Епітоп може бути лінійною пептидною послідовністю (тобто бути "безперервним") або може складатися з несуміжних амінокислотних послідовностей (тобто бути "конформаційним" або "переривчастим"). Антитіло може впізнавати одну або декілька амінокислотних послідовностей; отже епітоп можна визначити у вигляді більш, ніж однієї окремої амінокислотної послідовності. Епітопи, які впізнають антитіла можуть бути визначені з допомогою відомих фахівцям у цей галузі способів пептидного картування та аналізу послідовності. Зв'язувальні взаємодії проявляються у вигляді міжмолекулярних контактів з одним або декількома амінокислотними залишками CDR. TRC105 є мишачим антитілом, яке має таку ж саме амінокислотну послідовність, як і мишаче антитіло, описане, як Y4-2F1 або SN6j у патентах США (US patent №№ 5,928,641; 6,200,566; 6,190,660; та 7,097,836). Попередньо були визначені епітопи, яких впізнають антитіла Y4-2F1 та SN6j, отже й антитіло TRC105..

[0080] Термін "специфічно" має відношення до ситуації, в якій антитіло не демонструє будь-якого значного зв'язування з іншими молекулами, крім антигену, що містить епітоп якого впізнає антитіло. Термін також застосовують, наприклад, тоді, коли антиген - зв'язуючий домен є специфічним для окремого епітопу, який є у складі кількох антигенів та у такому разі антитіло буде здатним зв'язуватися з різними антигенами, що несуть цей епітоп. Терміни "переважно зв'язується" або "специфічно зв'язується" означає, що антитіло зв'язується з епітопом зі збільшеною спорідненістю, ніж воно зв'язується зі сторонніми амінокислотними послідовностями та, за умови перехресної реактивності до інших поліпептидів, які містять цей епітоп, воно є нетоксичним у кількостях, у яких ці антитіла отримують для введення людині. У одному аспекті, така спорідненість є принаймні у 1 раз більшою, принаймні у 2 рази більшою, принаймні у 3 рази більшою, принаймні у 4 рази більшою, принаймні у 5 разів більшою, принаймні у 6 разів більшою, принаймні у 7 разів більшою, принаймні у 8 разів більшою, принаймні у 9 разів більшою, у 10 разів більшою, принаймні у 20 разів більшою, принаймні у 30 разів більшою, принаймні у 40 разів більшою, принаймні у 50 разів більшою, принаймні у 60 разів більшою, принаймні у 70 разів більшою, принаймні у 80 разів більшою, принаймні у 90 разів більшою, принаймні у 100 разів більшою або принаймні у 1000 разів більшою, ніж спорідненість антитіл до сторонніх амінокислотних послідовностей. Терміни "імунореактивний" "зв'язується," "переважно зв'язується" та "специфічно зв'язується" тут застосовано взаємозамінне. Термін "зв'язування" має відношення до безпосереднього з'єднання двох молекул з допомогою, наприклад, взаємодій, опосередкованих ковалентним, електростатичним, гідрофобним, іонним та/або водневим зв'язком у фізіологічних умовах та включаючи такі взаємодії, як-то сольові та водні містки та будь-які інші звичайні засоби зв'язування.

[0081] "Виділений" (застосовано взаємозамінне з "суттєво чистим") при застосуванні до поліпептидів означає поліпептид або його частину, який в силу свого походження або в результаті маніпуляції: (i) існує у клітині-хазяїні у вигляді продукту експресії частини вектора експресії або (ii) є приєднаним до білка або до іншої хімічної функціональної групи, іншої, ніж та, до якої він є приєднаним у природі; або (iii) не зустрічається у природі, як-то, наприклад, білок, який було отримано шляхом хімічних маніпуляцій, як-то шляхом прикріплення або додавання до білка принаймні однієї гідрофобної функціональної групи таким чином, що отриманий білок знаходиться у формі, яка не існує у природі. Під "виділеним" також маєтись на увазі білок, який є: (i) хімічно синтезованим; або (ii) є продуктом експресії у клітині-хазяїні та є очищеним від асоційованих з ним та забруднюючих білків. Звичайно цей термін має відношення до поліпептиду, відокремленому від з інших білків та нуклеїнових кислот, з якими він зустрічається в природі. Звичайно поліпептид є також відокремленим від інших речовин, як-то антитіл або для його очищення застосовують гелеві матриці (поліакриламідний гель).

[0082] Як тут застосовано, терміни "пригнічуючий ангіогенез," "пригнічення ангіогенезу" або "анти-ангіогенетичний" стосуються пригнічення розвитку судин та призначені означати такі, що впливають на зменшення ступеня, кількості або швидкості неоваскуляризації. Зменшення ступеня, кількості або швидкості проліферації ендотеліальних клітин або їх міграції у тканині є специфічним прикладом пригнічення ангіогенезу.

[0083] Термін "композиція, яка пригнічує ангіогенез" має відношення до композиції, яка пригнічує опосередковані ангіогенезом процеси, як-то міграцію, проліферацію ендотеліальних

клітин, утворення судинної трубки та згодом веде до пригнічення утворення нових кровоносних судин з вже існуючих, отже впливає на ангиогенез-залежні стани.

[0084] Як тут застосовано, термін “ангиогенез-залежний стан” означає стан, при якому процес ангиогенезу або васкулогенезу підтримує або посилює патологічний стан або корисно впливає на нормальні фізіологічні процеси. Таким чином, лікування ангиогенез-залежного стану, при якому ангиогенез сприяє патологічному стану може призвести до послаблення захворювання, тоді як лікування ангиогенез-залежного стану, при якому ангиогенез корисно впливає на нормальні фізіологічні процеси може призвести, наприклад, до покращення нормального процесу.

[0085] Ангиогенез є утворенням нових кровоносних судин з попередньо існуючих капілярів або з пост-капілярних венул. Васкулогенез є утворенням нових кровоносних судин, які виникають з ангиобластів, які є попередниками ендотеліальних клітин. Обидва процеси призводять до утворення нових кровоносних судин та охоплюються значенням терміну ангиогенез-залежних станів. Як тут застосовано, термін “ангиогенез” стосується утворення судин де novo, як-то судин, що виникають в результаті васкулогенезу, а також судин, що виникають шляхом розгалуження та проростання існуючих судин, капілярів та венул. Також до ангиогенезу може бути залучено ALK1 сигналування та пов'язане з ним фосфорилування та/або сигналування Smad 1/5/8. Також відомо про залучення CD105 до шляху сигналування ALK1 та таким чином це також включено до значення ангиогенезу.

[0086] Клітинні популяції CD105⁺, які викликають пухлини були знайдені у ниркових карциномах людини. Клітини CD105⁺ містять характерні стовбурові пухлинні клітини, які раніше були описані, як ракові стовбурові клітини, наявні у інших видів пухлин.

Спостережені клітини CD105⁺, які були клоногенними, здатними до експресії стовбурових клітинних маркерів та позбавленими диференціативних маркерів, були здатними перетворюватися *in vitro* у епітеліальні та ендотеліальні типи клітин та утворювати *in vivo* здатні до серійного перевивання пухлини. Незважаючи на те, що ці пухлини були отримані з клонів, які мають експресію мезенхимальних маркерів, вони, як і початкові пухлини, були епітеліальними карциномами та відрізнялися підтриманням пухлиногенної популяції клітин CD105⁺ та наявністю непухлиногенної диференційованої популяції клітин CD105⁻.

[0087] “Викликання імунної відповіді хазяїна” означає, що пацієнт відчуває полегшення або зменшення ознак або симптомів хвороби та, зокрема, охоплює, без обмеження, збільшення строку виживання.

[0088] Як тут застосовано, терміни “проліферативний розлад” та “проліферативний стан” означають будь-який патологічний або непатологічний фізіологічний стан, який відрізняється аномальною або небажаною проліферацією. Терміни “клітинний проліферативний розлад” та “клітинний проліферативний стан” означають будь-який патологічний або непатологічний фізіологічний стан, який відрізняється аномальною або небажаною клітинною проліферацією, а також охоплюють стани, які відрізняються аномальною або небажаною клітинною проліферацією або клітинним виживанням (наприклад, завдяки дефектному апоптозу), стани, які відрізняються дефектним або аномальним або недостатнім апоптозом, а також стани, які відрізняються аномальним або небажаним або непотрібним клітинним виживанням. Термін “розлад диференціації” означає будь-який патологічний або непатологічний фізіологічний стан, який відрізняється аномальною або недостатньою диференціацією.

[0089] Проліферативні розлади або розлади диференціації, які піддаються лікуванню включають захворювання, доброякісні та неопластичні стани, які відрізняються аномальними або небажаними кількостями клітин, ростом клітин або виживанням клітин. Отже, такі розлади або стани можуть являти собою хворобливий стан та охоплюють всі типи ракових пухлин або онкогенних процесів, метастатичних тканин або злоякісно трансформованих клітин, тканин або органів.

[0090] Клітини, які мають проліферативний розлад або розлад диференціації можуть бути скупчені у клітинну масу або бути розсіяними. “Нетверда пухлина” має відношення до новоутворень кровотворної системи, як-то лімфоми, мієломи та лейкози або неоплазії, яких не помітно неозброєним оком в природі, оскільки вони зазвичай не утворюють твердої маси. Окремі приклади лейкемій охоплюють, наприклад, гостру та хронічну лімфобластну, мієлобластну та множинну мієлому.

[0091] Термін “тверда пухлина” має відношення до новоутворень або метастазів, які звичайно скупчуються разом з утворенням маси. Такі розлади охоплюють новоутворення або онкологічні захворювання, як-то рак, саркому, меланому, метастатичні розлади або гемопоетичні пухлинні розлади, які можуть вплинути на практично будь-яку клітину або тип тканини. Метастатична пухлина може виникнути з безлічі типів первинних пухлин, у тому числі,

але без обмеження, лімфоїдних пухлин, пухлин молочної залози, легень, щитовидної залози, голови та шиї, головного мозку, шлунково-кишкового тракту (рота, стравоходу, шлунка, тонкої кишки, товстої кишки, прямої кишки), сечостатевого тракту (матки, яєчників, шийки матки, сечового міхура, яєчок, статевого члена, передміхурової залози), нирок, підшлункової залози, печінки, кісток, м'язів, шкіри тощо.

[0092] Карциноми є злоякісними новоутвореннями епітеліальних або ендокринних тканин та охоплюють карциноми дихальної системи, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої системи, яєчок, молочної залози, передміхурової залози, ендокринної системи та меланоми. Тирові карциноми охоплюють карциноми, які виникають у шийці матки, легенях, передміхуровій залозі, молочній залозі, ділянках голови та шиї, товстому кишечнику, печінці та яєчниках. Цей термін також охоплює, наприклад, карциносаркоми, як-то новоутворення, які містять злоякісні пухлини, що складаються з карциноматозних та саркоматозних тканин. Аденокарцинома охоплює карциному залозистої тканини або карциному, в якій пухлина утворює залозоподібну структуру.

[0093] Злоякісними тканинами, які підлягають лікуванню є, наприклад, ендотеліальні тканини або трансформовані клітини, в яких відбувається експресія аномального рівня CD105. Як тут застосовано, термін "трансформовані клітини" відноситься до клітин, які спонтанно переходять до стану необмеженого зростання, тобто вони набувають здатність до росту через необмежену кількість поділів у культурі. Трансформовані клітини можуть бути охарактеризовані, як неопластичні, анапластичні та/або гіперпластичні, а також по відношенню до їх втрати контролю над ростом. Для цілей заявленого винаходу терміни "трансформований фенотип злоякісних клітин ссавців" та "трансформований фенотип" призначені для охоплення, але без обмеження, будь-яких з наступних фенотипічних ознак, пов'язаних з клітинною трансформацією клітин ссавців: іморталізацію, морфологічну або ростову трансформацію та здатність викликати пухлини, як виявлено шляхом подовженого росту у клітинній культурі, росту у напівтвердому середовищі або онкогенного росту у імунно-некомпетентних або сингенних тваринах.

[0094] Термін "антиген пухлинної клітини" визначено тут, як антиген, який є присутнім у пухлинній клітині або у рідинах організму у підвищених, порівняно до неспоріднених пухлинних клітин, нормальних клітин або рідин здорового організму кількостях. Присутність антигену може бути перевірена з допомогою будь-якого з численних аналізів, відомих фахівцям у цій галузі, які охоплюють, без обмеження, негативний та/або позитивний відбір з антитілами, як-то ІФА-аналіз, Вестерн-блот аналіз або радіоімунний аналіз.

[0095] Терміни "апоптоз" або "запрограмована загибель клітин" має відношення до фізіологічного процесу, з допомогою якого здійснюється усунення небажаних або неприйнятних клітин під час розвитку та інших нормальних біологічних процесів. Апоптоз є режимом загибелі клітин, що відбувається у нормальних фізіологічних умовах та клітина є активним учасником своєї власної загибелі ("клітинне самогубство"). Це найбільш часто зустрічається в ході нормального обігу клітин та тканинного гомеостазу, ембріогенезу, індукції та підтримання імунної толерантності, розвитку нервової системи та залежної від ендокринної системи атрофії тканин. Клітини на стадії апоптозу демонструють характерні морфологічні та біохімічні особливості, які охоплюють агрегацію хроматину, нуклеарне та цитоплазматичне ущільнення, розділення цитоплазми та ядра на мембранозв'язані везикули (апоптичні тільця), які містять рибосоми, морфологічно інтактні мітохондрії та ядерний матеріал. In vivo ці апоптичні тільця швидко впізнають та піддають фагоцитозу макрофаги, дендритні клітини або прилеглі епітеліальні клітини. Завдяки цьому ефективному механізму усунення апоптотичних клітин в природних умовах не виникає жодної запальної реакції. В умовах in vitro апоптотичні органи, а також позосталі клітинні фрагменти зрештою набухають та потім розчиняються. Цей кінцевий етап загибелі клітин in vitro отримав назву "вторинного некрозу." Апоптоз може бути виміряно з допомогою способів, відомих фахівцям у цій галузі, як-то шляхом фрагментації ДНК, дії анексину V, шляхом активації каспаз, вивільнення цитохрому c тощо. Клітини, які були індуковані для загибелі тут мають назву "апоптичних клітин."

[0096] "Агент, який викликає апоптоз", як тут визначено, спричинює апоптоз/програмовану загибель клітин та охоплює, наприклад, анти-CD105 антитіла, анти-VEGF антитіла, випромінювання, хіміотерапевтичні агенти або рецепторні лігуючі агенти, з допомогою яких клітини, наприклад, пухлинні або ендотеліальні клітини зазнають запрограмованої загибелі. Типові агенти, які викликають апоптоз більш детально описані нижче.

[0097] Апоптоз можна перевірити з застосуванням стандартного аналізу апоптозу з композиціям анексин V. У цьому аналізі клітини NIH:OVCAR-3 підрощують у 6-луночних планшетах (NUNC) та піддають дії випромінювання або обробляють антагоністом (або у поєднанні з іншими протипухлинними ліками) протягом 4-48 год., після чого промивають та фарбують реактивом анексин V-FITC (BD-Pharmingen) протягом години. Потім клітини

досліджують шляхом проточної цитометрії (проточний цитометр Becton-Dickinson, програмне забезпечення CellQuest), дофарбовують йодистим пропідієм та знову досліджують у проточному цитометрі.

Способи виготовлення та експресії антитіл

5 [0098] Химерні імуноглобуліни конструюють шляхом генної інженерії. Більшість попередньо описаних химерних імуноглобулінів містить VH- та VL- ділянки мишачих моноклональних антитіл та CL- та Fc-ділянки антитіл людини. Fc-ділянки можуть бути застосовані з будь-яким з описаних тут ізотипів. Як тут описано, химери також можуть задовольняти критеріям, з допомогою яких з метою підвищення спорідненості антитіл змінюють обмежену кількість

10 амінокислот каркасної ділянки змінної ділянки легкого ланцюга та/або змінної ділянки важкого ланцюга.

[0099] Химерні антитіла звичайно мають деякі потенційні переваги над мишачими антитілами стосовно застосування у терапії людини. Через те, що ефекторна частина таких антитіл є людською, вважається, що вона краще взаємодіє з іншими частинами імунної системи

15 людини (наприклад, більш ефективно руйнує клітини-мішені шляхом комплемент-залежної цитотоксичності (CDC) або залежної від антитіл клітинної цитотоксичності (ADCC)). Крім того, імунна система людини не повинна впізнавати сталу ділянку химерного антитіла, як чужорідну, отже відповідь організму проти таких введених шляхом ін'єкції антитіл повинна бути в загальному випадку меншою, ніж проти повністю чужорідних мишачих антитіл. Нарешті, відомо,

20 що мишачі антитіла у порівнянні з людськими мають більш короткий період напівжиття у кровотоці людини, отже можливо, що химерні антитіла можуть мати період напівжиття, який буде більш подібний до періоду напівжиття людських антитіл природного походження, що дозволить застосовувати менші дози та менш часто їх вводити.

[00100] Якщо бажаною є підвищена спорідненість антитіл, то залишки всередині їх CDR-ділянок можуть бути додатково заміщені іншими амінокислотами зі звичайним заміщенням не

25 більш, ніж чотирьох амінокислотних залишків у складі CDR та ще більш звичайним заміщенням не більш, ніж двох залишків у складі CDR за виключенням важколанцюгових CDR2, у яких може бути заміщено до 10 залишків. Змінення спорідненості можуть виміряні шляхом загальноприйнятих способів, як-то описаних тут (наприклад, Biacore).

30 [00101] Антитіла можуть бути побудовані та отримані з застосуванням відомих у цій галузі загальноприйнятих способів. Крім того, антитіла рекомбінантного походження можна часто отримувати у великих кількостях, особливо у разі застосування векторів з високим рівнем експресії.

[00102] Антитіла для ветеринарних цілей можуть бути синтезовані для внутрішньовенного

35 введення тварині (як-то примат, корова, кінь, свиня тощо) з застосуванням Fc-ділянок тваринного походження.

[00103] Для змінення нуклеотидів, що кодує амінокислотні послідовності з застосуванням рекомбінантних способів у сайтах рестрикції ендонуклеаз з застосуванням рекомбінантних способів може бути застосовані створені та включені у цю заявку добре відомі у цій галузі

40 способи.

[00104] Для експресії передбачено відповідну систему експресії, як-то GS-систему (Lonza) з застосуванням гена глютамін-синтази у якості селективного маркера. Стисло кажучи, трансфекцію здійснюють у клітинах CHO шляхом електропорації (250 В) з застосуванням GS-системи (Lonza) та гена глютамін-синтази у якості селективного маркера. Клітини CHO дикого

45 типу підрощують у середовищі DMEM (Sigma), яке містить 10% діалізовану телячу ембріональну сироватку (FCS) з 2 мМ глютаміном. Потім клітини CHO (6×10^7 клітин) трансфікують 300 мкг лінеаризованої ДНК шляхом електропорації. Після електропорації клітини ресуспендують у середовищі DMEM з глютаміном, наносять у 36 x 96-луночних планшетів (50 мкл/лунку) та інкубують їх при 37°C. у 5% CO₂. Наступного дня до лунок додають селективне середовище DMEM без глютаміну (150 мкл/лунку). Через приблизно три тижні колонії

50 досліджують шляхом ІФА-аналізу (див. нижче) з застосуванням нерелевантних антитіл в якості негативного контролю. Всі колонії, які продукують >20 мкг/мл переносять у 24-луночні планшети та потім у двох копіях у флакони T25.

[00105] Для отримання високих рівнів продукту широко застосовують систему експресії у ссавцях, в якій застосовано процедуру ампліфікації гена, передбачену у клітинах яєчників китайського хом'яка, дефектних по дигідрофолатредуктазі ("dhfr-"). Ця система побудована на основі гена дигідрофолатредуктази "dhfr", який кодує фермент ДГФР, що каталізує

55 перетворення дигідрофолату на тетрагідрофолат. Для досягнення високої продуктивності dhfr-клітини CHO трансфікують з вектором експресії, який містить функціональний ген ДГФР разом з геном, який кодує бажаний білок. У цьому разі бажаний білок є важким та/або легким ланцюгом

60

рекомбінантного антитіла.

[00106] Шляхом підвищення кількості конкурентного пригнічувача ДГФР метотрексату (MTX), у рекомбінантних клітинах розвивається стійкість за рахунок ампліфікації гена *dhfr*. У стандартних випадках застосована одиниця ампліфікації є набагато довшою, ніж розмір гена *dhfr* та в результаті відбувається спільна ампліфікація важкого ланцюга антитіла.

[00107] Коли бажано отримати великомасштабне виробництво білка, як-то ланцюга антитіла, то приймаються до уваги як рівень експресії, так і стійкість застосованих клітин. У культурі з тривалим строком життя популяції рекомбінантних клітин CHO втрачають гомогенність з точки зору їх специфічної продуктивності антитіл протягом ампліфікації, навіть якщо вони походять з одного батьківського клону.

[00108] У цій заявці передбачено виділений полінуклеотид (нуклеїнову кислоту), який кодує антитіло або її частину, як описано тут, вектори, які містять такі полінуклеотиди та клітини-хазяї та системи експресії для транскрипції та трансляції таких полінуклеотидів у поліпептиди.

[00109] У цій заявці також передбачено конструкції у вигляді плазмід, векторів, касет для транскрипції або експресії, які містять принаймні один полінуклеотид, як зазначено вище.

[00110] У цій заявці також передбачено рекомбінантну клітину-хазяїна, яка містить одну або декілька конструкцій, як зазначено вище. Нуклеїнова кислота, яка кодує будь-яке описане тут антитіло утворює аспект цієї заявки, як і спосіб отримання антитіл, який полягає у досягненні експресії білка, закодованого у зазначеній нуклеїновій кислоті. Ця експресія може бути зручно досягнута шляхом культивування у відповідних умовах рекомбінантних клітин-хазяїв, які містять нуклеїнову кислоту. Після отримання шляхом експресії, антитіла або їх частини можуть бути виділені та/або очищені з застосуванням будь-якого прийнятного способу та потім застосовані у разі необхідності.

[00111] Специфічні антитіла (або їх частини), які кодуються молекулами нуклеїнової кислоти та вектори з зазначеним тут вмістом можуть бути надані виділеними та/або очищеними, наприклад, з їх природного оточення у суттєво чистій або гомогенній формі. У випадку нуклеїнових кислот, вони є вільними або суттєво вільними від нуклеїнових кислот або генів, які мають інше походження, ніж послідовність, яка кодує поліпептид з потрібною функцією. Послідовності нуклеїнових кислот можуть містити ДНК або РНК та можуть бути повністю або частково синтетичними. Способи очищення є добре відомими у цій галузі.

[00112] Системи для клонування та експресії поліпептиду у багатьох різних клітинах-хазяях є добре відомими. Прийнятні клітини-хазяї охоплюють клітини бактерій, ссавців, дріжджів та бакуловірусні системи. Відомі у цій галузі прийнятні для експресії гетерологічного поліпептиду клітинні лінії ссавців охоплюють, але без обмеження, клітини яєчників китайського хом'ячка, клітини HeLa, клітини нирок новонародженого хом'яка, клітини мишачої мієломи NS0 та багато інших клітинних ліній.

[00113] Широке розмаїття одноклітинних клітин-хазяїв також є корисним для експресії послідовностей ДНК. Ці хазяї охоплюють добре відомих про- та еукаріотів, як-то штамми *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, грибів, як-то дріжджів та клітини тварин, як-то клітини CHO, YB/20, NS0, SP2/0, R1.1, B-W та L-M, клітини нирок африканської зеленої мавпи (наприклад, клітини COS1, COS7, BSC1, BSC40, та BMT10), клітини комах (наприклад, Sf9), та людські та рослинні клітини у культурі тканин.

[00114] Експресія антитіл або їх частин у клітинах прокаріот, як-то *E. coli* є добре відомою у цій галузі. Відповідний огляд, див., наприклад, у Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991).

[00115] Експресія у культурі еукаріотичних клітин також доступна фахівцям в якості опції для отримання описаних тут антитіл. Сучасний огляд див., наприклад, у статтях Raff, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560, кожна з яких є повністю включеною сюди шляхом посилання.

[00116] Можуть бути вибрані або побудовані прийнятні вектори, які містять відповідні регуляторні послідовності, включаючи промоторні послідовності, термінаторні послідовності, послідовності поліаденілування, підсилюючі послідовності, маркерні гени та інші послідовності у разі необхідності. Вектори, відповідно, можуть бути плазмідами або вірусними векторами, наприклад, на основі фажів або фажмід. Більш детально див., наприклад, книгу *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* ("Лабораторний підручник по молекулярному клонуванню"): 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Багато відомих способів та протоколів, присвячених маніпуляціям з нуклеїновою кислотою, наприклад, присвячених отриманню конструкцій на основі нуклеїнових кислот, мутагенезу, сиквенсу, введенню ДНК у клітини, генній експресії та аналізу білків детально описано у книзі *Short Protocols in Molecular Biology* ("Короткі протоколи у молекулярній біології"), Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Способи, наведені у вищезгаданих книгах є добре відомими у цій галузі та

повністю включені сюди шляхом посилання.

[00117] Отже, додатковим аспектом передбачено клітину-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту, як зазначено тут. У іншому додатковому аспекті передбачено спосіб, який полягає у введенні такої нуклеїнової кислоти клітині-хазяїну. Для такого введення може бути застосовано будь-який прийнятний спосіб. Для еукаріотичних клітин прийнятні способи можуть, наприклад, полягати у трансфекції з фосфатом кальцію, трансфекції з DEAE-декстраном, електропорації, трансфекції, опосередкованої ліпосомами та у трансдукції з застосуванням ретровірусу або іншого вірусу, наприклад, вірусу коров'ячої віспи або бакуловірусів для клітин комах. Для бактеріальних клітин прийнятні способи можуть, наприклад, полягати у трансформації з хлоридом кальцію, електропорації та трансфекції з застосуванням бактеріофагів.

[00118] Після введення може бути викликана або дозволена експресія продукту з нуклеїнової кислоти, наприклад, шляхом культивування клітини-хазяїна в умовах, прийнятних для експресії гена.

[00119] У одному втіленні нуклеїнова кислота є вбудованою у геном (наприклад, у хромосому) клітини-хазяїна. Сприяння подібній інтеграції може бути здійснено шляхом вклучення послідовності, яка сприяє рекомбінації з геномом у відповідності зі стандартними способами. При необхідності максимізування експресії може бути запущено підсилення Ig.

[00120] Також у цій заявці передбачено спосіб, який полягає у застосуванні зазначеної вище конструкції у системі експресії з метою досягнення експресії антитіл (або їх частин) як зазначено вище.

[00121] Ця заявка також стосується виділених нуклеїнових кислот, як-то рекомбінантних молекул ДНК або клонованих генів або їх вироджених варіантів, мутантів, аналогів або фрагментів, які кодують антитіло, що зв'язується з CD105.

[00122] У додатковому втіленні повнорозмірна послідовність ДНК рекомбінантної молекули ДНК або клонованого гена антитіла або його описаної тут частини може бути функціонально приєднаною до послідовності, яка контролює експресію та може бути введена відповідному хазяїну. Винахід відповідно охоплює також одноклітинних хазяїв, трансформованих клонованим геном або рекомбінантною молекулою ДНК, яка містить послідовність ДНК, що кодує V_H, V_L, C_L та/або Fc-ділянку антитіла.

[00123] Іншою особливістю є експресія описаних тут послідовностей ДНК. Як добре відомо у цій галузі, експресія послідовностей ДНК може бути викликана шляхом їх функціонального приєднання до послідовності, яка контролює експресію у прийнятному векторі експресії та застосування цього вектора експресії для трансформації відповідного одноклітинного хазяїна.

[00124] Зрозуміло, що таке оперативне приєднання послідовності ДНК до послідовності, яка контролює експресію у разі, якщо вона сама вже не є частиною зазначеної послідовності ДНК, полягає у забезпеченні розташування ініціюючого кодону ATG, у належній рамці зчитування перед послідовністю ДНК.

[00125] Полінуклеотиди та вектори можуть бути надані у виділеній та/або а очищеній формі (наприклад, вільній або суттєво вільній від полінуклеотидів іншого походження, ніж полінуклеотид, який кодує поліпептид з бажаною функцією). Як тут застосовано, "суттєво чистий," та "суттєво вільний" відносяться до розчину або до суспензії, яка містить менш ніж, наприклад, приблизно 20% або ще менше стороннього матеріалу, як-то приблизно 10% або ще менше стороннього матеріалу, як-то приблизно 5% або ще менше стороннього матеріалу, як-то приблизно 4% або ще менше стороннього матеріалу, як-то приблизно 3% або ще менше стороннього матеріалу, як-то приблизно 2% або ще менше стороннього матеріалу, як-то приблизно 1% або ще менше стороннього матеріалу.

[00126] Для експресії послідовності ДНК заявленого винаходу може бути застосовано широкий вибір комбінацій хазяїн/вектор експресії. Корисні вектори експресії, наприклад, можуть складатися з сегментів послідовності хромосомної, нехромосомної та синтетичної ДНК. Прийнятні вектори охоплюють, але без обмеження, похідні SV40 та відомих бактеріальних плазмід, наприклад, плазмід E. coli EI, Pcr1, Pbr322, Pmb9 та їх похідних, таких плазмід, як RP4; фагову ДНК, наприклад, численні похідні фага λ, наприклад, NM989 та іншу фагову ДНК, наприклад, M13 та ниткоподібну одноланцюгову фагову ДНК; плазмід дріжджів, як-то плазмиду 2μ або її похідні; вектори, корисні для застосування у еукаріотичних клітинах, як-то вектори, корисні для застосування у клітинах комах або ссавців; вектори, отримані з комбінацій плазмідної та фагової ДНК, як-то плазмиди, які були змінені для застосування фагової ДНК або інших послідовностей, що контролюють експресію тощо.

[00127] Також заявленим винаходом передбачено рекомбінантну клітину-хазяїна, що містить одну або декілька полінуклеотидних конструкцій. Полінуклеотид, що кодує антитіло, як це передбачено в даному документі, утворює аспект цієї заявки, так само як і спосіб отримання

антитіла, який полягає у досягненні експресії одного або декількох полінуклеотидів, якої може бути досягнуто, наприклад, шляхом культивування у відповідних умовах рекомбінантних клітин-хазяїв, які містять полінуклеотид, після чого бажане антитіло може бути виділено та/або очищено з застосуванням будь-якого прийнятного способу з наступним застосуванням у разі

5

необхідності.
[00128] Для експресії послідовностей ДНК у цих векторах можуть бути застосовані будь-які з широкого спектру послідовностей, які контролюють експресію функціонально приєднаної до них послідовності ДНК. Такі корисні послідовності, що контролюють експресію охоплюють, наприклад, ранній або пізній промотори SV40, CMV, коров'ячої віспи, поліоми або аденовірусу,

10

системи lac, trp, TAC, TRC, LTR, головну операторну та промоторну ділянки фагу λ , контрольні ділянки білка оболонки fd, промотор 3-фосфогліцераткинази або інших гликолитических ферментів, промотори кислій фосфатази (наприклад, Pho5), промотори дріжджових факторів альфа-парування та інші послідовності, відомі своєю здатністю контролювати експресію генів прокаріотичних або еукаріотичних клітин або їх вірусів та різні їх комбінації.

15

[00129] Слід розуміти, що не всі вектори, послідовності, що контролюють експресію та хазяї будуть функціонувати однаково добре з однією і тією ж системою експресії. Тим не менш, фахівець у цій галузі зможе вибрати відповідні вектори, послідовності, що контролюють експресію та хазяїв без зайвого експериментування для досягнення бажаної експресії та без відходу від суті та обсягу цієї заявки. Наприклад, при виборі вектора також повинен розглядатися хазяїн, оскільки вектор повинен функціонувати в ньому. Також можуть бути розглянуті такі фактори, як кількість копій вектора, здатність контролювати це число копій та експресію будь-яких інших білків, що кодуються вектором, як-то антибіотичних маркерів.

20

[00130] Цією заявкою також створені, як описано тут в іншому місці, конструкції у вигляді плазмід, векторів, касет для транскрипції або експресії, які містять принаймні один полинуклеотид, як описано вище. Прийнятні вектори, які можна вибрати або побудувати, містять відповідні регуляторні послідовності, промоторні послідовності, термінаторні послідовності, послідовності поліаденілування, підсилюючі послідовності, маркерні гени та інші послідовності у разі необхідності. Вектори відповідно можуть бути плазмідами або вірусними векторами, наприклад, на основі фарів або фармід. Більш детально див., наприклад, книгу Molecular Cloning: a Laboratory Manual ("Лабораторний підручник по молекулярному клонуванню"): 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Багато відомих способів та протоколів, присвячених маніпуляціям з нуклеїновою кислотою, наприклад присвячених отриманню конструкцій на основі нуклеїнових кислот, мутагенезу, сиквенсу, введенню ДНК у клітини, генній експресії та аналізу білків детально описано у книзі Short Protocols in Molecular Biology ("Короткі протоколи у молекулярному клонуванні"), Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Способи, наведені у вищезгаданих книгах є добре відомими у цій галузі та повністю включені сюди шляхом посилання.

25

30

35

[00131] При виборі послідовності, яка контролює експресію, як правило, будуть розглянуті різні фактори, які, наприклад, охоплюють відносну силу системи, її керованість та її сумісність з певною послідовністю ДНК або з геном, експресію якого досліджують, особливо відносно потенційних вторинних структур. Прийнятні одноклітинні хазяї будуть обрані шляхом розгляду, наприклад, їх сумісності з обраним вектором, їх секретивним характеристикам, їх здатності до належного згортання білків, їх ферментативним критеріям, а також ступеня токсичності для хазяїна продукту, який кодується послідовністю ДНК, експресію якої треба отримати та легкості очищення продуктів експресії.

40

45

[00132] Додатковим аспектом передбачено клітину-хазяїна, що містить один або декілька полінуклеотидів, як зазначено в цьому документі. Іншим додатковим аспектом передбачено спосіб введення клітині-хазяїну такого одного або декількох полінуклеотидів з допомогою будь-якого прийнятного способу. Для еукаріотичної клітини подібні прийнятні способи можуть, наприклад, полягати у трансфекції з фосфатом кальцію, трансфекції з DEAE-декстраном, електропорації, трансфекції, опосередкованої ліпосомами та у трансдукції з застосуванням ретровірусу або іншого вірусу, наприклад, вірусу коров'ячої віспи або бакуловірусів для клітин комах. Для бактеріальних клітин прийнятні способи можуть, наприклад, полягати у трансформації з хлоридом кальцію, електропорації та трансфекції з застосуванням бактеріофагів.

50

55

[00133] Після введення може бути викликано або дозволено проведення експресії з одного або декількох полінуклеотидів, наприклад шляхом культивування клітин-хазяїв в прийнятних для експресії одного або декількох поліпептидів з одного або декількох полінуклеотидів. Для цього можуть бути застосовані індукційні системи та викликання експресії може бути

60

здійснено шляхом додавання активатора.

[00134] У одному втіленні полінуклеотиди можуть бути приєднані до геному (наприклад, хромосоми) клітини-хазяїна. Для сприяння цієї інтеграції з геномом з допомогою стандартних способів можуть бути приєднані послідовності, які сприяють рекомбінації з геномом та у іншому втіленні нуклеїнову кислоту підтримують у складі епісомального вектора у клітині-хазяїні.

[00135] Створені тут способи охоплюють застосування зазначеної вище конструкції у системі експресії з метою експресії певного поліпептиду.

[00136] З урахуванням цих та інших факторів, фахівець цій галузі зможе сконструювати різні комбінації векторів/послідовностей, що контролюють експресію/хазяїв, з допомогою яких можна здійснити експресію послідовностей ДНК, прийнятну для ферментації або для великомасштабної культури тваринних клітин.

[00137] Окрім клонування або швидше, ніж шляхом клонування, полінуклеотид, який кодує антитіло або його частину може бути отримано рекомбінантним/синтетичним шляхом. Полінуклеотид може бути сконструйовано з застосуванням відповідних кодонів та загалом будь-хто може вибрати бажані кодони для призначеного хазяїна при застосуванні відповідної послідовності для експресії. Повний полінуклеотид може бути зібрано з перекриваються олігонуклеотидів, отриманих з допомогою стандартних способів та зібраних у повну кодуєчу послідовність. Див., наприклад, Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984).

[00138] Одночасне застосування нуклеїнових кислот, які кодують антитіла (або їх частини) та заміни у вибраних положеннях амінокислот може бути здійснено з допомогою різних способів, відомих фахівцям у цій галузі, включаючи, наприклад, рекомбінантні технології та хімічний синтез.

Анти-CD105 антитіла

[00139] Ендоглінін (CD105) експресується на клітинній поверхні у вигляді гомодимерного трансмембранного білка у 180 кДА. Зовнішній домен зв'язує TGF- β 1 та -3 ізоформи з високою спорідненістю (50 нМ) та трансмембранний та внутрішньоклітинний домен CD105 мають 71% схожість послідовності до бетаглікану. Ген CD105 людини, розташований на хромосомі 9q34 було визначено з допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ*. Було виявлено, що його кодуєча ділянка містить 14 екзонів та описані дві різні ізоформи (L та S) CD105 зі здатністю до зв'язування TGF- β . На відміну від ізоформи S-CD105, яка складається з 600 амінокислотних залишків з 14 амінокислотними залишками у цитоплазматичному хвості, ізоформа L-CD105 складається з 633 амінокислотних залишків з 47 амінокислотними залишками у цитоплазматичному хвості, однак L-CD105 є домінуючою формою. CD105 постійно фосфорилується у ендотеліальних клітинах, головним чином по сериновим та треоніновим залишкам та це фосфорилування відбувається завдяки постійній активності TGF- β RII всередині клітини. Зв'язування TGF- β з CD105 веде до пригнічення фосфорилування, подібного до спостереженої дії пригнічувачів протеїнкінази C. Амінокислотна послідовність CD105 людини містить трипептид RGD (аргінін-гліцин-аспарагінова кислота), розташований у оголеній ділянці позаклітинного домену. Пептид RGD є ключовою структурою розпізнавання, знайденою у білках позаклітинної матриці, як-то фибронектин, вітронектин, фактор фон Віллебранда (ФВ), колаген першого типу та фібриноген та її впізнають інтегрини клітинної поверхні. Адгезія інтегрину є залученою до гемостазу, тромбозу, ангиогенезу та запалення, тобто до процесів, у яких ендотелій відіграє важливу роль. (Duff et al., FASEB J., 17:984-992 (2003)).

[00140] CD105 є членом родини рецепторів TGF- β , експресія яких відбувається шляхом проліферації ендотеліальних клітин, для якої потрібна присутність нормальних кількостей CD105. Експресія CD105 підвищується через клітинну гіпоксію завдяки продукуванню фактора індукції гіпоксії 1- α (HIF-1- α) та захищає гіпоксичні клітини від апоптозу. Деякі функції CD105 є пов'язаними з сигналуванням TGF- β . Сигналування TGF- β відбувається через гетеродимерні рецептори, які складаються з серинових кіназ, рецептора I (RI) та рецептора II (RII).. Зв'язування TGF- β з зовнішніми доменами рецептора викликає активність цитоплазматичної кінази RII, яка фосфорилує TGF- β RI, який потім може взаємодіяти з низовими сигнальними факторами, як-то білки Smad. CD105 утворює частину рецепторного комплексу TGF- β та також може бути незалежно присутнім на клітинній поверхні. У багатьох клітинах *in vitro* CD105 пригнічує сигналування TGF- β .

[00141] CD105 також зв'язує інші фактори росту, активин А та кісткові морфогенетичні білки (BMP) -10, -9, -7 та -2. Зв'язування TGF- β або іншого з лігандів фактора росту до CD105 потребує наявності принаймні рецептора RII та сам по собі він не спроможний до зв'язування лігандів. Об'єднання CD105 з рецепторами не змінює їх власної спорідненості до ліганду. В результаті об'єднання цитоплазматичний домен CD105 фосфорилується кіназами TGF- β RI та

TGF- β RII з наступною дисоціацією кінази TGF- β RI (але не TGF- β RII) від рецепторного комплексу.

[00142] Експресія CD105 пригнічує рівні фосфорилування TGF- β RII, але підвищує рівні фосфорилування TGF- β RI, що веде до підвищеного фосфорилування тільки Smad 2, але не Smad 3. Оскільки Smad 2 може взаємодіяти з різними факторами транскрипції, спільними активаторами та супресорами, фосфорильований Smad 2 може виступати в якості інтегратора кількох сигналів для модулювання транскрипції генів. Отже, CD105 знижує функції TGF- β шляхом взаємодії з TGF- β RI та TGF- β RII та змінює фосфорилування білків Smad низового рівня.

[00143] Дія CD105 полягає у зниженні сигналування численних кіназних рецепторних комплексів надродини TGF- β , включаючи рецептори TGF- β (TGF- β R), рецептороподібні кінази активіну (ALK) та рецептори активіну. За відсутності CD105 активування рецепторів TGF- β веде до фосфорилування білків SMAD (SMAD 2 та 3), які пригнічують ріст ендотеліальних клітин. Однак, активування CD105 з допомогою TGF- β змінює фосфорилування білка SMAD (включаючи фосфорилування SMAD 1, 5 та 8). Кінцевим результатом є інкубування росту ендотеліальних клітин через активування рецептора TGF- β (див. Фіг. 2). Не дивно, що запобігання активування CD105 шляхом дії анти-CD105 антитіл або антисенсового олігонуклеотиду діє з TGF- β синергічним чином, пригнічуючи ріст ендотеліальних клітин.

[00144] Промотор CD105 має 2.6 кб. у довжину, але не містить відрізків ініціації транскрипції ТАТА або СААТ. Проте він містить дві ділянки, багаті GC-парами, консенсусні характерні послідовності для Sp1, ets, GATA, AP-2, NGF- β , та Mad, а також елементи відповіді TGF- β . Тим не менше, CD105 має відносно обмежений розподіл у клітинах. Основний рівень транскрипції, як видається, вимагає наявності сайту ets у положенні -68 та сайтів Sp1, але вважається, що до відносного обмеження експресії, наприклад для ендотеліальних клітин, залучені численні регуляторні ділянки, зокрема одна у положенні -1294 - -932 та друга, яка розташована дуже близько до сайту ініціації транскрипції. CD105 активується з допомогою TGF- β та, як було показано, потребує наявності сайту Sp1 у положенні -37 - -29, а також участі одного або декількох розташованих поруч нижче SBE сайтів зв'язування Smads 3 та/або 4 (які активуються шляхом сигналування TGF- β). Гіпоксія є спільною рисою ішемічних тканин та пухлин та потужним стимулятором для експресії гена CD105 у судинних ендотеліальних клітинах (ЕС). Таку дію можна підсилити у поєднанні з TGF- β 1. Активування CD105 може виконувати самозахисну роль у ЕС-клітинах в умовах гипоксичного стресу.

[00145] Судинні ЕС-клітини є головним джерелом CD105. Інші типи клітин, включаючи судинних гладком'язові клітини, фібробласти, макрофаги, лейкозні клітини пре-В та мієломоцитарного походження та еритроїдні попередники здатні до експресії CD105 у меншій кількості.

[00146] CD105 є залученим до ангіогенезу. Антисенсові експерименти демонструють, що пригнічення експресії CD105 у клітинах HUVEC веде до помітного пригнічення ангіогенезу *in vitro* у комбінації з TGF- β 1, що вказує на те, що CD105 є проангіогенним компонентом ендотеліальних клітин. Додаткове свідчення важливої ролі CD105 у ангіогенезі було отримано шляхом експериментів з мишами, які мали заблокований ген CD105. Такі миші мали численні судинні та серцеві дефекти, які призводили до смерті тварин на ранній ембріональній стадії. Важкі судинні порушення, які спостерігали у цих мишах вказують на те, що CD105 є необхідним для утворення кровоносних судин у позаембріональній судинній системі, що додатково підтверджує безпосередню роль CD105 у ангіогенезі.

[00147] CD105, який також має назву ендогліну або edg-1 є гомодимерним мембранним глікобілком першого типу, який має високі рівні експресії у проліферуючих судинних ендотеліальних клітинах. Отже, CD105 головним чином є пов'язаним з проліферацією маркером для ендотеліальних клітин, які проходять стадію активного ангіогенезу. Однак може існувати обмежена експресія CD105 через судинний ендотелій нормальних тканин. Відомо, що CD105 людини специфічно зв'язує трансформуючий фактор росту- β (TGF- β), та визначена амінокислотна послідовність CD105 має сильну гомологію до β -глюкану, який є типом рецептора TGF- β .

[00148] Застосування CD105 було орієнтовано на способи зменшення пухлинної судинної системи на основі застосування антитіл, оскільки CD105 є пов'язаним з проліферацією антигеном у ендотеліальних та лейкозних клітинах. Його експресія активується у пов'язаному з пухлинами судинному ендотелії та CD105 є необхідним для ангіогенезу. Ангіогенез, який полягає у утворенні нових капілярних кровоносних судин веде до неоваскуляризації а також підтримує існуючу судинну систему. Він є комплексним процесом, який охоплює серії

послідовних кроків, включаючи ендотеліальну клітинно-опосередковану деградацію судинної базальної мембрани та міжтканевих матриць, міграцію ендотеліальних клітин, проліферацію ендотеліальних клітин та утворення цими клітинами капілярних петель.

[00149] CD105 можна знайти на клітинах, які складають та підтримують існуючу судинну систему, а також клітинах, які сприяють ріст та стають частиною нової судинної системи. Ці антитіла можуть зв'язувати CD105 та тим самим пригнічувати ангіогенез, пригнічувати існуючу судинну систему або підтримку існуючої судинної системи та/або пригнічувати розповсюдження малих судин. Додатково до їх застосування для очищення CD105, ці антитіла є корисними для очищення, визначення та для діагностичних та терапевтичних цілей. Створені тут антитіла можуть бути застосовані для отримання лікарських засобів для лікування різних станів та захворювань, у способах лікування зазначених станів та захворювань та їх визначення або діагностики. Як тут застосовано, ангіогенез охоплює ріст та/або розвиток нових кровоносних судин (який також має назву неоваскуляризації), розповсюдження дрібних судин, надмірний або тривалий судинний ріст та підтримку існуючої судинної системи. Ангіогенні стани та захворювання стосуються таких захворювань та станів, які мають відношення до, спричинені або пов'язані з ангіогенезом. Необмежені приклади таких захворювань охоплюють, наприклад, різні форми раку (початкові пухлини та метастази). До CD105 були отримані мишачі моноклональні антитіла (mAb), які знижують активність CD105 та таким чином пригнічують ангіогенез та/або пригнічують розповсюдження малих кровоносних судин. Ці мишачі антитіла описані у патентах США (U.S. patents 5,928,641, 6,200,566, 6,190,660 та 7,097,836), кожен з яких повністю включено сюди шляхом посилання. Крім того була підтверджена ефективність кількості цих антитіл *ex vivo* та *in vivo* та моноклональні антитіла, які зв'язують CD105 становлять інтерес у якості сполук для зниження кількості CD105. Проте терапевтичне застосування мишачих антитіл є недоцільним, оскільки їх введення має ряд обмежень, включаючи їх імуногенність у вигляді, наприклад, анти-мишачих антитіл людини (HAMA).

[00150] Були також описані деякі антитіла до CD105, зокрема моноклональні антитіла ("mAb") до CD105. MAb SN6 є антитілом, отриманим внаслідок імунізації мишей глікобілковими сумішами клітинних мембран клітин лейкемії людини (Haruta and Seon, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7898-7902). SN6 є мишачим моноклональним антитілом, яке впізнає CD105 людини. MAb 44G4 є антитілом, отриманим внаслідок імунізації мишей цільною клітинною суспензією клітин pre-B лейкемії людини (Gougos and Letarte, 1988, J. Immunol. 141:1925-1933; 1990, J. Biol. Chem. 265:8361-8364). 44G4 є також мишачим моноклональним антитілом, яке впізнає CD105 людини. MAb MJ7/18 є антитілом, отриманим внаслідок імунізації щурів запальною мишачою шкірою (Ge and Butcher, 1994, *supra*). MJ7/18 також є мишачим моноклональним антитілом, яке впізнає CD105 людини. mAb Tec-11 є антитілом, отриманим внаслідок імунізації мишей ендотеліальними клітинами з пупочної вени людини (Burrows et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1623-1634). Tec-11 є мишачим моноклональним антитілом з обмеженою реактивністю до CD105 людини. Також описані химерні антитіла, які зв'язують CD105, які демонструють зменшену імуногенність при зберіганні та/або покращену специфічність. Додатковим чином, для розв'язання проблем, пов'язаних з мишачими антитілами, тут також описані химерні антитіла, які зв'язують CD105 та зменшують та/або пригнічують ангіогенез та демонструють зменшену імуногенність при зберіганні та/або покращену специфічність. Ці анти-CD105 антитіла є корисними для діагностики та лікування різних станів та захворювань, а також для очищення та визначення CD105. Антитіла до CD105 є важливими елементами для розвитку терапії для лікування різних захворювань та станів, які призводять до ангіогенезу або які знаходяться під його впливом або виникають через ангіогенез.

[00151] Заявленим винаходом створено антитіла, які зв'язуються з CD105, а також антитіла, (або їх антиген-зв'язуючі фрагменти), які зв'язуються з CD105 та пригнічують (частково або повністю) або стримують розвиток/лікують (частково або повністю) ангіогенез/неоваскуляризацію, розповсюдження малих судин, пригнічення клітинної проліферації або пригнічення пухлинного росту. Аналогічним чином, пригнічення або зв'язування CD105 також охоплює пригнічення функції CD105 (наприклад, сигналування, зв'язування, активування тощо). У іншому втіленні антитіло пригнічує ангіогенез шляхом зв'язування з CD105. Винаходом також створені клітинні лінії, які можуть бути застосовані для отримання антитіл, способи отримання клітинних ліній, способи отримання експресії та очищення антитіл.

[00152] Можна визнати, що отримані з застосуванням описаних тут способів антитіла, які специфічно зв'язують CD105 можуть бути перевірені з допомогою передбачених тут або відомих у цій галузі аналізів на здатність до зв'язування CD105 з застосуванням стандартних способів, як-то, але без обмеження, ІФА. Спорідненість описаних тут антитіл також може бути

визначена з застосуванням стандартних способів, як-то, але без обмеження, Біасcore або поверхневий плазмонний резонанс.

[00153] Заявленим винаходом створені антитіла, які зв'язують CD105, а також створені антитіла, які зв'язують CD105 та пригнічують ангіогенез.

[00154] Заявленим винаходом створено антитіло, яке містить змінну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 1, сталу ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 2, змінну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 3 та сталу ділянку (Fc) гамма 1 (γ 1), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 4., позначену як SEQ ID №: 3; та сталу ділянку (Fc), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 4.

[00155] У іншому необмеженому втіленні анти-CD105 антитіло містить ділянку V_L CDR1, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 5; V_L CDR2, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 6; V_L CDR3, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 7; V_H CDR1, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 8; V_H CDR2, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 9; та V_H CDR3, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 10.

[00156] У іншому необмеженому втіленні виділене гуманізоване, деімунізоване антитіло до CD105 може містити змінну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 11 та змінну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 12. Інші необмежені приклади гуманізованих-деімунізованих важких ланцюгів охоплюють, але без обмеження, послідовності SEQ ID №№: 13, 14, 15 та 16. Інші необмежені приклади гуманізованих-деімунізованих легких ланцюгів охоплюють, але без обмеження, послідовності SEQ ID №№: 17, 18, 19, 20, 21, 22 та 23. Послідовності наведені нижче у Прикладі 17.

[00157] У іншому аспекті, заявленим винаходом створено антитіло, здатне конкурувати з описаним тут анти-CD105 антитілом в умовах, у яких зв'язування з CD105 принаймні 5% антитіл, які мають послідовності V_H та V_L блокується шляхом конкуренції з таким антитілом, як доведено шляхом ІФА аналізу.

[00158] Також тут створено нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються з CD105 та зменшують його активність. Нейтралізуючі антитіла можуть, наприклад, пригнічувати ангіогенез шляхом зв'язування з CD105.

[00159] Описані тут антитіла є корисними у визначенні або у діагностичних застосуваннях, як більш детально описано нижче. Описані тут антитіла є корисними для зв'язування з CD105, яке, в свою чергу, може пригнічувати ангіогенез, як описано тут.

[00160] Описані тут антитіла можуть додатково містити терапевтичні функціональні групи для застосування з терапевтичною метою.

[00161] Описані тут антитіла також можуть бути застосовані у якості імунокон'югатів. Як тут застосовано для цілей цієї заявки та Формули Винаходу, імунокон'югати мають відношення до кон'югатів, які містять анти-CD105 антитіла або їх фрагменти за заявленим винаходом та принаймні одну терапевтичну мітку. Терапевтичні мітки містять протипухлинні агенти та пригнічувачі ангіогенезу. Такі протипухлинні агенти відомі у цій галузі та охоплюють, але без обмеження, токсини, лікарські препарати, ферменти, цитокіни, радіонукліди, фотодинамічні агенти та інгібітори ангіогенезу. Токсини, охоплюють, але без обмеження, А - ланцюг рицину, мутантні екзотоксини *Pseudomonas*, дифтерійний анатоксин, стрептонігрин, боаміцин, сапорин, гелонін та антивірусний білок лаконосу американського. Лікарські препарати охоплюють даунорубіцин, метотрексат та каліхеаміцин. Радіонукліди охоплюють радіометали. Цитокіни охоплюють, але без обмеження, трансформуючий фактор росту (TGF)- β , інтерлейкіни, інтерферони та фактори некрозу пухлин. Фотодинамічні агенти охоплюють, але без обмеження, порфірини та їх похідні. Також передбачено застосування добре відомих додаткових терапевтичних міток. Способи отримання комплексів моноклональних антитіл до CD105 або їх фрагментів з принаймні одним протипухлинним агентом добре відомі фахівцям у цій галузі (тобто кон'югатів антитіл, розглянутих у Ghetie et al., 1994, Pharmacol. Ther. 63:209-34). Такі способи можуть полягати у застосуванні одного з декількох прийнятних гетеробіфункціональних реагентів, застосованих для з'єднання або зв'язування молекул. Далі тут надано опис додаткових радіонуклідів разом з додатковими способами зв'язування молекул, як-то терапевтичних та діагностичних міток.

[00162] Антитіла можуть бути змінні з різною метою з допомогою відомих у цій галузі способів, як-то, наприклад, шляхом додавання поліетиленгліколю (ПЕГ). Модифікація з допомогою ПЕГ (ПЕГілування) може привести до одно- або до багатократного підвищення часу

обігу, підвищеної розчинності, підвищеної стійкості до протеолізу, зниженої антигенності та імуногенності, підвищеної біодоступності, зменшеної токсичності, покращення стійкості та до більш легкого отримання композиції. (огляд див. у Francis et al., International Journal of Hematology 68:1-18, 1998).

5 [00163] Fc-частини антитіл можуть бути змінені для підвищення часу напівжиття у кровообігу після введення пацієнту. Змінення можуть бути визначені з застосуванням стандартних засобів у цій галузі, як-то, наприклад, засоби, описані у патенті США U.S. Patent No. 7,217,798, повністю включеним сюди у якості посилання.

10 [00164] Також відомі інші способи підвищення часу напівжиття злитих білків на основі антитіл у кровообігу, як-то, наприклад, способи, описані у патентах США U.S. Patent №№. 7,091,321 та 6,737,056, кожен з яких є також повністю включеним сюди у якості посилання. Додатково можуть бути отримані антитіла або досягнута експресія антитіл, які не будуть містити фукозу на їх складних цукрових ланцюгах з приєднаним N-глікозидом. Відомо, що усунення такої фукози підвищує ефекторні функції антитіл та антиген-зв'язуючих фрагментів, в том числі, але без обмеження, залежну від антитіл клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC) та комплемент-залежну цитотоксичність (CDC). Аналогічним чином, антитіла, які можуть зв'язувати CD105 можуть бути прикріплені за їх C-кінець до частини або до повного важкого ланцюга імуноглобуліну, отриманого від антитіла будь-якого ізотипу, наприклад, IgG, IgA, IgE, IgD та IgM та від будь-якого з підкласів ізотипів, особливо IgG1, IgG2b, IgG2a, IgG3 та IgG4.

20 [00165] Крім того, описані тут антитіла можуть також бути змінені таким чином, щоб вони набули здатність перетинати гематоенцефалічний бар'єр. Таке змінення антитіл, описаних вище дозволяє лікувати захворювання мозку, як-то мультиформну гліобластому (GBM). Зразкові модифікації, які дозволяють білкам, як-то антитілам, перетинати гематоенцефалічний бар'єр описані у патенті США US Patent Publication 20070082380, повністю включеному сюди у якості посилання.

25 [00166] Було показано, що глікозилювання імуноглобулінів значно впливає на їх ефекторні функції, структурну стійкість та швидкість їх виділення клітинами, які їх продукують (Leatherbarrow et al., Mol. Immunol. 22:407 (1985)). Відповідні за ці властивості вуглеводні групи звичайно є прикріпленими до сталих (C) ділянок антитіл. Наприклад, глікозилювання IgG по аспарагіну 297 у C_H 2 домені є необхідним для набуття максимального потенціалу антитіл IgG у активуванні класичного шляху комплемент-залежного цитолізу (Tao and Morrison, J. Immunol. 143:2595 (1989)). Глікозилювання IgM по аспарагіну 402 у C_H 3 домені є необхідним для належної збірки та цитолітичної активності антитіл (Muraoka and Shulman, J. Immunol. 142:695 (1989)). Усунення сайтів глікозилювання у положеннях 162 та 419 у доменах C_H 1 та C_H 3 антитіл IgA веде до внутрішньоклітинної деградації та принаймні до 90% пригнічення секреції (Taylor and Wall, Mol. Cell. Biol. 8:4197 (1988)). Додатково можуть бути отримані антитіла або досягнута експресія антитіл, які не будуть містити фукозу на їх складних цукрових ланцюгах з приєднаним N-глікозидом. Відомо, що усунення такої фукози підвищує ефекторні функції антитіл та антиген-зв'язуючих фрагментів, в том числі, але без обмеження, залежну від антитіл клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC) та комплемент-залежну цитотоксичність (CDC). Ці "дефукозиловані" антитіла можуть бути отримані з допомогою різних систем з застосуванням відомих у цій галузі способів молекулярного клонування, до яких залучені, але без обмеження, трансгенні тварини, трансгенні рослини або клітинні лінії, змінені шляхом генетично-інженерних способів таким чином, що вони більше не містять ферментів та біохімічних шляхів, необхідних для включення фукози у складні цукрові ланцюги з приєднаним N-глікозидом (також відомі під назвою тварин, рослин та клітин з фукозилтрансферазним «нокаутом»). Необмежені приклади клітин, з яких можна створити клітини з фукозилтрансферазним «нокаутом» охоплюють клітини CHO, SP2/0, NS0 та YB2/0.

50 [00167] Також дослідники спостерігали глікозилювання імуноглобулінів у змінній (V) ділянці. Sox та Hood повідомили, що приблизно 20% антитіл людини є гліколізованими у V-ділянці (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66:975 (1970)). Вважається, що глікозилювання V-домену виникає через випадкову наявність сигналу N-приєданого глікозилювання Asn-Xaa-Ser/Thr у послідовності V-ділянки та не доведено, що воно відіграє роль у функціонуванні імуноглобуліну.

55 [00168] Глікозилювання у залишку змінного домену каркасної ділянки може змінити зв'язувальну взаємодію антитіла з антигеном. Заявленим винаходом створені критерії, з допомогою яких обмежену кількість амінокислот у складі каркасної ділянки або CDR-ділянок ланцюга імуноглобуліну можна буде вибрати для мутації (наприклад, шляхом заміщення, усунення або додавання залишків) з метою підвищення спорідненості антитіл.

60 [00169] Спорідненість до зв'язування антигену може, звичайно, бути зменшена шляхом введення однієї або декількох мутацій у V-ділянку каркасної ділянки, звичайно у ділянці,

прилеглі до одного або до кількох CDR та/або у одну або у декілька каркасних ділянок. Звичайно такі мутації передбачають введення заміщень консервативних амінокислот, які або руйнують або створюють послідовності сайту глікозилювання, але суттєво не зачіпають гідрофобні структурні властивості поліпептиду та при цьому звичайно уникають мутацій, пов'язаних з введенням пролінового залишку. Глікозилювання антитіл додатково описано у патенті США No. 6 350 861, вміст якого, який стосується глікозилювання включений сюди у якості посилання.

[00170] Можуть також бути отримані антитіла, призначені для короткострокової або для довгострокової доставки.

[00171] Антитіла, які зв'язуються з CD105 також можуть бути застосовані для очищення CD105 та/або для визначення рівнів CD105 у зразку або у організмі пацієнта для визначення або для діагностики захворювання або розладу, пов'язаного з CD105, як більш детально описано нижче.

[00172] Отримані з застосуванням таких способів антитіла, які зв'язують CD105 можуть бути перевірені на одну або на декілька їх властивостей, як-то спорідненість зв'язування, авидність та нейтралізуючі можливості. Корисні антитіла можуть бути застосовані для введення пацієнту для запобігання, пригнічення, стримування або лікування стану, захворювання або розладу, пов'язаного з ангіогенезом.

[00173] Антитіла можна оцінити відносно однієї або декількох притаманних їм характеристик, як-то спорідненість зв'язування, авидність та швидкості асоціації та дисоціації. У одному аспекті антитіла можна оцінити на їх здатність до нейтралізовування активності CD105 або VEGF. Вимірювання спорідненості зв'язування авидності та швидкостей асоціації та дисоціації може бути здійснено з застосуванням відомих у цій галузі способів, як-то, але без обмеження, імуноферментний аналіз (ІФА), аналіз Скетчарда, аналіз з допомогою системи Віасоге (поверхневий плазмонний резонанс) тощо, а також з допомогою інших загальноприйнятих відомих фахівцям у цій галузі способів аналізу.

[00174] Вимірювання зв'язування антитіл з CD105 та/або здатності антитіл, наприклад, пригнічувати ангіогенез може бути визначено з застосуванням, наприклад, імуноферментного аналізу (ІФА), аналізу конкурентного зв'язування, аналізу ELISPOT або будь-якого іншого корисного відомого у цій галузі аналізу. Ці аналізи є загальноприйнятими та відомими пересічним фахівцям у цій галузі.

[00175] У одному необмеженому втіленні для вимірювання зв'язувальної здатності певних антитіл, які зв'язуються з CD105 може бути застосовано ІФА-аналіз.

[00176] Аналізи, як-то ІФА, також можуть бути застосовані для визначення антитіл, які демонструють підвищену специфічність до CD105 у порівнянні з іншими антитілами. Аналізи, як-то ІФА, також можуть бути застосовані для визначення антитіл, які зв'язуються з епітопами через один або декілька поліпептидів та через один або декілька видів CD105 або VEGF. Аналіз специфічності може бути проведено шляхом здійснення паралельних ІФА-аналізів, в яких досліджуване антитіло одночасно перевіряють у різних камерах для аналізу на здатність до зв'язування одного або кількох епітопів з різними видами поліпептиду, який містить епітопи CD105 для визначення антитіл, які зв'язуються з CD105. Іншим відомим фахівцям у цій галузі способом вимірювання виявленої спорідненості зв'язування є спосіб поверхневого плазмонного резонансу (аналіз здійснюють з допомогою системи BIACORE 2000) (Liljeblad, et al., Glyco. J. 2000, 17:323-329). Стандартні вимірювання та традиційні способи аналізу зв'язування описані у Heeley, R. P., Endocr. Res. 2002, 28:217-229.

[00177] Антитіла, які специфічно зв'язуються з CD105 також можуть бути досліджені на їх здатність до лікування різних захворювань та станів, пов'язаних з ангіогенезом у зв'язку з різними формами раку (наприклад, первинними пухлинами, рецидивними пухлинами та метастазами). Для перевірки цих ефектів може бути застосовано будь-якій прийнятний та відомий будь-якому фахівцю у цій галузі аналіз та деякі подібні способи описані тут. У одному прикладі, описані тут антитіла досліджують на їх здатність до зв'язування CD105. У іншому прикладі, константи спорідненості для описаних тут антитіл визначають шляхом поверхневого плазмонного резонансу (SPR). У іншому прикладі, описані тут антитіла досліджують на їх вплив на пригнічення ангіогенезу.

[00178] Крім активного інгредієнта створені тут композиції (анти-CD105 антитіла або їх фрагменти) можуть додатково містити фармацевтично прийнятний наповнювач, носій, буфер, стабілізатор, поверхнево-активну речовину або інші добре відомі фахівцям у цій галузі матеріали. Такі матеріали повинні бути нетоксичними та не впливати на ефективність активного інгредієнта (інгредієнтів). Точна природа носія або іншого матеріалу буде залежати від шляху введення.

[00179] Заявленим винаходом створені нові композиції анти-CD105 антитіл, попередньо заповнені шприці, які містять композиції та застосування таких композицій, корисних у лікуванні розладів, пов'язаних з ангіогенезом. Цією заявкою також створені композиції, які можуть бути застосовані для внутрішньовенного або внутрішньочного введення, наприклад, для лікування

5

пов'язаних з CD105 захворювань на рак та офтальмологічних станів. Описані тут зв'язування, спорідненість, авидність та активність антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів до CD105 тут можуть бути оцінені з допомогою відомих у цей спосіб, включаючи, але не без обмеження, описані вище та нижче у Прикладах способи аналізу.

10

[00180] У одному аспекті, заявленим винаходом передбачено композицію, яка містить приблизно 1-150 мг/мл анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, до 100 мМ буферизуючого агента, до 1 М поліолу та має рН, який дорівнює приблизно 4,0-7,5.

[00181] У одному аспекті, композиція є стійкою після отримання, що може бути перевірено у відповідності зі стандартними засобами. Безпечно застосування композицій, які містять білки та поведження з ними створюють значні труднощі для фармацевтичних рецептур. Білки володіють унікальними хімічними та фізичними властивостями, які мають проблеми, пов'язані зі стійкістю, тобто існують різні шляхи деградації білків, в тому числі як хімічна, так і фізична нестійкість. Хімічна нестійкість охоплює дезамінування, агрегацію, усичення пептидного каркасу та окислення залишків метіоніну. Фізична нестійкість охоплює багато явищ, у тому числі, наприклад, агрегацію.

15

20

[00182] "Стіяка" композиція є такою, у якій білок у його складі суттєво зберігає свою фізичну та/або хімічну стійкість та/або біологічну активність протягом зберігання. Різні аналітичні способи вимірювання стійкості білка є прийнятними у цій галузі та огляд їх можна знайти, наприклад, у книгах Peptide and Protein Drug Delivery ("Доставка ліків на основі пептидів та білків"), 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. ("Розширений огляд доставки ліків") 10: 29-90 (1993). Стійкість може бути виміряна при вибраній температурі та у вибраному періоді часу. Переважним чином, композиція є стійкою при кімнатній температурі (приблизно 30°C) або при 40°C протягом принаймні 1 місяця та/або стійкою при температурі приблизно 2-8°C протягом принаймні 1 року або принаймні 2 років. Крім того, композиція може бути стійкою після заморожування (наприклад, до -80°C) та відтавання.

25

30

[00183] Білок "зберігає свою фізичну стійкість" у складі фармацевтичної композиції, якщо він не демонструє ознак агрегації, осаджування та/або денатурації під час візуальної перевірки кольору та/або прозорості або як було виміряно шляхом розсіювання УФ-випромінювання або шляхом ексклюзійної хроматографії (SEC). Способи визначення таких вимірювань відомі у цій галузі та більш детально описані нижче.

35

[00184] Білок "зберігає свою хімічну стійкість" у композиції, якщо хімічна стійкість у даний момент часу є такою, що білок, як вважають, як і раніше зберігає свою біологічну активність, як визначено нижче. Хімічну стійкість можна оцінити шляхом виявлення та кількісного аналізу хімічно змінених форм білка. Хімічна зміна може охоплювати змінення розміру (наприклад, усичення), які можуть бути оцінені з допомогою, наприклад, ексклюзійної хроматографії, електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) та/або матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації/мас-спектрометрії з часом прольоту (MALDI/TOF MS). Інші типи хімічних змінень охоплюють змінення заряду (наприклад, що виникають внаслідок дезамідування), які можуть бути оцінені, наприклад, з допомогою іонообмінної хроматографії або капілярного електрофорезу та ізоелектричного фокусування (cIEF).

40

45

[00185] Антитіло "зберігає свою біологічну активність" у композиції, якщо біологічна активність антитіла у даний момент часу дорівнює, наприклад, приблизно 50-150% (у межах похибки аналізу) від біологічної активності, яку спостерігали при отриманні композиції, як визначено, наприклад, шляхом аналізу зв'язування антигену. Інші аналізи "біологічної активності" для антитіл висвітлені нижче.

50

[00186] Щодо стійкості композиції протягом часу, то принаймні 95% анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагменту може бути присутніми у вигляді мономерів після принаймні приблизно 12-місячного зберігання при температурі приблизно 2-8°C, як було виміряно шляхом ексклюзійної хроматографії (SEC). Також тут передбачено застосування додаткових визначень у цій галузі способів оцінки стійкості, охоплюючи, але без обмеження, способи, описані у Прикладах.

55

[00187] Додатково анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент може демонструвати приблизно 50-150% зв'язування при вимірюванні шляхом ІФА-аналізу зв'язування CD105 після їх зберігання з температурою приблизно 2-8 °C протягом принаймні

60

приблизно 12 місяців.

[00188] Середня ізоелектрична точка (pI) анти-CD105 антитіла після його зберігання з температурою приблизно 2-8 °C протягом принаймні приблизно 12 місяців може дорівнювати приблизно 8.8-9.2, як було виміряно шляхом, наприклад, капілярного електрофорезу та ізоелектричного фокусування.

[00189] Зрозуміло, що анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент може зберігати стійкість протягом принаймні приблизно 12 місяців, принаймні приблизно 18 місяців, принаймні приблизно 24 місяців, принаймні приблизно 30 місяців, принаймні приблизно 36 місяців або ще більше.

[00190] Композиція може містити принаймні 95% анти-CD105 антитіла у вигляді мономеру, як було виміряно шляхом SEC після циклів заморожування та відтавання композиції. Альтернативним або додатковим чином композиція може містити принаймні 95% анти-CD105 антитіла у вигляді мономеру, як було виміряно шляхом SEC зі струшуванням композиції.

[00191] Анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент може містити будь-яку послідовність, CDR-ділянки у складі якої є здатними до зв'язування з CD105. У одному необмеженому втіленні анти-CD105 антитілом є TRC105, яке містить змінну ділянку легкого ланцюга (VL), що має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 1; сталу ділянку легкого ланцюга (CL), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 2; змінну ділянку важкого ланцюга (VH), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 3; та сталу ділянку (Fc), яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 4.

[00192] У іншому необмеженому втіленні анти-CD105 антитіло містить ділянку VL CDR1, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 5; VL CDR2, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 6; VL CDR3, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 7; VH CDR1, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 8; VH CDR2, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 9; та VH CDR3, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 10.

[00193] Композиція може містити приблизно 1-150 мг/мл анти-CD105 антитіл або їх антиген-зв'язуючих фрагментів або будь-яку їх кількість (включаючи, але без обмеження, приблизно 2 мг/мл, приблизно 5 мг/мл, приблизно 7.5 мг/мл, приблизно 10 мг/мл, 20 мг/мл, приблизно 25 мг/мл, приблизно 30 мг/мл, приблизно 35 мг/мл, приблизно 40 мг/мл, приблизно 45 мг/мл, приблизно 50 мг/мл, приблизно 55 мг/мл, приблизно 60 мг/мл, приблизно 65 мг/мл, приблизно 70 мг/мл, приблизно 75 мг/мл, приблизно 80 мг/мл, приблизно 85 мг/мл, приблизно 90 мг/мл, приблизно 95 мг/мл, приблизно 100 мг/мл, приблизно 105 мг/мл, приблизно 110 мг/мл, приблизно 115 мг/мл, приблизно 120 мг/мл, приблизно 125 мг/мл, приблизно 130 мг/мл, приблизно 135 мг/мл, приблизно 140 мг/мл, приблизно 145 мг/мл, приблизно 150 мг/мл або більше або вона може дорівнювати будь-якому цілому числу, яке існує між цими значеннями. Як тут застосовано відносно до концентрацій антитіла, термін "приблизно" означає $\pm 2\%$ вказаного значення.

[00194] У одному втіленні композиція містить приблизно 25 мг/мл анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента. У іншому втіленні композиція містить приблизно 50 мг/мл анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента. У іншому втіленні композиція містить приблизно 100 мг/мл анти-CD105 антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента.

[00195] Як тут описано, композиції можуть містити буферизуючий агент, як-то, наприклад, гістидин, ацетат, цитрат або фосфат. Буферизуючі агенти можуть бути включені у кількості приблизно 5-100 мМ. У одному втіленні композиція містить приблизно 5 мМ, приблизно 7.5 мМ, приблизно 10 мМ, приблизно 12.5 мМ, приблизно 15 мМ, приблизно 17.5 мМ, приблизно 20 мМ, приблизно 22.5 мМ, приблизно 25 мМ, приблизно 30 мМ, приблизно 35 мМ, приблизно 40 мМ, приблизно 45 мМ, приблизно 50 мМ, приблизно 55 мМ, приблизно 60 мМ, приблизно 65 мМ, приблизно 70 мМ, приблизно 75 мМ, приблизно 80 мМ, приблизно 85 мМ, приблизно 90 мМ, приблизно 95 мМ або приблизно 100 мМ гістидину, ацетату, цитрату або фосфату або ця концентрація може дорівнювати будь-якому цілому числу, яке існує між цими значеннями. Як тут застосовано відносно до концентрацій буферу, термін "приблизно" означає $\pm 2\%$ вказаного значення.

[00196] Композиції можуть бути отримані для будь-якого відомого для антитіл типу введення, включаючи, але без обмеження, введення у скловидне тіло та внутрішньовенне введення.

[00197] Створені тут композиції можуть додатково містити прийнятний носій або наповнювач, включаючи будь-який носій або наповнювач, який є фармацевтично прийнятним та прийнятним для введення пацієнту.

[00198] У одному втіленні передбачена тут композиція є ізотонічною. Типові ізотонічні

композиції охоплюють, але без обмеження, композиції з осмотичним тиском приблизно у 250-350 мОсм. У іншому втіленні передбачена тут композиція є гіпертонічною. Типові гіпертонічні композиції охоплюють, але без обмеження, композиції з осмотичним тиском приблизно у 351-1000 мОсм.

5 [00199] До описаної тут композиції також можуть бути додані поліоли з концентрацією до 1 М. Наприклад композиція може містити поліол з концентрацією приблизно 50 мМ, приблизно 75 мМ, приблизно 100 мМ, приблизно 150 мМ, приблизно 200 мМ, приблизно 225 мМ, приблизно 240 мМ, приблизно 250 мМ, приблизно 300 мМ, приблизно 350 мМ, приблизно 400 мМ, 10 приблизно 450 мМ, приблизно 500 мМ, приблизно 550 мМ, приблизно 600 мМ, приблизно 650 мМ, приблизно 700 мМ, приблизно 750 мМ, приблизно 800 мМ, приблизно 850 мМ, приблизно 900 мМ, приблизно 950 мМ, приблизно 1 М або з концентрацією, яка дорівнює будь-якому цілому числу, яке існує між цими значеннями. У одному втіленні передбачена тут композиція містить поліол у кількості, меншій, ніж 300 мМ та композицію отримують в ізотонічному стані з 15 сіллю з концентрацією приблизно 100 мМ - 175 мМ. Наприклад, композицію, яка містить поліол у кількості, меншій, ніж 300 мМ отримують в ізотонічному стані з сіллю з концентрацією приблизно 130 мМ. Як тут застосовано відносно до концентрацій поліолу, термін "приблизно" означає $\pm 2\%$ вказаної кількості. У одному аспекті, поліол для застосування у передбачених тут композиціях може бути цукром, як-то, наприклад, невідновлюючим цукром. Типові приклади невідновлюючих цукрів охоплюють, але без обмеження, трегалозу та цукрозу. 20 композиція може містити приблизно 200 мМ - 300 мМ трегалози або цукрози. У одному втіленні композиція може містити приблизно 240 мМ трегалози або цукрози. Альтернативним чином, цукор може бути сорбітом у кількості (концентрації) приблизно 200 мМ - 300 мМ. У одному втіленні композиція може містити приблизно 240 мМ сорбіту.

25 [00200] Додаткові необмежені приклади передбаченої тут композиції є будь-якими з композицій 1-39, наведених у Таблиці 1.

Таблиця 1

Композиція №.	pH	Фосфат (мМ)	Гістидин (мМ)	Цитрат (мМ)	Ацетат (мМ)	NaCl (мМ)	Трегалоза (мМ)	Сорбіт	Білок мг/мл
F01	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F02	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F03	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F04	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F05	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F06	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F07	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F08	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F09	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F10	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F11	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F12	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F13	6	0	10	0	0	0	240	0	25
F14	6	10	0	0	0	80	120	0	25
F15	6	0	10	0	0	80	120	0	25
F16	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F17	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F18	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F19	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F20	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F21	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F22	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F23	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F24	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F25	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F26	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F27	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F28	6	0	10	0	0	0	240	0	50

Таблиця 1

Композиція №.	pH	Фосфат (мМ)	Гістидин (мМ)	Цитрат (мМ)	Ацетат (мМ)	NaCl (мМ)	Трегалоза (мМ)	Сорбіт	Білок мг/мл
F29	6	10	0	0	0	80	120	0	50
F30	6	0	10	0	0	80	120	0	50
F31	7	17	0	0	0	145	0	0	5
F32	7	17	0	0	0	145	0	0	7
F33	5.5	0	20	0	0	0	240	0	25
F34	5.5	0	20	0	0	0	0	240	25
F35	4	0	0	0	20	0	0	240	25
F36	5.5	0	20	0	0	0	240	0	50
F37	4	0	0	0	20	0	240	0	50
F38	5.5	0	20	0	0	0	240	0	100
F39	4	0	0	0	20	0	240	0	100

Фосфат. - фосфатно-сольовий буфер;

5 [00201] Передбачена тут композиція може мати pH приблизно 4,0-7,5. У одному втіленні передбачена тут композиція може мати pH приблизно 4,5, приблизно 5,0, приблизно 5,5, приблизно 6,0, приблизно 6,5 або приблизно 7,0. Як тут застосовано по відношенню до pH, термін "приблизно" стосується значень $pH \pm 0.05$, 0,1 або 0,2.

10 [00202] Зрозуміло, що композиції, які містять антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти, визначені з допомогою описаних тут способів можуть бути підготовлені для зберігання шляхом змішування білка, який має бажаний ступінь чистоти з вибілковими фізіологічно прийнятними носіями, наповнювачами та/або стабілізаторами у вигляді водних розчинів (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)).

15 [00203] Прийнятні носії є фізіологічно прийнятними для введення пацієнту та зберігають терапевтичні властивості сполук, з якими/у які їх вводять. Прийнятні носії та їх композиції звичайно описані у, наприклад, Remington's pharmaceutical Sciences (18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990). Одним зі зразкових носіїв є фізіологічний сольовий розчин. Фраза "фармацевтично прийнятний носій", як тут застосовано, означає прийнятний матеріал, композицію або засіб доставки, як-то рідкий або твердий наповнювач, розріджувач, 20 допоміжну речовину та/або розчинник, залучений до перенесення або до транспортування сполук суб'єкта з розташованого на одному органі або частині тіла місця введення до іншого органу або частини тіла. Кожен носій повинен бути прийнятним у сенсі сумісності з іншими інгредієнтами композиції та нешкідливим для суб'єкта, якому його вводять. Прийнятний носій не повинен змінювати специфічну активність сполук суб'єкту.

25 [00204] У одному аспекті створені фармацевтично прийнятні або фізіологічно прийнятні та сумісні з введенням композиції, які містять розчинники (водні або неводні), розчини, емульсії, дисперсні середовища, оболонки, ізотонічні агенти та агенти, які сприяють абсорбції або затримують її. Отже, композиції або препарати є композиціями, прийнятними для терапевтичного та/або діагностичного застосування у суб'єкті. Композиції та препарати містять певну кількість описаної тут сполуки та фармацевтично або фізіологічно прийнятного носія.

30 [00205] Композиції можуть бути отримані таким чином, щоб бути сумісними з певним шляхом введення (тобто системним або місцевим). Отже, композиції містять прийнятні для введення різними шляхами носії, розріджувачі або наповнювачі.

35 [00206] Композиції можуть бути введені, наприклад, шляхом ін'єкції, включаючи, але без обмеження, підшкірне введення, введення у скловидне тіло, внутрішньошкірне, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або внутрішньом'язове ін'єкційне введення. Також до складу композиції можуть бути включені ізотонічні агенти, як-то цукри, багатоатомні спирти, як-то як маніт та сорбіт, а також хлорид натрію. Отримані розчини можуть бути упаковані для застосування як є або у ліофілізованому вигляді та у цьому разі така ліофілізована композиція потім перед введенням може бути об'єднаною зі стерильним 40 розчином. Для внутрішньовенної ін'єкції або ін'єкції у місце ураження активний інгредієнт може знаходитися у формі парентерально прийнятного водного розчину, який є апірогенним та має прийнятний pH, ізотонічність та стійкість. Будь-які кваліфіковані фахівці у цій галузі цілком здатні отримати відповідні розчини з застосуванням, наприклад, прийнятних для ін'єкції ізотонічних носіїв, як-то хлорид натрію, розчин Рингера або лактований розчин Рингера. У разі необхідності 45 ці розчини також можуть містити консерванти, стабілізатори, буфери, антиоксиданти та/або інші

домішки. Стерильні прийнятні для ін'єкційного введення розчини можуть бути отримані шляхом поєднання активного інгредієнта у потрібній кількості у прийнятному розчиннику з одним з перелічених вище інгредієнтів або з комбінацією таких інгредієнтів з наступною стерилізацією шляхом фільтрування.

5 [00207] У одному втіленні описана тут композиція не містить поверхнево-активних речовин. У іншому втіленні описана тут композиція вибірково містить поверхнево-активні речовини, як-то, наприклад, полісорбат 20 або 80, TWEEN®, PLURONIC® F68 або поліетиленгліколь (ПЕГ).

10 [00208] Якщо композиції розглядають для застосування у складі лікарських композицій або у будь-яких з описаних тут способів, то передбачається, що вони можуть бути суттєво апірогенними та при введенні пацієнту-людині вони не будуть викликати запальних або небажаних алергічних реакцій. Перевірка композицій на пірогени та отримання суттєво апірогенних композицій є добре відомими для пересічних фахівців у цій галузі процедурами та вони можуть бути здійснені з застосуванням наявних у продажу наборів.

15 [00209] Фраза "фармацевтично прийнятний" має відношення до молекулярних об'єктів та композицій, які є фізіологічно толерантними та звичайно при введенні суб'єкту не спричиняють алергічних або подібних несприятливих реакцій, як-то розлад шлунку, запаморочення тощо.

20 [00210] Термін "одиниця дози" при застосуванні по відношенню до терапевтичної композиції має відношення до фізично різних одиниць, прийнятних у якості унітарного дозування для суб'єктів, де кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активного матеріалу, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту у поєднанні з потрібним розріджувачем; тобто носієм або засобом доставки.

25 [00211] Композиції можна вводити сумісним з лікарським способом та в терапевтично ефективній кількості. Кількість, яку треба вводити залежить від суб'єкта, який підлягає лікуванню, здатності імунної системи суб'єкта застосовувати активний інгредієнт та від ступеня бажаної зв'язувальної здатності. Точні необхідні для введення кількості активного інгредієнта залежать від розсуду лікаря та є індивідуальними для кожної людини. Прийнятні схеми первісного введення та бустерних доз також варіюють, але є типізованими у вигляді початкового введення з наступними повторними дозами з одним або кількома годинними інтервалами з наступною ін'єкцією або іншим типом введення. Крім того, також розглядаються безперервні внутрішньовенні вливання, достатні для підтримки концентрації в крові.

30 [00212] Одним втіленням передбачено застосування описаної тут композиції для отримання лікарського засобу для лікування описаного тут розладу або стану. Лікарські засоби можуть бути сформульовані на основі фізичних характеристик пацієнта/суб'єкта, який потребує лікування та можуть бути отримані у вигляді одного або кількох композицій у залежності від стадії стану, захворювання або розладу. Лікарські засоби можуть бути запакованими у прийнятне пакування з відповідним маркуванням для розподілення по лікарням та клінікам з показаннями по лікуванню суб'єкту, який має описане тут захворювання. Лікарські засоби можуть бути запакованими у вигляді однієї або кількох одиниць.

40 [00213] Також заявленим винаходом передбачено попередньо наповнений шприц, прийнятний для внутрішньовенного введення або введення у скловидне тіло, який містить описаний тут композиція. Такі попередньо заповнені шприці також можуть бути запаковані та помічені маркуванням для застосування у лікуванні пов'язаного з ангіогенезом стану, як-то будь-який з описаних тут станів. Додатково пакування цих композицій може містити інструкції по зберіганню та застосуванню. Заявленим винаходом передбачено пакування, яке містить один або декілька попередньо заповнених шприців, прийнятних для внутрішньовенного введення або введення у скловидне введення, що містять композиція за будь-яким з попередніх пунктів. Також заявленим винаходом передбачено отримання лікарського засобу, який містить описану тут композицію для лікування стану, пов'язаного з ангіогенезом, як-то будь-якого з описаних тут станів.

50 Способи лікування.

[00214] Заявленим винаходом передбачено спосіб лікування суб'єкта (людини або іншої живої істоти) шляхом введення суб'єкту композиції антитіл, які переважним чином зв'язуються з CD105. Також створені способи запобігання або лікування одного або декількох захворювань або розладів, пов'язаних з ангіогенезом/неоваскуляризацією, надмірною васкуляризацією, ростом пухлин, розповсюдженням пухлинних клітин або розвитком малих судин, який полягає у веденні композиції, що містить анти-CD105 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, тим самим забезпечуючи запобігання, лікування, пом'якшення або послаблення перебігу або тяжкості захворювання.

60 [00215] Ефективної відповіді за заявленим винаходом досягають, коли суб'єкт відчуває затримку або часткове або повне полегшення або зменшення ознак або симптомів хвороби та

вона специфічно охоплює, без обмеження, подовження періоду виживання. Очікуваний період виживання без випадків прогресування захворювання може бути вимірним у вигляді місяців або років у залежності від прогностичних факторів, які охоплюють кількість рецидивів захворювання, стадію захворювання та інші фактори. Пролонговане виживання охоплює, без обмеження, час, який сягає принаймні 1 місяць, приблизно принаймні 2 місяці, приблизно принаймні 3 місяці, приблизно принаймні 4 місяці, приблизно принаймні 6 місяців, приблизно принаймні 1 рік, приблизно принаймні 2 роки, приблизно принаймні 3 роки, приблизно принаймні 4 роки, приблизно принаймні 5 років тощо або будь-який інтервал між ними. Загальне виживання або виживання без випадків прогресування захворювання може бути також виміряно строком від місяців до років. Альтернативним чином, ефективною відповіддю може бути така, при якій ознаки або симптоми суб'єкта або маса злоякісних пухлин залишаються незмінними та не погіршуються. Додатково показання до лікування більш детально описані нижче.

[00216] Композиції описаних тут антитіл можуть бути застосовані у якості нетерапевтичних агентів (наприклад, у якості агентів афінної очистки). Звичайно, у одному такому втіленні інтересуючий білок з допомогою стандартних відомих у цій галузі способів іммобілізують на твердому носії, як-то смола Sephadex® або фільтрувальний папір та такий іммобілізований білок контактує зі зразком, що містить інтересуючу речовину (або її фрагмент) для його очищення, після чого підтримуючий носій промивають прийнятним розчинником, який усуває суттєво весь сторонній матеріал у зразку за виключенням білка-мішені, який є зв'язаним з іммобілізованим антитілом. Зрештою підтримуючий носій промивають іншим прийнятним розчинником, як-то гліциновим буфером, pH 5.0, який вивільнює цільовий білок. Додатково, крім очищення, композиції можуть бути застосовані для визначення, діагностики та терапії пов'язаних з CD105 захворювань та розладів.

[00217] Визначений тут термін "контактування" означає засоби залучення композиції, як тут передбачено, до фізичної близькості з клітиною, органом, тканиною або рідиною, як тут описано. Контактування охоплює системні або місцеві введення будь-якої з передбачених тут композицій та також охоплює, але без обмеження, процедури та способи *in vitro*, *in vivo* та/або *ex vivo*. "Комбінування" та "контактування" тут застосовані взаємозамінне та покликані бути визначені таким саме чином. Для застосувань *in vivo* контактування може відбуватися, наприклад, шляхом введення композиції пацієнту будь-як прийнятним способом. Композиції з фармацевтично прийнятними наповнювачами та носіями більш детально описані вище.

[00218] Як тут застосовано, "запобігання" має відношення до профілактики, запобігання перебігу ознак або симптомів, запобігання прогресування захворювання або розладу, пов'язаного з ангіогенезом або розладу, який корелює з активністю CD105. У одному необмеженому втіленні пацієнтам з діагнозом першої стадії раку може бути введено описану тут композицію, тим самим запобігаючи розвитку другої стадії раку. У ще іншому втіленні описана тут композиція може бути введеною пацієнту, який не має симптомів, але є тест-позитивним на один з біомаркерів раку, тим самим запобігаючи розвитку цієї хвороби. Як тут застосовано, терміни "пригнічення" та "лікування" тут застосовують взаємозамінне та вони означають, наприклад, затримку розвитку ознак або симптомів, пролонгування виживання, часткове або повне покращення ознак або симптомів та часткове або повне усунення пухлин або метастазів.

[00219] "Суб'єкт" або "пацієнт" (наприклад, ссавець, як-то людина або тварина, яка не є людиною, як-то примати, гризуни, корови, коні, свині, вівці, верблюда, лами тощо.) може бути ссавцем, який демонструє один або декілька клінічних проявів та/або ознак або симптомів описаного тут захворювання або розладу. У певних випадках суб'єкт може бути безсимптомним та все-таки мати клінічні прояви захворювання або розладу. Антитіло може бути кон'юговано до терапевтично функціональної групи або бути злитим білком, який містить терапевтично функціональну групу. Також антитіло може бути кон'юговано до прийнятної для визначення функціональної групи або бути злитим білком, який містить прийнятну для визначення функціональної групи. У одному втіленні антитіло може бути кон'юговано як до терапевтичної функціональної групи, так і до прийнятної для визначення функціональної групи. Антитіло може бути кон'юговано до афінної мітки або рекомбінантним чином побудовано разом з нею (наприклад, з міткою очистки). Афінні мітки є стандартними у цій галузі.

[00220] Створені тут антитіла або їх фрагменти є такими, що вони можуть бути кон'юговані або приєднані до терапевтичної функціональної групи та/або здатної до візуалізації або прийнятної для визначення функціональної групи та/або до афінної мітки. Способи кон'югації або зв'язування поліпептидів є добре відомі у цій галузі. Асоціації (зв'язування) між сполуками та мітками охоплює будь-які відомі у цій галузі засоби, як-то, але без обмеження, ковалентні та не ковалентні взаємодії, хімічну кон'югацію, а також рекомбінантні способи.

[00221] Застосований тут термін "ангіогенез" охоплює всі аспекти підтримки та розвитку

кровоносних судин. Отже, ангиогенез охоплює утворення нових капілярних кровоносних судин (або de novo або з попередньо існуючих судин), яке веде до неоваскуляризації, а також підтримання та контроль існуючої судинної системи та малих кровоносних судин. Ангіогенез є комплексним процесом, який полягає у серії послідовних кроків, включаючи ендотеліальну клітинно-опосередковану деградацію судинної базальної мембрани та інтерстиціальних матриць, міграцію ендотеліальних клітин, проліферацію ендотеліальних клітин та утворення ендотеліальними клітинами капілярних петель. Ангіогенез також охоплює ріст та/або розвиток нових кровоносних судин (також позначених, як неоваскуляризація), розповсюдження малих судин, надлишковий або подовжений ріст судин та підтримання існуючої судинної системи.

[00222] Застосований тут термін “захворювання, пов’язане з ангиогенезом” означає певні патологічні процеси у людини з аномальною пролонгацією ангиогенезу. Також цей термін охоплює ангиогенезні стани та захворювання, як-то захворювання та стани, які мають відношення до ангиогенезу, викликані ангиогенезом або пов’язані з ангиогенезом. Необмежені приклади таких захворювань охоплюють різні форми раку та метастазів, дегенерацію жовтої плями та хороїдальну неоваскуляризацію. Описані тут антитіла можуть бути застосовані для лікування захворювання, пов’язаного з ангиогенезом шляхом зв’язування CD105 та пригнічення ангиогенезу.

[00223] Застосований тут термін “анти-ангіогенна терапія” означає терапію, спрямовану до клітин та/або судинної системи, в якій відбувається експресія CD105 (підвищені рівні експресії у проліферативній судинній системі порівняно до судинної системи у стані спокою); та додатково охоплює терапію, яка є спрямованою проти ангиогенезу (тобто проти утворення нових капілярних кровоносних судин, яке веде до неоваскуляризації), терапію, яка є спрямованою проти існуючої судинної системи та/або надмірної васкуляризації або росту кровоносних судин, терапії, яка спрямована проти розповсюдження малих судин та терапії, яка спрямована до захворювання або стану (наприклад, судинно-спрямована терапія). Зразкові захворювання або стани, створені межами винаходу охоплюють, але без обмеження, різні форми раку та метастазів.

[00224] Заявленим винаходом передбачено спосіб лікування захворювання, пов’язаного з ангиогенезом у пацієнта (суб’єкта), який потребує такого лікування, який полягає у введенні зазначеному пацієнту описаної тут композиції. Такі композиції можуть бути введені пацієнту шляхом введення у складне тіло або внутрішньовенно.

[00225] Описані тут захворювання, пов’язані з ангиогенезом можуть бути, наприклад, раком або метастазами. У одному втіленні рак є твердою пухлиною. Захворювання на рак, які підлягають лікуванню охоплюють, наприклад, пухлини на основі епітеліальної тканини. Необмежені приклади захворювань на рак, які підлягають лікуванню зазначеними композиціями охоплюють, але без обмеження, рак легенів, гінекологічні злоякісні новоутворення, меланому, рак молочної залози, підшлункової залози, рак яєчників, рак матки, колоректальний рак, рак передміхурової залози, рак нирки, рак голови, рак підшлункової залози, рак печінки (гепатоцелюлярний рак), раку матки, рак шиї, рак нирки (рак ниркових клітин), саркому, мієлому та лейкози. Сполуки для лікування раку або метастазів можуть бути введені пацієнту внутрішньовенно.

[00226] Альтернативним чином, описане тут пов’язане з ангиогенезом захворювання може бути, наприклад, офтальмологічним станом. Офтальмологічні стани охоплюють, але без обмеження, вікову макулодистрофію, діабетичну ретинопатію, макулярний набряк та/або хороїдальну неоваскуляризацію. Вікова макулодистрофія (ВМД) може бути сухою та вологою. Композиції для лікування офтальмологічного стану можуть бути введені пацієнту шляхом введення у складне тіло.

[00227] З допомогою таких способів композиція може бути введена пацієнту один або кілька разів. Наприклад, композиція може бути введена пацієнту раз на добу, раз на тиждень, раз на місяць, раз на два місяці, раз на кожні два місяці, раз на кожні три місяці, раз на кожні чотири місяці, раз на кожні 5 місяців або раз на кожні 6 місяців. Якщо це потрібно, то схеми лікування можуть бути підсилені або полегшені у залежності від відповіді пацієнта на лікування.

[00228] У одному аспекті композицію вводять до зменшення однієї або декілька ознак або симптомів захворювання, пов’язаного з ангиогенезом.

[00229] Щодо офтальмологічних станів, то одна або декілька ознак або симптомів можуть охоплювати, але без обмеження, скорочення кровоносних судин, пригнічення проліферації ендотеліальних клітин, пов’язаної з офтальмологічним захворюванням, усунення ознак або симптомів кровотечі, лікування замутного зору, досягнення затримки втрати зору, покращення зору та/або запобігання витоку крізь кровоносні судини.

[00230] Відносно раку або метастазів, то лікування може привести до покращення стану

пацієнта та може бути оцінено шляхом визначення наявності одного або кількох наступних факторів, як-то зменшення клітинної проліферації, зменшення кількостей клітин, підвищення апоптозу або зниження виживання принаймні частини клітин, що містить клітинний проліферативний розлад.

5 [00231] Лікування може привести до часткового або загального усунення пухлин або метастазів та/або до пролонгації виживання пацієнта.

[00232] У одному втіленні тяжкість або тривалість перебігу однієї або кількох ознак або симптомів після введення пацієнту однієї або декількох доз композиції зменшується приблизно на 2%, приблизно на 5%, приблизно на 10%, приблизно на 15%, приблизно на 20%, приблизно на 25%, приблизно на 30%, приблизно на 35%, приблизно на 40%, приблизно на 45%,
10 приблизно на 50%, приблизно на 55%, приблизно на 60%, приблизно на 65%, приблизно на 70%, приблизно на 75%, приблизно на 80%, приблизно на 90%, приблизно на 95% або приблизно на 100%.

[00233] У одному втіленні тяжкість або тривалість перебігу однієї або кількох ознак або симптомів після введення пацієнту однієї або декількох доз композиції зменшується приблизно у 2 рази, приблизно у 5 разів, приблизно у 10 разів, приблизно у 15 разів, приблизно у 20 разів, приблизно у 25 разів, приблизно у 30 разів, приблизно у 35 разів, приблизно у 40 разів, приблизно у 45 разів, приблизно у 50 разів, приблизно у 55 разів, приблизно у 60 разів, приблизно у 65 разів, приблизно у 70 разів, приблизно у 75 разів, приблизно у 80 разів,
15 приблизно у 90 разів, приблизно у 95 разів, приблизно у 100 разів або ще більше.

[00234] Заявленим винаходом передбачено спосіб лікування офтальмологічного стану у пацієнта, який того потребує, який полягає у введенні зазначеному пацієнту описаної тут композиції, в результаті чого одна або декілька ознак або симптомів зазначеного офтальмологічного стану покращується шляхом лікування. Введення композиції може бути введенням у скловидне тіло.
20

[00235] Також заявленим винаходом передбачено спосіб запобігання або лікування раку або метастазів у суб'єкта, який цього потребує, який полягає у введенні зазначеному пацієнту описаної тут композиції, в результаті чого покращується одна або декілька ознак або симптомів зазначеного раку або метастазів. Введення композиції може бути внутрішньовенним.

30 [00236] Терміни "рецидив," "загострення" або "рецидивний" мають відношення до повернення раку або іншої хвороби після клінічного визначення її зникнення. Діагностику віддалених метастазів або місцевого рецидиву можна також вважати рецидивом.

[00237] Термін "підтримуюча терапія" має відношення до запланованого повторного лікування, яке здійснюють для того, щоб допомогти підтримати попередньо досягнуті лікувальні ефекти. Підтримуючу терапію часто здійснюють для того, щоб допомогти зберегти рак на стадії ремісії або для подовження відповіді на специфічну терапію незалежно від прогресування захворювання.
35

[00238] Термін "виживання без прогресування хвороби" у онкології стосується тривалості часу протягом та після лікування, під час якого не відбувається розвитку раку. Виживання без прогресування хвороби охоплює строк, за який пацієнти отримали повну або часткову відповідь, а також строк, за який пацієнти набули стабілізації стану захворювання.
40

[00239] У одному аспекті заявленим винаходом передбачено спосіб запобігання або лікування раку або метастазів у суб'єкта шляхом введення будь-якої передбаченої тут композиції пацієнту, який страждає від раку або метастазів. Такий пацієнт може мати симптоматичний перебіг хвороби або бути безсимптомним.
45

[00240] У деяких випадках, введення композиції подовжує життя пацієнта, підданого лікуванню, зменшує об'єм пухлин, усуває пухлини, зменшує клітинну проліферацію, підвищує апоптоз пухлинних клітин або їх комбінації.

[00241] Якщо це потрібно, способи можуть додатково полягати у хірургічному усуненні раку та/або у введенні додаткового протиракового агенту або у запровадженні відповідного лікування. Протиракові засоби надані тут у іншому місці.
50

[00242] У одному аспекті виникає покращення ознак або симптомів пацієнта, який страждає на рак. Таке покращення може проявлятися у вигляді, наприклад, зменшення болю, зменшення розміру пухлин, усунення пухлин, запобігання збільшення розміру пухлин або розвитку захворювання, запобігання утворення метастазів або пригнічення росту метастазів або у вигляді комбінацій цих ознак.
55

[00243] У одному аспекті, введення описаної тут композиції зменшує або усуває потребу у хірургічній операції або у лікуванні з одним або декількома додатковими протираковими агентами або способами лікування.

60 [00244] Композиції, які містять анти-CD105 антитіла можуть бути введені послідовно або

одночасно з композицією, яка містить анти-VEGF антитіла (або їх антиген-зв'язуючі фрагменти). Такі введення охоплюють, але без обмеження, введення з приблизним 12-тижневим інтервалом, введення з приблизним 8-тижневим інтервалом, введення з приблизним 4-тижневим інтервалом, введення з приблизним 3-тижневим інтервалом, введення з приблизним 2-тижневим інтервалом, введення з приблизним 1-тижневим інтервалом, введення з приблизним 24-годинним інтервалом, введення з приблизним 12-годинним інтервалом, введення з приблизним 6-годинним інтервалом, введення з приблизним 3-годинним інтервалом, введення з приблизним 1-годинним інтервалом, введення з приблизним 30-хвилинним інтервалом, введення в той же день, в той же час або їх комбінації. Слід також розуміти, що коли передбачено застосування багатьох доз композиції заявленого винаходу та/або комбінованої терапевтичної функціональної групи, то кожна з доз можна буде емпірично визначити з застосуванням відомих доз та концентрацій на основі віку, росту, ваги, стану здоров'я та інших фізичних характеристик суб'єкта з застосуванням стандартів наявних у продажу продуктів.

[00245] Композиції можуть бути введені пацієнту у терапевтично ефективній кількості, яка є ефективною для отримання певного бажаного терапевтичного ефекту шляхом пригнічення захворювання або розладу з розумним співвідношенням користі до ризику, яке можна застосувати до будь-якого способу лікування. Для введення пацієнту-людині зазначених композицій, ці композиції можуть бути отримані з застосуванням відомих фахівцям у цій галузі способів. Терапевтично ефективна кількість є кількістю, яка дозволяє досягти принаймні часткового бажаного терапевтичного або профілактичного ефекту у органі або тканині. Кількість анти-CD105 антитіл або анти-VEGF антитіл, необхідних для запобігання та/або терапевтичного лікування захворювання або розладу не є суттєво фіксованою. Кількість введених антитіл може змінюватися з типом та екстенсивністю захворювання та розмірами ураженого цим захворюванням або розладом ссавця. Описані тут антитіла вводять пацієнту у комбінації, як описано вище. Введення у комбінації може мати відношення до введення у вигляді одиничної композиції або окремих композицій.

[00246] Під "введенням" тут мається на увазі надання пацієнту одного або кількох композицій таким чином, що веде до проникнення композиції у організм пацієнта. Таке введення може бути здійснено будь-яким шляхом, включаючи, без обмеження, місцеве, регіональне або системне введення підшкірним, внутрішньошкірним, внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, внутрішньочеревним, внутрішньом'язовим шляхом або може бути введенням у скловидне тіло (наприклад, шляхом ін'єкції).

[00247] Актуальні рівні дозування активних інгредієнтів у композиціях можна варіювати таким чином, щоб отримати кількість активного інгредієнта, яка буде ефективною для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для певного пацієнта, композиції та способу введення без токсичного впливу на цього пацієнта. Обраний рівень дозування буде залежати від безлічі факторів, які охоплюють активність певної застосованої сполуки, способів введення, час введення, швидкість екскреції певної застосованої сполуки, тривалість лікування, інші лікарські засоби, сполуки та/або матеріали, які застосовують в комбінації з певним композиціями, вік, стать, вагу, загальний стан здоров'я та попередню історію хвороби пацієнта, який підлягає лікуванню та від подібних факторів, добре відомих в медичній галузі.

[00248] Додатково, доза(доза) антитіл може бути введена двічі на тиждень, щотижнево, кожні 2 тижні, кожні 3 тижні кожні 4 тижні, кожні 6 тижнів, кожні 8 тижнів, кожні 12 тижнів, кожні 24 тижні або з будь-якими зазначеними тут тижневими комбінаціями. Також створені цикли дозування, як-то, наприклад, введення антитіл раз або два рази на тиждень протягом 2, 3, 4, 5 або 6 тижнів з наступними 1, 2, 3, 4, 5 або 6 тижнями без терапії. Альтернативним чином, в залежності від відповіді суб'єкта на терапію, час циклу між лікуваннями може дорівнювати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 місяців. Також винаходом створені додаткові цикли дозування, які охоплюють, наприклад, різні комбінації доз та описані тут тижневі цикли.

[00249] Лікар або ветеринар може легко визначити та призначити ефективну кількість (ED50) потрібної композиції. Лікар або ветеринар, наприклад, може починати з доз, застосованих у композиції з рівнями, які є нижчими, ніж це потрібно з метою досягнення бажаного терапевтичного ефекту та послідовно підвищувати дозування до досягнення бажаного ефекту. Альтернативним чином, доза може залишатися постійною.

[00250] Композиції можуть бути введені пацієнту будь-яким прийнятним шляхом, як-то описано вище. Незалежно від обраного шляху введення, сполуки даного винаходу, які можуть бути застосовані у прийнятній гідратованій формі, та/або композиції отримують у вигляді прийнятних лікарських форм, таких як описано нижче або іншими стандартними способами, відомими у цій галузі.

[00251] Для отримання ряду дозувань для застосування до людини можуть бути застосовані результати аналізів клітинної культури та/або досліджень з тваринами. Дозування у цьому діапазоні може змінюватися у залежності від застосованої лікарської форми та застосованого шляху введення. Терапевтично ефективну дозу для будь-якої сполуки можна спочатку дослідити з допомогою аналізів з застосуванням клітинних культур. Для досягнення концентрації циркулювання у плазмі крові, яка включає величину IC_{50} (тобто концентрацію досліджуваної сполуки, яка досягає напівмаксимального пригнічення), як визначено у клітинній культурі, можна отримати відповідні дози з допомогою тваринних моделей. Рівні сполуки у плазмі крові можуть бути виміряні, наприклад, шляхом ВЕРХ-хроматографії. Таку інформацію можна застосувати для більше точного визначення корисних доз для людини. Композиції, які містять комбінації сполук також можуть бути досліджені з застосуванням будь-якого з цих способів.

[00252] У одному втіленні винаходом передбачено пригнічення ангіогенезу у тканині. Ступінь ангіогенезу у тканині та, отже, ступінь досягнутого пригнічення можна оцінити з допомогою різних способів, як-то описаних тут.

[00253] Унікальна специфічність антитіл, які впізнають (наприклад, переважно зв'язують) CD105 або VEGF та пригнічують ангіогенез передбачає їх діагностичні та терапевтичні застосування у захворюваннях, які відрізняються наявністю ангіогенезу, (неоваскуляризації), дилатацією малих судин, надлишковою васкуляризацією, проліферацією пухлинних клітин та/або пухлинним ростом. Антитіла можуть бути введені суб'єкту, який страждає від різних форм раку (первинні пухлини та метастази).

[00254] Зрозуміло, що, крім введення описаних тут композицій тут передбачено, що суб'єкт може також отримувати лікування одним або декількома додатковими пригнічувачами ангіогенезу.

[00255] Термін "пригнічувач ангіогенезу" застосований тут для цілей цієї специфікації та Формули Винаходу означає сполуку або молекулу, як-то, але без обмеження, пептиди, білки, ферменти, полісахариди, олігонуклеотиди, ДНК, РНК, рекомбінантні вектори та лікарські засоби, які діють, щоб пригнічувати ангіогенез.

Пригнічувачі ангіогенезу є відомими у цій галузі та всі типи цих сполук створені заявленим винаходом. Необмежені приклади таких сполук та молекул охоплюють природні та синтетичні біомолекули, як-то паклітаксел, О-(хлорацетил-карбоміл) фумагілол ("TNP-470" або "AGM 1470"), тромбоспондин-1, тромбоспондин-2, ангіостатин, інгібітор ангіогенезу, отриманий з хондроцитів людини ("hCHIAMP"), інгібітор ангіогенезу, отриманий з хрящів, тромбоцитарний фактор-4, гро-бета, людський інтерферон-індукований білок 10 людини ("IP10"), інтерлейкін-12, Ro 318220, трициклодекан-9-іл ксантат ("D609"), ірсогландин, 8,9-дигідрокси-7 метил-бензо [b] хінолізину бромід ("GPA 1734"), медроксипрогестерон, поєднання гепарину та кортизону, інгібітори глюкозидази, генистеїн, талідомід, діаміно-антрахінон, гербіміцин, урсолову та олеанолову кислоту. Необмежені приклади антитіл охоплюють антитіла, спрямовані до таких молекул, як VEGF, рецептор VEGF або різні епітопи CD105. Крім того, також відомі та створені тут малі молекулярні пригнічувачі рецептора VEGF. Необмежені приклади пригнічувачів рецепторів VEGF охоплюють композиції ранібізумаб, афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб, пегатаніб та пазопаніб.

[00256] Різні комбінації цих пригнічувачів рецепторів VEGF можна застосовувати з композиціями, описаними тут. В одному втіленні комбінації можуть призвести до застосування менших доз для описаних тут антитіл або для зв'язування антигену. Такі змінення дозування можуть виникати в результаті синергічних ефектів комбінацій антитіл.

Рак

[00257] CD105 є пов'язаним з пухлинним ангіогенезом та, порівняно з нормальними тканинами, сильно активується у ендотелії різних пухлинних тканин, отже він знаходиться у активованому стані у великому діапазоні клітин пухлинного ендотелію. Крім того, експресія CD105 у клітинах пухлинного ендотелію є більш сильнішою, ніж у відповідних нормальних тканинах. Таким чином, пригнічення ангіогенезу анти-CD105 антитілами демонструє можливість лікування ракових пухлин. Описані тут композиції можуть бути застосовані для лікування ракових пухлин та метастазів. Також ці композиції можуть бути застосовані для отримання медичних засобів для лікування ракових пухлин та метастазів.

[00258] Однією з цілей протипухлинної терапії є VEGF, оскільки експресія цієї сполуки активується у ряді твердих пухлин. VEGF є головним регулятором ангіогенезу, росту нових судин з судин, які вже існують. Цей процес має фундаментальне значення для росту твердих пухлин, який спирається на утворенні нових кровоносних судин. Деякі низькомолекулярні терапевтичні агенти здатні поцілювати у рецептор судинного ендотеліального фактора росту

("VEGFR") та таке спрямовування малих молекул терапевтично може привести до протиракових ефектів. Спрямовані до рецептора VEGF агенти небезпосередньо блокують пухлинний ріст шляхом пригнічення утворення нових судин. Пригнічення VEGF-індукованого ангіогенезу може надати протипухлинного або посиленого протипухлинного ефекту без значного пригнічення VEGF-стимулювання макрофагів, остеокластів або хондрокластів.

[00259] Термін "пухлина" застосовано тут по відношенню до ракових тканин, у яких відбувається експресія CD105 та/або VEGF (порівняно до експресії у нормальних тканинах такого ж типу). Пухлини можуть охоплювати тверді та напівтверді пухлини. Необмежені приклади пухлин охоплюють людські лейкози, включаючи гострий лімфобластний лейкоз іншого, ніж Т-клітинного типу (не-Т) (ALL), мієло-моноцитарний лейкоз; та тверді та напівтверді пухлини у людини, з їх оточуючою судинною системою, в якій відбувається експресія CD105 на середньому - високому рівні (порівняно до експресії у нормальних тканинах такого ж типу) включаючи, у тому числі, ангіосаркому, рак молочної залози, рак шлунка, рак товстої кишки, лімфому Ходжкіна, лімфому, мультиформну гліобластому (GBM), рак легенів, меланому, мієлому, остеосаркому, рак яєчників, пухлину привушної залози, рак глотки, рак передміхурової залози, гепатоцелюлярну карциному, рак нирки та рак ректосигмовидного відділу ободочної кишки.

[00260] Ракова тканина підлягає лікуванню, якщо, наприклад, у ендотеліальній тканині спостерігається експресія аномального рівня CD105 та/або VEGF.

[00261] За відсутності неоваскуляризації пухлинної тканини ця тканина не отримує потрібні живильні речовини, уповільнює в рості, припиняє додаткове зростання, регресує та в кінцевому рахунку стає некротичною, що веде до загибелі пухлини. У цій роботі створені способи пригнічення новоутворених кровоносних судин пухлини шляхом пригнічення пухлинного ангіогенезу пухлини. Так само тут створені способи пригнічення пухлинного росту.

[00262] Ці способи також особливо ефективні проти утворення метастазів, тому що їх утворення потребує васкуляризації первинної пухлини таким чином, щоб метастатичні ракові клітини могли вийти з первинної пухлини та їх впровадження у іншому місці організму також потребує утворення нових судин для підтримання метастатичного росту.

[00263] Слід розуміти, що "суб'єкт, який страждає від раку/метастазів" за винаходом може бути здатним до експресії мутантного білка (пов'язаного з пухлиною антигену) або мутантного гена та не бути симптоматичним для захворювання. У одному необмеженому прикладі раку товстої кишки (пов'язаного з мутантним білком K-Ras) суб'єкт з мутантним білком K-Ras у деяких клітинах товстої кишки є суб'єктом, який підлягає лікуванню, хоча у цього суб'єкту можуть ще й не проявлятися симптоми раку товстої кишки. "Ознаки або симптоми хвороби", являють собою клінічно визнані прояви або ознаки захворювання.

[00264] Під "лікуванням" суб'єкта, який страждає від пухлин або метастазів мається на увазі, що після означеного лікування ознаки або симптоми суб'єкта частково покращилися, повністю покращилися або залишилися у статичному стані. Пацієнт, який підлягає лікуванню може демонструвати часткове або повне полегшення пухлинного навантаження. Лікування також призначено охоплювати профілактику, терапію та лікування. У одному необмеженому прикладі вважається, що суб'єкт, який страждає від дуже метастатичного раку (наприклад, раку молочної залози) отримує лікування, якщо нові метастази не виникають або кількість метастазів зменшується у порівнянні з суб'єктом, який не отримав лікування. У іншому необмеженому прикладі вважається, що суб'єкт отримує лікування, якщо його тверді ракові пухлини або стають меншого розміру або не збільшуються у розмірі у порівнянні з суб'єктом, який не отримав лікування. У іншому необмеженому прикладі, кількість ракових клітин у суб'єкта, який отримав лікування або не збільшується або є зменшеною порівняно з кількістю ракових клітин у суб'єкта, який не отримав лікування. Покращення може бути визначено, наприклад, у вигляді зменшеної клітинної проліферації, зменшення кількості клітин, підвищення апоптозу та/або підвищення виживання підданого лікуванню суб'єкта.

[00265] Лікування може привести до часткового або до повного усунення пухлин або метастазів та/або до подовження строку виживання пацієнта.

[00266] У одному втіленні тяжкість або тривалість однієї або декількох ознак або симптомів після введення однієї або декількох доз композиції пацієнту зменшується приблизно на 2%, приблизно на 5%, приблизно на 10%, приблизно на 15%, приблизно на 20%, приблизно на 25%, приблизно на 30%, приблизно на 35%, приблизно на 40%, приблизно на 45%, приблизно на 50%, приблизно на 55%, приблизно на 60%, приблизно на 65%, приблизно на 70%, приблизно на 75%, приблизно на 80%, приблизно на 90%, приблизно на 95% або приблизно на 100%.

[00267] У іншому втіленні тяжкість або тривалість однієї або декількох ознак або симптомів після введення однієї або декількох доз композиції пацієнту зменшується приблизно у 2 рази,

приблизно у 5 разів, приблизно у 10 разів, приблизно у 15 разів, приблизно у 20 разів, приблизно у 25 разів, приблизно у 30 разів, приблизно у 35 разів, приблизно у 40 разів, приблизно у 45 разів, приблизно у 50 разів, приблизно у 55 разів, приблизно у 60 разів, приблизно у 65 разів, приблизно у 70 разів, приблизно у 75 разів, приблизно у 80 разів, приблизно у 90 разів, приблизно у 95 разів, приблизно у 100 разів або ще більше.

[00268] Пухлини або рак, які підлягають лікуванню описаними тут способами охоплюють, але без обмеження, рак легенів, гінекологічні злоякісні захворювання, меланому, рак молочної залози, раку мозку (наприклад, мультиформну гліобластому (GBM) або гліому), рак підшлункової залози, рак яєчників, рак матки, колоректальний рак, рак передміхурової залози, рак нирки, рак голови, рак печінки (гепатоцелюлярний рак), рак шиї, рак ниркових клітин, рак статевого члена, рак шлунка, рак щитоподібної залози, рак січового міхура, саркому, карциному, мієлому та лімфому. У одному втіленні пухлина, що підлягає лікуванню є твердою або напівтвердою пухлиною. У іншому втіленні пухлина, що підлягає лікуванню є первинною пухлиною. У іншому втіленні пухлина, що підлягає лікуванню є метастатичною пухлиною. У іншому втіленні пухлина або рак, що підлягає лікуванню має епітеліальне походження. У іншому втіленні рак, що підлягає лікуванню є мієломою. У іншому втіленні рак, що підлягає лікуванню є раком яєчників. У іншому втіленні рак, що підлягає лікуванню є раком нирки/ренальним раком. У іншому втіленні рак, який підлягає лікуванню є гепатоклітинним раком/ раком печінки.

[00269] Сполуки можуть бути, якщо це потрібно, введені у комбінації з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, які охоплюють, але без обмеження, адриаміцин, циклофосфан, паклітаксел, пеметрексед, темозоломід, оксалиплатин, цетуксимаб, панітумумаб, сорафеніб, сунітиніб, гефітиніб, ерлотиніб, 5-фторурацил, іринотекан, топотекан, лейковорин, бортезуміб, леналідомід, талідомід, капецитабин, доцетаксел та багато інших стандартних описаних тут протиракових терапевтичних засобів. Як тут застосовано, "випромінювання" має відношення до, наприклад, мікрохвильового, ультрафіолетового (УФ), інфрачервоного (ІЧ) або альфа-, бета- або гамма-випромінювання. Випромінювання може бути "зосередженим" або місцево доставленим з застосуванням стандартних способів його націлювання на місце розташування однієї або декількох пухлин без дії на цілий організм. Зрозуміло, що перелік перелічених нижче терапевтичних режимів представляє звичайні способи лікування, але заявлений винахід охоплює інші відомі терапевтичні режими, які певним чином тут не розкриті.

[00270] У одному втіленні рак є раком яєчників та одним або декількома додатковими способами терапії є хірургія, хіміотерапія (наприклад, застосування доксорубіцину, доксорубіцин-НСІ ліпосом, гемцитабіну, хіміотерапевтичних засобів на основі платини, як-то цисплатину, карбоплатину та оксалиплатину), застосування мелфалану, пригнічувачів топоізомераз I, як-то топотекану та іринотекану, терапія на основі таксанів, гормонів, променевої терапії, гіпотермії всього організму, застосування похідних ізофлавонів, цитотоксичних макролідів, як-то епотилонів, пригнічувачів ангіогенезу, як-то бевацизумаб, пригнічувачів сигнальної трансдукції, як-то трастузумаб, застосування генної терапії, терапії з допомогою РНК-інтерференції, імунотерапії, застосування моноклональних антитіл, застосування пригнічувачів кінази, подібних до фосфатидилінозиту, як-то рапаміцину, або будь-які їх комбінації. За рахунок синергетичного ефекту від спільного застосування терапевтичних засобів, комбінована терапія з описаними тут антитілами та терапевтичними засобами для лікування раку яєчників може також забезпечити застосування більш низьких доз або полегшення терапії або обох цих компонентів лікування.

[00271] У одному втіленні рак є ренальним раком/раком нирки та одним або декількома видами його додаткового терапевтичного лікування є хірургія, хіміотерапія та застосування пазопаніб, альфа-інтерферону або ІЛ-2. У іншому втіленні додатковим агентом є пригнічувач рецептора VEGF. Необмежені приклади таких пригнічувачів охоплюють описані вище сполуки, афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб та пазопаніб. За рахунок синергетичного ефекту від спільного застосування терапевтичних засобів, комбінована терапія з описаними тут антитілами та терапевтичними засобами для раку нирки може також забезпечити застосування більш низьких доз або полегшення терапії або обох цих компонентів лікування.

[00272] У одному втіленні рак є мієломою та одним або декількома додатковими терапевтичними засобами лікування цієї недуги є хірургія, променева терапія та застосування композицій бортезоміб, леналідомід або талідомід. Дозування будь-яких цих засобів відомі у цій галузі та можуть бути, відповідно, відрегульовані у комбінаційній терапії.

[00273] У одному втіленні рак є раком передміхурової залози та одним або декількома додатковими терапевтичними засобами лікування цієї недуги є хірургія, променева терапія (наприклад, зовнішнє опромінення або брахітерапія), антигормональна терапія (пригнічення

андрогену, у тому числі з абіратероном), застосування пригнічувачів білка теплового шоку 90 (HSP90), хіміотерапія (наприклад, застосування композицій доцетаксел, естрамустин, хіміотерапія на основі сполук, які містять платину, як-то цисплатин, карбоплатин, сатраплатин та оксаліплатин), застосування преднізону або преднізолону, ліків, які знижують рівень
 5 холестерину, як-то статинів, застосування агоністів рилізінг-фактор лютеїнізуючого гормону (LHRH), терапія з допомогою РНК-інтерференції, застосування засобів терапії на основі дендритних клітин, застосування генетично змінених цілих пухлинних, здатних виробляти гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF) (також відомий, як GVAX) або будь-які їх комбінації. У іншому втіленні додатковим агентом є пригнічувач
 10 рецептора VEGF. Необмежені приклади пригнічувачів рецептора VEGF охоплюють афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб та пазопаніб.

[00274] У одному втіленні рак є раком легенів та одним або декількома додатковими способами терапевтичного лікування є хірургія, променева терапія (наприклад, грудна променева терапія, променева терапія з зарядженими частинками), застосування композиції
 15 урацил-тегафур, хіміотерапія на основі сполук, які містять платину, (як-то цисплатин, карбоплатин, оксаліплатин тощо), застосування композицій вінорельбін, ерлотиніб, гефітиніб, антитіл до рецептора епідермального фактора росту (наприклад, цетуксимаб), низькомолекулярних пригнічувачів тирозинкіназ, безпосередніх пригнічувачів білків, залучених до клітинної проліферації раку легенів, пригнічувачів кіназ Аврора, термотерапія, викликана дією лазера, терапія з допомогою РНК-інтерференції, застосування генетично змінених цілих
 20 пухлинних клітин, здатних виробляти гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF) (також відомий, як GVAX) або будь-які їх комбінації. Додаткові засоби терапевтичного лікування охоплюють застосування препаратів паклітаксел або пеметрексед. У іншому втіленні додатковим агентом є пригнічувач рецептора VEGF. Необмежені приклади пригнічувачів рецептора VEGF охоплюють афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб та пазопаніб. Дозування будь-яких цих засобів відомі у цій галузі та можуть бути, відповідно, відрегульовані у комбінаційній терапії..

[00275] У одному втіленні рак є раком молочної залози та одним або декількома додатковими способами терапевтичного лікування є хірургія, застосування моноклональних
 30 антитіл (наприклад, антитіл Her-2, герцептину), ад'ювантна хіміотерапія, як-то хіміотерапія з одиничним агентом або комбінаційна хіміотерапія (наприклад, поліхіміотерапія на основі антрацикліну та таксану) або застосування трастузумабу спрямованої дії з або без ендокринної маніпуляції з або без постмастектомічної променевої терапії, вінорельбіну), застосування препаратів адриамицин, циклофосфан, капецитабин, доцетаксел, вибіркового модуляторів рецептора естрогену, як-то тамоксифен та ралоксифен, алостеричних модуляторів рецептора естрогену, як-то трилостан, випромінювання (наприклад, інтерстиціальна брахітерапія, застосування пристрою Mammosite, тривимірного конформаційного зовнішнього
 35 випромінювання та інтраопераційної променевої терапії), застосування пригнічувачів ароматази, які пригнічують синтез у всьому організмі (наприклад, анастрозол, екземестан та летрозол), терапія з допомогою РНК-інтерференції, застосування внутрішньовенних аналогів рапаміцину, які є імуносупресивними та анти-проліферативними, як-то темсиролімус або будь-які їх комбінації. Огляд способів отримання тривимірних моделей раку молочної залози у культурі тканин in vitro описані у роботі Kim et al., Breast Cancer Research Treatment 85(3): 281-91 (2004). Інші моделі перевірки раку in vivo та in vitro відомі фахівцям та можуть бути застосовані
 40 для перевірки описаних тут антитіл. У іншому втіленні додатковим агентом є пригнічувач рецептора VEGF. Необмежені приклади пригнічувачів рецептора VEGF охоплюють афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб та пазопаніб. Дозування будь-яких цих засобів відомі у цій галузі та можуть бути, відповідно, відрегульовані у комбінаційній терапії.

[00276] У одному втіленні рак є раком товстої кишки та одним або декількома додатковими способами терапевтичного лікування цієї хвороби є хірургія, променева терапія та хіміотерапія
 50 (наприклад, застосування 5-фторурацилу, левамізолу, лейковорину або семустидину (метил-CCNU)), застосування N-[2-(диметиламіно)етил] акридин-4-карбоксаміду та інших пов'язаних з карбоксамідом протиракових ліків; застосування пригнічувачів не-топоізомерази II, іринотекану, ліпосомального топотекану, таксанового класу протиракових агентів (наприклад, паклітаксел або доцетаксел), сполук класу ксантенон - оцтової кислоти (наприклад, 5,6-диметилантенон-4-оцтової кислоти, РМАО), ламінаріну, аналогів сайт-селективного ЦАМФ (наприклад, 8-хлораденозин-3',5'-циклофосфату), застосування піраноіндолових пригнічувачів Sox-2, карбазольних пригнічувачів Sox-2, тетрагідрокарбазольних пригнічувачів Sox-2, інденових пригнічувачів Sox-2, локалізованих пригнічувачів NSAIDS (наприклад, антранілових кислот, аспірину (5-ацетилсаліцилової кислоти), азодисаліцилату натрію, карбогетероциклічних кислот,
 60

карпрофену, хлорамбуцилу, диклофенаку, фенбуфену, фенклофенаку, фенопрофену, флуфенамової кислоти, флурбіпрофену, флупрофену, фурсеміду, ауротіомалату натрію, ібупрофену, індометацину, індопрофену, кетопрофену, лоназолаку, локопрофену, меклофенамової кислоти, мефанамової кислоти, мелфалану, напроксену, пенициламіну, фенілоцтових кислот, пропріонових кислот, саліцилових кислот, салазосульфопіридину, суліндаку, толметину, піразолону, бутазону, пропазону, нестероїдних протизапальних композицій, мелоксикаму, оксикаму, піроксикаму, фелдену, піроксикам-бета-ціклодекстрану, теноксикаму, етодолаку та оксапрозину), пригнічувачів HER-2/neu, терапія з допомогою РНК-інтерференції, GM-CSF, застосування моноклональних антитіл (наприклад, анти-Her-2/neu антитіл, анти-CEA антитіл, A33 (НВ 8779), 100-210 (НВ 11764) та 100-310 (НВ 11028)), цетуксимабу, панітумумабу, гормональна терапія, застосування піримідинамінів, похідних камптотецину (наприклад, СРТ-11), фолінової кислоти (FA), гемцитабіну, Ага-С, хіміотерапія на основі сполук, які містять платину, як-то цисплатин, карбоплатин та оксаліплатин, застосування пригнічувачів специфічної до циклічного гуанозинмоно фосфату фосфодіестерази або будь-яких їх комбінацій. У одному втіленні додаткове терапевтичне лікування полягає у застосуванні комбінації 5-фторурацилу, лейковорину та оксаліплатину (FOLFOX). У одному втіленні додаткове терапевтичне лікування полягає у застосуванні комбінації 5-фторурацилу, лейковорину та іринотекаїну (IFL). У одному втіленні додатковим агентом є цетуксимаб. У одному втіленні додатковим агентом є панітумумаб. У іншому втіленні додатковим агентом є пригнічувач рецептора VEGF. Необмежені приклади пригнічувачів рецептора VEGF охоплюють афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб та пазопаніб. Дозування будь-яких цих засобів відомі у цій галузі та можуть бути, відповідно, відрегульовані у комбінаційній терапії.

[00277] У одному втіленні рак є раком підшлункової залози та одним або декількома додатковими способами терапевтичного лікування цієї хвороби є застосування комбінації лікувальних процедур, як-то хірургії, променевої терапії, застосування 5-фторурацилу та променевої терапії, системної терапії, стентування, застосування гемцитабіну, гемцитабіну та променевої терапії, цетуксимабу, ерлотинібу, поєднання хіміотерапії з променевою терапією або будь-які їх комбінації. У іншому втіленні додатковим агентом є пригнічувач рецептора VEGF. Необмежені приклади пригнічувачів рецептора VEGF охоплюють афліберцепт, сунітиніб, сорафеніб, акситиніб та пазопаніб.

[00278] Оцінка стану пацієнтів може бути проведена, беручи до уваги ознаки або симптоми захворювання протягом одного або кількох різних моментів часу, включаючи моменти часу до, під час та після проведення курсів лікування. Лікування може привести до поліпшення стану суб'єкта та можуть бути оцінено шляхом визначення наявності одного або кількох наступних факторів, як-то зменшення розмірів пухлин, зниження проліферації клітин, зменшення кількості клітин, зниження неоваскуляризації, збільшення апоптозу, або зниження виживання принаймні частини клітин, які містять клітинний проліферативний розлад. Один або декілька з цих випадків можуть у певному разі призвести до часткового або повного усунення та/або до подовження строку життя пацієнта. Крім того, для лікування термінальної стадії раку, лікування може призвести до зупинки розвитку захворювання, поліпшення якості життя та/або подовження виживання.

[00279] При послідовному введенні композицій, композиція, яка містить описані тут анти-CD105 антитіла може, наприклад, бути введеною перед та/або після застосування анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів).

[00280] При одночасному введенні композицій, композиція, яка містить описані тут анти-CD105 антитіла може, наприклад, бути введеною у те ж саме місце, що й композиція, яка містить анти-VEGF антитіла або у інше місце.

[00281] У іншому втіленні передбачено композиції (лікарські композиції), які містять анти-CD105 антитіла та анти-VEGF антитіла (або їх антиген-зв'язуючі фрагменти), здатні до пригнічення однієї або декількох біологічних активних властивостей, відповідно, білків CD105 та VEGF, як-то мітогенної активності, клітинної проліферації, пухлинного росту, неоваскуляризації або ангіогенної активності..

[00282] Зрозуміло, що схеми лікування можуть полягати у одному або у кількох введеннях кожної описаної тут композиції, які можуть бути введені у вигляді одиничної дози або багатьох доз. Введення окремих композицій може бути здійснено або однакою шляхом або різними шляхами.

[00283] У одному втіленні композицію вводять кожні 1-3 тижні протягом 6-12 циклів або до появи змінення стану пухлин. Спосіб може додатково полягати у введенні композиції кожен 1-12 тижнів протягом часу, який може сягати до 2 років. У іншому необмеженому прикладі, одночасне введення анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих

фрагментів) здійснюють у перший тиждень з наступним додатковим введенням композиції у 1, 2, 3 або 4 тиждень, при цьому зазначене одночасне введення повторюють протягом 6-12 циклів або до появи змінення стану пухлин шляхом введення композиції кожен 1-12 тижнів протягом часу, який може сягати до 2 років.

[00284] У одному необмеженому прикладі способу лікування раку у пацієнта, спосіб полягає у хірургічному видаленні раку та у введенні анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів) через 1-3 тижні протягом 12 місяців або до появи змінення стану пухлин з наступним одночасним введенням анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів) з дозою у 1-12 тиждень. Це одночасне введення анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів) можна додатково повторювати кожні 1-3 тижні (до 6 циклів). Вибірково спосіб додатково полягає у введенні анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів) кожен 1-12 тижнів протягом часу, який може сягати до 2 років. Зрозуміло, що схеми лікування можуть бути поєднані з передбаченими тут способами моніторингу для визначення потреби у введенні додаткових доз анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів).

[00285] Комбінаційна терапія може надавати синергетичного та/або сприятливого ефекту або може дозволити застосування знижених доз комбінації для забезпечення більшого запасу безпеки. Винаходом передбачені схеми лікування, які посилюють профілактичний або терапевтичний ефект анти-CD105 та анти-VEGF антитіла (або їх антиген-зв'язуючих фрагментів) для запобігання, контролю, лікування або усунення раку або інших захворювань.

[00286] У одному втіленні суб'єкту вводять додатковий терапевтичний лікувальний засіб, як-то, наприклад, пригнічувач ангиогенезу (як тут описано). Композицію, яка містить такий додатковий терапевтичний засіб може бути введена у комбінації (або послідовно або одночасно) з іншими описаними тут композиціями.

[00287] У одному передбаченому тут необмеженому способі лікування раку, додаткове терапевтичне лікування полягає у хірургічному видаленні раку, застосуванні випромінювання, одного або кількох хімотерапевтичних агентів або їх комбінацій та у одночасному введенні описаних тут однієї або декількох композицій. У одному аспекті, введення композиції може бути, наприклад, 20-хвилинним внутрішньовенним вливанням.

Стан очей у випадку ангиогенезу.

[00288] У одному аспекті заявленим винаходом передбачено спосіб лікування діабетичної ретинопатії, макулярної дегенерації, хоріоїдальної неоваскуляризації, макулярного набряку або неоваскулярної глаукоми, який полягає у введенні пацієнту терапевтично ефективної кількості одного або декількох передбачених тут композицій.

[00289] Макулярною дегенерацією (ВМД) є втрата фоторецепторів у центральній частині сітківки, яка має назву макули та відповідає за високу гостроту зору. Дегенерація макули пов'язана з аномальним накопичуванням компонентів позаклітинної матриці та інших клітинних уламків у мембрані між пігментним епітелієм сітківки та судинною оболонкою ока. Цей матеріал клітинних уламків має назву друзів. Друзи спостерігають під час обстеження очного дна. Нормальні очі можуть мати вільні від друз макули, незважаючи на достатню кількість друз у периферії сітківки. Наявність м'яких друз у макулі за відсутності будь-якої втрати макулярного зору вважається раннім етапом ВМД. Дегенерація жовтої плями характеризується хоріоїдальною неоваскуляризацією (ХНВ), тобто розвитком аномальних кровоносних судин під шаром пігментного епітелію (RPE) сітківки ока. Ці судини прориваються крізь мембрану Бруха, порушуючи пігментований епітелій сітківки, кровоточать та в кінцевому рахунку призводять до макулярного рубцювання, яке призводить до тяжкої втрати центрального зору (дископодібне рубцювання).

[00290] Хороїдальна неоваскуляризація (ХНВ) звичайно виникає при макулярній дегенерації на додачу до інших очних розладів та є пов'язаною з проліферацією хороїдальних ендотеліальних клітин, надлишковим утворенням позаклітинного матриксу та утворенням фіброваскулярної субретинальної мембрани. Клітинна проліферація пігментного епітелію сітківки та утворення ангиогенних факторів імовірно спричинює хороїдальну неоваскуляризацію.

[00291] Діабетична ретинопатія (ДР) є очним розладом, який відрізняється надмірним ангиогенезом, який розвивається при діабеті завдяки потовщенню капілярних базальних мембран та втраті контакту між перицитами та ендотеліальними клітинами капілярів. Втрата перицитів підвищує витоку капілярів та веде до порушення гематоретинального бар'єру. Діабетична ретинопатія є результатом мікросудинних змін сітківки. Спричинена гіперглікемією загибель перицитів та потовщення базальної мембрани веде до слабкості судинних стінок. Ці пошкодження впливають на утворення гематоретинального бар'єру,

змінюючи його, а також роблять кровоносні судини сітківки більш проникними. Малі кровоносні судини, як-то малі кровоносні судини ока є особливо уразливими до поганого контролю цукру (глюкози крові) у крові. Надмірне накопичування глюкози та/або фруктози пошкоджує крихітні кровоносні судини сітківки. Макулярний набряк також може розвиватися, коли виникає витік рідини та ліпідів на макули з пошкоджених кровоносних судин. Ці рідини роблять макулу набряклою, що розмиває бачення. Це пошкодження також веде до втрати кисню в сітківці.

[00292] При розвитку захворювання, втрата кисню в сітківці стимулює ангиогенез вздовж сітківки та у прозорому гелеподібному скловидному тілі, яке знаходиться всередині ока. Без своєчасного лікування, ці нові кровоносні судини можуть кровоточити, затьмарювати бачення та знищувати сітківку. Фіброваскулярна проліферація також може викликати тракційне відшарування сітківки. Нові кровоносні судини можуть рости до кута передньої камери ока та викликати неоваскулярну глаукому.

[00293] Проліферативна вітреоретинопатія є пов'язаною з клітинною проліферацією, яка зачіпає клітинні та фіброзні мембрани всередині мембран склоподібного тіла та на поверхні сітківки. Для цього очного розладу є характерною проліферація та міграція клітин епітелію пігменту сітківки. Мембрани, пов'язані з проліферативною вітреоретинопатією містять компоненти позаклітинного матриксу, як-то колаген типу I, II та IV та фібронектин та поступово стають фіброзними..

[00294] Вікова макулярна дегенерація (ВМД) та діабетична ретинопатія - це дві головні хвороби, які викликають сліпоту у розвинутіму світі. Алфіберцепт, ранібізумаб та пегаптаніб мають покращені можливості лікування, які є прийнятними для пацієнтів з ВМД. Ранібізумаб є Fab, та алфіберцепт є злитим білком та обидві ці сполуки зв'язують судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) та на сьогоднішній день демонструють найбільш вражаючі результати при лікуванні ВМД. Однак, тільки менша частина пацієнтів, які пройшли лікування відчувають значне покращення гостроти зору. Анти-ангіогенна терапія, яка зосереджена на іншій, ніж VEGF, мішені, може подолати деякі обмеження, пов'язані з агентами, спрямованими до метаболічного шляху VEGF.

[00295] Описані тут анти-CD105 антитіла можуть бути застосовані для лікування або запобігання макулярної дегенерації, хороїдальної неоваскуляризації, діабетичної ретинопатії або проліферативної вітроретинопатії. Тут також описані способи лікування або запобігання макулярної дегенерації, хороїдальної неоваскуляризації, діабетичної ретинопатії, макулярного набряку або проліферативної вітроретинопатії шляхом введення описаних тут антитіл. Описані тут анти-CD105 антитіла також можуть скорочувати кровоносні судини, пригнічувати пов'язану з офтальмологічним захворюванням проліферацію ендотеліальних клітин, усувати ознаки або симптоми кровотечі, лікувати замутнений зір, зупиняти розвиток втрати зору, покращувати зір та/або запобігати витоку кровоносних судин. Описані тут анти-CD105 антитіла також можуть бути застосовані для отримання лікарських композицій для лікування макулярної дегенерації, хороїдальної неоваскуляризації, діабетичної ретинопатії, макулярного набряку або проліферативної вітроретинопатії.

[00296] Крім того, описані тут анти-CD105 антитіла також можуть бути застосовані у поєднанні з відомими видами терапевтичного лікування та/або зі сполуками для лікування макулярної дегенерації, хороїдальної неоваскуляризації, діабетичної ретинопатії, макулярного набряку або проліферативної вітроретинопатії. Приклади таких сполук охоплюють, але без обмеження, ранібізумаб, алфіберцепт та пегаптаніб. Крім описаних тут способів введення, анти-CD105 антитіла може бути застосовані шляхом введення у скловидне тіло. Необмежені приклади способів введення у скловидне тіло охоплюють введення у скловидне тіло шляхом ін'єкції та застосування інтравітреальних імплантів.

[00297] Полегшення та чутливість до лікування у пацієнтів можуть бути відповідно досліджені. Лікування охоплює, але без обмеження, заходи, спрямовані до зменшення макулярного набряку, зниження обсягу хороїдальної неоваскуляризації та підвищення гостроти зору. Вимірювання ознак або симптомів є відомою у цій галузі процедурою та додатково описано у прикладах нижче.

[00298] У відповідності з наведеними тут втіленнями, описані тут композиції можуть бути введені окремо або у комбінації з одним або декількома додатковими активними або неактивними агентами. При застосуванні комбінацій може бути застосовано одночасне або послідовне введення анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл (іх антиген-зв'язуючих фрагментів).

Способи функціонального аналізу.

[00299] Описані тут композиції можуть бути різним чином оцінені шляхом аналізів in vitro, in vivo та ex vivo. Для моніторингу таких ефектів може бути застосовано будь-який відомий

фахівцям у цей галузі прийнятний аналіз. Деякі такі способи описані нижче.

Аналіз сигналування та функції CD105 .

[00300] CD105 (ендоглін) є членом родини рецепторів TGF- β , експресія якого відбувається у
 5 ендотеліальних клітинах під час їх проліферації, яка потребує наявності нормальних рівнів
 цього білка. Сильна експресія CD105 відбувається у ангіогенній судинній системі твердих
 пухлин та цей білок є залученим до ангіогенезу/судинного розвитку, а також є рецептором
 допоміжного трансформуючого фактору росту β (TGF- β) CD105 є гомодимерним глікобілком
 клітинної мембрани, експресія якого відбувається у лейкозних та ендотеліальних клітинах. Були
 10 описані дві ізоформи CD105, L-ендоглін (170 кДа) та S-ендоглін (160 кДа), які відрізняються
 амінокислотною послідовністю їх цитоплазматичних хвостів.

[00301] Експресія CD105 підвищується шляхом клітинної гіпоксії за рахунок продукування
 індукованого гіпоксією фактора-1- α (HIF-1- α) та захищає гіпоксичні клітини від апоптозу. Дія
 CD105 спрямована на зменшення сигналування численних кіназних рецепторних комплексів
 надродини TGF- β , включаючи рецептори TGF- β (TGF- β R), активін-рецептороподібні кінази (ALK)
 15 та рецептори активину. У відсутність CD105 активування рецепторів TGF- β веде до
 фосфорилування білків SMAD, які пригнічують ріст ендотеліальних клітин. Однак активування
 CD105 шляхом TGF- β зменшує фосфорилування білка SMAD. Кінцевим результатом є
 вивільнення ростових пригнічувальних ефектів від активування рецептора TGF- β у
 ендотеліальних клітинах.

[00302] Запобігання активування CD105 з допомогою анти-CD105 антитіла синергетично
 впливає разом з TGF- β на пригнічення росту ендотеліальних клітин. У ендотеліальних клітинах
 TGF- β може стимулювати два окремих шляхи сигналування рецептора типу I/SMAD з
 протилежними ефектами. Шлях сигналування TGF- β /ALK5 (A) веде до пригнічення клітинної
 25 проліферації та міграції клітин, тоді як шлях TGF- β /ALK1 (B) викликає проліферацію
 ендотеліальних клітин та міграцію. CD105, який є допоміжним рецептором TGF- β має високий
 рівень експресії протягом ангіогенезу та є необхідним для сигналування ALK1. У відсутність
 CD105, сигналування TGF- β /ALK5 є переважаючим та підтримує ендотелій у стані спокою.
 Високий рівень експресії CD105 стимулює шлях ALK1 та безпосередньо пригнічує
 сигналування ALK5, сприяючи таким чином стану активування ангіогенезу.

[00303] У одному необмеженому втіленні антитіло може бути оцінено відносно пригнічення
 ангіогенезу та проліферації ендотеліальних клітин. Зв'язування анти-CD105 антитіл з HUVEC не
 запобігає подальшому зв'язуванню TGF- β з HUVEC. Отже, безпосереднє пригнічення росту
 ендотеліальних клітин з допомогою анти-CD105 антитіл являє собою один з основних
 35 механізмів, з допомогою яких спостерігаються анти-ангіогенні та пухлинно-супресивні ефекти *in vivo*.
 У іншому втіленні антитіло може бути оцінено відносно блокування ангіогенезу шляхом
 запобігання фосфорилування та/або сигналування Smad1/5/8. CD105 приймає участь у
 сприянні ангіогенезу шляхом сигналування TGF- β /ALK1, яке в свою чергу викликає зменшення
 та/або зупинення фосфорилування білків Smad2/3. У іншому втіленні антитіло може бути
 40 оцінено відносно блокування ангіогенезу шляхом посилення фосфорилування та/або
 сигналування Smad2/3.

[00304] Способи та технічні прийоми оцінки блокуючої або пригнічуючої дії передбачених тут
 антитіл на шлях сигналування TGF- β /ALK1 та/або фосфорилування Smad1/5 є (без обмеження)
 відомими молекулярними способами. У якості прикладу, для визначення пригнічуючого та/або
 45 стимулюючого ефекту описаних тут анти-CD105 антитіл на шляхи TGF- β /ALK5 або TGF- β /ALK1
 може бути застосовано Вестерн-блотинг з антитілами, специфічними до будь-яких білків шляхів
 TGF- β /ALK5 або TGF- β /ALK1. Так само, для оцінки пригнічуючого та/або стимулюючого ефекту
 описаних тут антитіл може бути застосовано визначення мРНК або регулювання мРНК для
 білків, залучених до шляхів TGF- β /ALK5 або TGF- β /ALK1. Додаткові способи оцінки клітинного
 50 сигналування для шляхів TGF- β /ALK5 або TGF- β /ALK1 відомі у цій галузі та є передбаченими
 тут.

[00305] Активність описаних тут анти-CD105 антитіл може бути оціненою з застосуванням
 відомих у цій галузі способів аналізу, наприклад, шляхом аналізу зв'язування, як-то різні види
 ІФА, конкурентний ІФА, поверхневий плазмонний резонанс та дослідження дії на клітини HUVEC
 (більш детально описане нижче).

Застосування мишей SCID/голих мишей.

[00306] Один спосіб дослідження пухлинного росту полягає у наступному застосуванні
 мишей SCID. Спочатку субконфлюентні клітини людської меланоми M21 збирають, промивають
 та ресуспендують у стерильному буфері PBS (20×10^6 клітин на мл.), після чого 100 мкл суспензії
 клітин (2×10^6) людської меланоми M21 підшкірно вводять мишам SCID шляхом ін'єкції. Через

три дні після ін'єкції пухлинних клітин, мишей або не піддають лікуванню або вводять один або декілька контрольних або досліджуваних композицій внутрішньовенним або внутрішньочеревинним шляхом (наприклад, 100 мкг/мишу) та таке введення триває щоденно протягом 24 днів. Розмір пухлин вимірюють з допомогою штангенциркулів та об'єм обчислюють з застосуванням формули $V = (L \times W^2)/2$, де V є об'ємом, L є довжиною та W є шириною.

[00307] Один спосіб дослідження пухлинного росту полягає у наступному застосуванні голих мишей. Пухлинні клітини MDA-MB-435 (0.4×10^6 клітини/мишу) у 50 мкл PBS ортотопічно імплантують у жирову тканину молочної залози голих мишей жіночої статі 5-6 тижневого віку. Коли пухлини досягнуть середнього об'єму приблизно 50-80 мм³, мишей розподіляють випадковим чином (принаймні 10 на групу) та двічі на тиждень тваринам внутрішньовенно або внутрішньочеревинно вводять один або кілька типів антитіл, кількість (концентрація) яких дорівнює 1 мкг (0.05 мг/кг) на дозу, 10 мкг (0.5 мг/кг), 100 мкг (5 мг/кг) або 200 мкг (10 мг/кг) або контрольні антитіла (100 мкг) у 100 мкл PBS або засіб доставки (100 мкл PBS) та у деяких випадках також здійснюють дослідження необробленої групи тварин. Розмір пухлин вимірюють з допомогою штангенциркулів та об'єм обчислюють з застосуванням формули $V = (L \times W^2)/2$, де V є об'ємом, L є довжиною, та W є шириною.

Застосування сингенних мишачих моделей BALB/c.

[00308] Альтернативним чином, для оцінки пухлинного росту та його пригнічення з допомогою антитіл також можуть бути застосовані сингенні мишачі моделі BALB/c. Опис застосування цих моделей також наведено, наприклад, у роботі Tsujie et al., *Int. J. Oncology*, 29: 1087-1094 (2006).

Миша

[00309] У іншому аналізі вимірюють ангиогенез у химерної (миша/людина) мишачій моделі та цей аналіз отримав назву аналізу химерних мишей. Аналіз було докладно описано іншими дослідниками разом з додатковим описом вимірювання ангиогенезу, неоваскуляризації та регресії пухлинних тканин. Див. Yan, et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:986-996.

[00310] Аналіз химерних мишей є корисною моделлю аналізу для дослідження ангиогенезу *in vivo*, оскільки трансплантати пересадженої шкіри гістологічно дуже нагадують шкіру нормальної людини та неоваскуляризація цілої тканини відбувається, коли існуючі кровоносні судини людини ростуть зі щепленої людської шкіри до людської пухлинної тканини на поверхні прищепленої людської шкіри. Походження неоваскуляризації у людському трансплантаті може бути продемонстровано з допомогою імуногістохімічного фарбування новонаявленої судинної системи маркерами, специфічними до ендотеліальних клітин людини.

[00311] Аналіз химерних мишей демонструє регресію неоваскуляризації на основі як кількості, так і ступеня регресії росту нових судин. Крім того, можна легко контролювати вплив на ріст будь-якої тканини, пересадженої на прищеплену шкіру, як-то пухлинної тканини. Нарешті, аналіз є корисним, оскільки існує внутрішній контроль токсичності у тест-системі. Химерних мишей можна піддати дії будь-якого досліджуваного реагенту отже здоров'я такої миші є показником токсичності. Також у описаних тут способах можна застосувати й інші описані тут та відомі у цій галузі тваринні моделі.

Застосування аналізу кролячого ока.

[00312] Іншими способом вимірювання ангиогенезу є застосування моделі кролячого ока *in vivo*, який позначено тут, як аналіз кролячого ока. Аналіз кролячого ока більш детально було описано іншими дослідниками та його застосовують для вимірювання ангиогенезу та неоваскуляризації у присутності ангиогенних пригнічувачів, як показано на прикладі у роботі D'Amato et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9): 4082-4085.

[00313] Аналіз кролячого ока є визнаною моделлю аналізу ангиогенезу *in vivo*, оскільки процес неоваскуляризації на прикладі кролячих кровоносних судин, які ростуть з краю рогівки у рогівку легко спостерігається візуально завдяки природній прозорій рогівці ока. Крім того, у такій моделі можна легко контролювати ступінь та кількість стимулювання або пригнічення неоваскуляризації або регресію неоваскуляризації протягом часу..

[00314] Зрештою кролів можна піддати дії будь-якого досліджуваного реагенту, отже їх стан здоров'я є показником токсичності цього реагенту.

[00315] Стисло кажучи, були здійснені аналізи хоріоналантоїсної мембрани курчат (CAM) та дії досліджуваних сполук на судинну систему, яка розвивалася записували через 48 год. після імплантації гранул з 0.5% карбоксиметилцелюлози, які містили одну або декілька контрольних або досліджуваних сполук. Неоваскуляризацію рогівки викликали шляхом імплантування гранули з полі(гідроксіетилметакрилату) (Hydron; Interferon Sciences, New Brunswick, NJ), яка містила 650 нг сильнодіючого ангиогенного білка основного фактора росту фібробластів (bFGF), зв'язаного з сукральфатом (алюмінієва сіль сульфату цукрози; Bukh Meditec, Copenhagen).

Додавання сукральфату до гранул захищає bFGF від руйнування та забезпечує його повільне вивільнення, утворюючи таким чином стійкий агресивний ангиогенез, який є більш вираженим, ніж ангиогенез, індукований одним лише bFGF/Hydron. Вивільнення bFGF з гранул, які містять сукральфат/Hydron може бути визначено *in vitro* протягом строку до 4 діб після утворення гранул порівняно з лише однією добою для гранул, які містили тільки полімер Hydron. Гранули отримували шляхом змішування 110 мкл фізіологічного розчину, який містив 12 мкг рекомбінантного bFGF (Takeda, Osaka) з 40 мг сукральфату та цю суспензію додавали до 80 мкл 12% (вага/об'єм) полімеру Hydron у етанолі. Аліквоти (10 мкл) цієї суміші потім наносили піпеткою на тефлонові кілочки та давали просохнути з отриманням приблизно 17 гранул.

[00316] Гранули імплантували у рогівкові мікрокишені у кожне око попередньо підданого дії анестезії новозеландського білого кроля жіночої статі на відстані 2 мм від краю рогівки з наступним однократним місцевим нанесенням еритроміцинової мазі на поверхню рогівки. Проведена у наступні дні гістологічна перевірка показала наявність прогресивного росту кровоносних судин у рогівці в напрямку гранули та дуже рідко спостерігалися запальні клітини. Ця ангиогенна відповідь не змінилася через сильне імунне пригнічення разом з опроміненням всього організму та гранули, у складі яких був тільки сукральфат не викликали ангиогенезу. Поява нових судин головним чином була викликана дією bFGF, а не запаленням. Піддослідних тварин годували щоденно, починаючи від другої доби після імплантації шляхом промивання шлунка однією або кількома сполуками, суспендованими у 0.5% карбоксиметилцелюлозі або лише засобом доставки. Імуносупресовані тварини отримали повний курс опромінення організму з дозою у 6 Гр. протягом 6 хв. безпосередньо перед імплантацією гранул. Ця доза випромінювання призвела до появи помітної лейкопенії з >80% зменшенням кількості лейкоцитів на другу добу та до >90% зменшення на третю добу, що узгоджується з попередніми повідомленнями.

[00317] Тварин щодня перевіряв з допомогою щілинної лампи сліпою перевіркою той же самий фахівець з рогівки (фахівець з науково-медичної інформації). Площу неоваскуляризації рогівки визначали шляхом вимірювання з допомогою шкали оптичного приладу довжини судинної сітки (L) від лімба (краю рогівки) та кількості астрономічних годин (C) залученого лімба. Для визначення площі сегмента кругової зони була застосована наступна формула: $C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r - L)^2]$, де $r = 6$ мм, тобто вимірний радіус рогівки кроля. В результаті була виміряна рівномірна смуга неоваскуляризації, яка була прилеглою до гранули. Таким чином може бути оцінено повне пригнічення неоваскуляризації.

Аналізи ангиогенезу у мишей з застосуванням пробки з препарату Matrigel.

[00318] Для підтвердження дії композиції на ангиогенез може бути застосовано аналіз ангиогенезу у мишей з допомогою пробки з препарату Matrigel. Пізні фактори росту (наприклад, IGF-1, bFGF або VEGF) (250 ng) та гепарин (0.0025 одиниць на мл.) перемішують зі зменшенням фактором росту з матрицею Matrigel, як попередньо було описано у роботі Montesano, et al., J. Клітин Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson, et al., J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141. Описані тут композиції або контрольні антитіла можуть бути включені до складу препаратів Matrigel з застосуванням однієї або кількох груп тварин з дозуваннями. У контрольних експериментах Matrigel отримують у відсутність факторів росту. Мишам вводять шляхом підшкірної ін'єкції по 0.5 мл препарату Matrigel з наступним інкубаційним тижневим періодом. Після завершення інкубаційного періоду мишей піддають розтину та хірургічним шляхом вилучають полімеризовані пробки з препарату Matrigel. Ангиогенез всередині цих пробки досліджують шляхом кількісному аналізу з допомогою двох загальноприйнятих способів, як-то способу імуногістохімічного аналізу та аналізу вмісту гемоглобіну (Furstenberger, et al., Lancet. 2002, 3:298-302; Volpert, et al., Cancer Cell 2002, 2(6):473-83; та Su, et al., Pak Res. 2003, 63:3585-3592). Для імуногістохімічного аналізу, пробки з препарату Matrigel занурюють у середовище ОСТ та швидко заморожують з отриманням 4 мкм зрізів. Заморожені зрізи фіксують у суміші метанол/ацетон (1:1) та потім фарбують спрямованими до CD31 поліклональними антитілами. Кількісний аналіз ангиогенезу здійснюють шляхом підрахунку мікросудинної щільності у мікроскопічному полі з великим збільшенням 20 (200X).

[00319] Вміст гемоглобіну може бути обчислено, як описано у роботах попередніх дослідників (Schnaper, et al., J. Cell Physiol. 1993, 256:235-246; Montesano, et al., J. Клітин Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson, et al., J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141; and Gigli, et al., J. Immunol. 1986, 100:1154-1164). Імпланти з препарату Matrigel швидко заморожують у сухому льоді та ліофілізують протягом ночі. Підсушені імпланти ресуспендують протягом години у 0.4 мл 1.0% сапоніну (Calbiochem) та піддають руйнуванню шляхом інтенсивного переливання з допомогою піпетки. Для усунення будь-яких частинок, отримані композиції центрифугують протягом 15 хв. при 14000 g, після чого безпосередньо у супернатанті визначають концентрацію

гемоглобіну шляхом вимірювання поглинання при 405 нм, порівнюючи його зі стандартною концентрацією очищеного гемоглобіну.

Способи аналізу міграції клітин.

[00320]

Способи аналізу міграції клітин описані у науковій літературі, див., наприклад, спосіб, зазначений у роботі Brooks, et al., J. Clin. Invest 1997, 99:1390-1398 та інші відомі фахівцям у цій галузі способи вимірювання міграції клітин. У одному такому способі, мембрани з камер системи Transwell покривають субстратом (у цьому випадку, це - CD105 та/або VEGF), потім ці камери промивають та неспецифічне сайт - зв'язування блокують бичачим сировотковим альбуміном (BSA). Пухлинні клітини з субконфлюентних культур збирають, промивають та ресуспендують у міграційному буфері у присутності або з відсутністю досліджуваних антитіл. Потім пухлинні клітини дозволяють мігрувати до нижньої частини покритих мембран системи Transwell, позосталі на верхній частині мембрани клітини відокремлюють та клітини, які мігрують до нижньої частини фарбують кристалічним фіолетовим барвником. Кількісний аналіз клітинної міграції здійснюють шляхом безпосереднього підрахунку клітин у мікроскопічному полі.

Способи аналізу клітинної проліферації.

[00321] Аналіз клітинної проліферації може бути здійснено з допомогою способів, відомих фахівцям у цій галузі. Як тут описано, субконфлюентні ендотеліальні клітини людини (HUVEC) можуть бути ресуспендованими у буфері для проліферації, який містить малу кількість (5.0%) сироватки у присутності або у відсутності CM (25 мкл) з клітин ECV або ECVL, після чого їм дозволяють розвиватися протягом 24 год. Клітинну проліферацію можна кількісно обчислити шляхом вимірювання активності мітохондріальної дегідрогенази з допомогою наявного у продажу набору WST-1 (Chemicon). Також, як тут описано, кількісний аналіз проліферації можна здійснити шляхом вимірювання включення ³H з допомогою стандартних способів. (She et al., Int. J. Cancer, 108: 251-257 (2004)).

[00322] Також у цій галузі відомі та передбачені тут інші способи оцінки клітинної проліферації, додатково необмежені приклади яких більш детально описані у розділі прикладів.

Способи викликання CDC, ADCC та опсонізації.

[00323] Різні види терапії спрямовані на збільшення природної імунної відповіді організму на трансформовані клітини. Традиційні ефекторні способи охоплюють комплемент-залежний цитоліз ("CDC"), залежну від антитіл клітинну цитотоксичність ("ADCC") та фагоцитоз (очищення шляхом дії ретикулоендотеліальної системи після покриття клітини-мішені імуноглобуліном). Відомо, що у присутності антитіл деякі ефекторні клітини, як-то лімфоїдні клітини, які мають зв'язані з поверхнею рецептори для Fc-ділянок антитіл, опосередковують реакцію проти клітин-мішеней, яка має назву залежної від антитіл клітинної цитотоксичності ("ADCC"). З допомогою ADCC ці ефекторні клітини проявляють цитолітичну активність проти таких клітин-мішеней.

[00324] У стані *in vitro* спостерігають два типи реакцій ADCC. У класичних реакціях ADCC ефекторні клітини приєднуються до покритих антитілами клітин-мішеней та згодом викликають їх цитоліз (A. N. Greenberg et al., "Characteristics Of The Effector Cells Mediating Цитотоксичність Against Antibody-Coated Target Cells," ("Характеристики опосередкованої ефекторними клітинами цитотоксичності, спрямованої до покритих антитілами клітин-мішеней") Immunology, 21, p. 719 (1975)). Це приєднання ефекторної клітини до клітини-мішені веде до взаємодії Fc-ділянки антитіла, яке покриває клітину-мішень та Fc-рецептора ефекторної клітини. Одним з недоліків цього типу реакції ADCC є те, що її дії можуть заважати циркулюючі комплекси типу "антиген-антитіло", часто пов'язані з різними захворюваннями, які конкурують з антитілами, що зв'язуються з клітинами-мішенями за Fc-рецептори ефекторних клітин (I. C. M. MacLennan, "Competition For Receptors For Immunoglobulin On Cytotoxic Lymphocytes," ("Конкурування за рецептори імуноглобуліну на цитотоксичних лімфоцитах") Clin. Exp. Immunol., 10, p. 275 (1972)). Через ці недоліки класичної реакції ADCC може бути застосовано другий тип цієї реакції - спрямована до антитіл реакція ADCC, в якій специфічне до мішені антитіло спочатку прикріплюється до ефекторної клітини та отриманий комплекс потім "спрямовується" антитілом до свого специфічного антигену на поверхні клітини-мішені. Переважним чином спрямованій до антитіл реакції ADCC не може заважати наявність циркулюючих у системі хазяїна комплексів типу "антиген-антитіло". Взаємодія між антитілами та ефекторними клітинами за рахунок прикріплення Fc-ділянки до Fc-рецептора звичайно є слабкою та у певних випадках антитіла не залишаються зв'язаними з ефекторними клітинами протягом часу, достатнього для забезпечення лізису клітин-мішеней. У зв'язку з цією потенційною проблемою, процес прикріплення з ефекторними клітинами здійснюють з застосуванням попередньої обробки поліетиленгліколом та сумішшю фталатних масел ((J. F. Jones and D. M. Segal, "J. Immunol., 125, pp. 926-33 (1980)). Застосовність цього способу для лікування *in vivo*, однак, може бути

принижено через токсичні дії для організму будь-яких залишків поліетиленгліколю та фталатних масел, спрямованих до антитіло-ефекторного клітинного комплексу.

[00325] Альтернативним чином також запропоновано спосіб посилення спрямованої до антитіл реакції ADCC шляхом ад'ювантної хімотерапії з цитотоксичними ліками (I. R. Mackay et al., Cancer Immunol. Immunother., 16, pp. 98-100 (1983)). Аналітичні способи перевірки для ADCC є добре відомими у цій галузі (Див., наприклад, патент США US Patent No. 5,756,097).

[00326] Відповідним чином, у зазначених втіленнях передбачені антитіла, які можуть зв'язуватися з клітинами, які відіграють певну роль у неоваскуляризації або ангіогенезі, які можуть посилювати фагоцитоз та загибель та тим самим підвищити захист у природних умовах. Також запропоновані інші антитіла та їх функціональні фрагменти, які вступають у імунну реакцію, специфічно зв'язуються з, або переважно зв'язуються з сайтом зв'язування або епітопом, до якого такі антитіла можуть зв'язуватися та які мають таку ж саме дію.

[00327] Антитіло також може бути опсонічним або демонструвати опсонічну активність для клітин, які відіграють певну роль у неоваскуляризації або ангіогенезі (наприклад, ендотеліальних клітин). Як зрозуміло фахівцям, "опсонічна активність" має відношення до здатності опсоніну (звичайно або антитіла або сироваткового фактора C3b) зв'язуватися з антигеном або клітинним рецептором для сприяння прикріплення антигену або клітинного рецептора до фагоциту, тим самим підсилюючи фагоцитоз. Деякі клітини стають надзвичайно привабливими для фагоцитів, як-то нейтрофілів та макрофагів, коли вони є покритими опсонічними антитілами та їх швидкість виведення з кровотоку різко підвищується. Опсонічна активність може бути виміряна будь-яким стандартним способом, як описано, наприклад, у патенті США № 6,610,293.

[00328] У іншому необмеженому втіленні у пацієнта, який має неоваскулярний розлад або залежний від ангіогенезу розлад спостерігається розповсюдження антигенів/пептидів (наприклад, CD105) від ангіогенезу. Ці антигени/пептиди можуть бути "антигенами, пов'язаними з пухлинами". Таким пацієнтам можуть бути соматично введені антитіла до антигену/пептиду (наприклад, CD105) та можна застосовувати будь-який з описаних тут шляхів для викликання CDC, ADCC, опсонізації або будь-якої іншої форми клітинно-опосередкованого знищення.

Додаткові аналізи.

[00329] Для перевірки дії описаних тут композицій також можуть бути застосовані інші відомі у цій галузі способи аналізу, наприклад, описані у прикладах нижче.

Приклади.

[00330] Ця заявка може бути краще зрозумілою з посиланням на наступні необмежені приклади, які наведені в якості зразкових варіантів її втілення. Наступні приклади наведені для більш докладної ілюстрації зразкових втілень та жодним чином не повинні бути витлумачені у якості обмеження широкого обсягу винаходу. У той час, як деякі втілення цієї заявки були показані та описані тут, буде очевидно, що такі втілення надані тільки у якості прикладу. Також можуть мати місце численні варіації, зміни та заміни та слід розуміти, що різні альтернативи втілень, описаних в даному документі можуть бути застосовані у практичному втіленні описаних тут способів.

Приклад 1: Зразкові схеми дозувань для введення.

[00331] Описані тут оптимальні схеми дозувань для введення антитіл та їх антиген-зв'язуючих фрагментів можуть бути визначені з застосуванням відомих у цій галузі способів та описаним вище шляхом.

[00332] У одному необмеженому втіленні описані тут антитіла можуть бути введені суб'єкту протягом різних періодів часу. Доза(дози) антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента може бути введена двічі на тиждень, щотижнево, кожні 2 тижні, кожні 3 тижнів, кожні 4 тижня, кожні 6 тижнів, кожні 8 тижнів, кожні 12 тижнів або може бути застосована будь-яка комбінація тижнів. Також передбачені певні цикли дозування, як-то, наприклад, введення антитіл раз або два рази на тиждень протягом 4 тижнів з наступним двотижневим періодом без терапії. Також тут передбачені додаткові цикли дозування, які охоплюють, наприклад, різні комбінації доз та описані тут тижневі цикли.

Приклад 2: Аналіз BIAcore (поверхневий плазмонний резонанс: (SPR)).

[00333] Спорідненість антитіл може бути оцінена з застосуванням, наприклад, аналізу BIAcore з допомогою стандартних протоколів. Стисло кажучи, антитіло до гістидинової мітки приєднується до чипу BIAcore для захоплення міченого гістидином рекомбінантного білка людини CD105, який, в свою чергу, застосовують для вимірювання зв'язування анти-CD105 антитіла. SPR-аналіз здійснюють мінімум з двома партіями композиції від чипу з додатковими аналітичними партіями (8 партій). В ході проведення цього аналізу досліджують наступні параметри:

(a) Приєднання анти-гістидинового антитіла до чипів CM5.

[00334] Антитіло до гістидинової мітки приєднують до чипу BIAcore CM5 шляхом стандартної аміної хімії з застосуванням EDC/NHS зв'язування (EDC - 3-диметил амінопропіл)карбодіїмід; NHS - N-гідроксисукцинімід). Умови реакції (концентрація та pH) можуть бути оптимізовані.

5 (b) Зв'язування людського CD105 та відновлення біосенсорного чипу.

[00335] Були перевірені умови зв'язування людського CD105 та відновлення чипу з застосуванням різних буферів (на основі попереднього досвіду) для елюювання зв'язаних антитіл. Одразу після розробки потенційного способу відновлення були здійснені вимірювання зв'язувальної здатності та фону поверхні одиничного чипу, які тривали протягом принаймні 25 циклів. Метою досліджень є отримання середнього підвищення фону, яке б становило < 10 RU (резонансних одиниць) на цикл та зменшення зв'язувальної здатності, яке б становило < 1 % на цикл.

(c) Зв'язування людського CD105.

[00336] Дозозалежний ефект людського CD105 вимірюють з метою визначення прийнятної концентрації для досягнення максимального зв'язування.

(d) Зв'язування анти-CD105 антитіла.

[00337] Дозозалежний ефект анти-CD105 антитіла вимірюють з метою визначення прийнятного діапазону для експериментів по кінетичному або рівноважному зв'язуванню (який може включати в себе порівняння відносних кінетичних констант k_a та k_d або порівняння відносної активності з допомогою способу паралельних ліній).

(e) Експерименти попередньої перевірки.

[00338] Експерименти по зв'язуванню у вибраних умовах повторюють принаймні тричі з застосуванням різних чипів, різних клітин потоку та у різних умовах з метою отримання попередньої інформації про точність та вірність вимірювань. Всі експерименти BIAcore проводять при температурі 25° C у рухливому буфері HBS-EP.

Приклад 3: ІФА-аналіз зв'язування анти-CD105 антитіла.

[00339] Для оцінки зв'язування анти-CD105 антитіл з CD105. може бути застосовано ІФА аналіз. Стисло кажучи, ІФА здійснюють у відповідності з наступними етапами:

1. На планшет наносять MAB9811-01 (моноклональні анти-CD105 антитіла) з концентрацією у 1500 нг/мл у PBS, 100 мкл/лунку. Планшет заклеюють з допомогою приладу для заклеювання планшетів та інкубують протягом ночі (16-24 год.) при 4°С.

2. Планшет промивають 2X 200 мкл PBS (без Tween).

3. Планшет промивають 3X PBS, який містить Tween (PBS-T).

4. Додають CD105 у PBS-T з 0.1% BSA (100 мкл/лунку; 100 нг/мл) та інкубують 60 хв. при кімнатній температурі.

5. Планшет промивають 3X PBS-T.

5. У досліджувані лунки додають 100 мкл/лунку анти-CD105 антитіл з концентрацією 20, 10, 4, 2, 1, 0.5 та 0.2 нг/мл (розведені у PBS-T з 0.1% BSA) та планшет інкубують 60 хв. при кімнатній температурі. До лунок негативного контролю додають 100 мкл/лунку ізотипічно подібних контрольних антитіл.

7. Планшет промивають 3X PBS-T.

8. У всі лунки додають козячі антитіла до людського імуноглобуліну IgG, кон'юговані з пероксидазою хрину (100 мкл/лунку, розведені 1:10000 у PBS-T з 0,1% BSA); інкубування триває 30-60 хв. при кімнатній температурі.

9. Планшет промивають 5X PBS-T.

10. Додають розчин субстрату TMB (100 мкл/лунку) та планшет інкубують у непокриту стані у темному місці протягом 15 хв..

11. Реакцію зупиняють шляхом додавання 100 мкл/лунку стоп-розчину TMB.

[00340] Зразки досліджують тричі та оптичну густину вимірюють з побудовою стандартної кривої та визначення константи зв'язування. Статистичний аналіз проводять з застосуванням t-тесту Стьюдента або іншого стандартного тесту.

[00341] Зрозуміло, що подібну схему також можна застосувати для перевірки зв'язування антитіл з VEGF.

Приклад 4: Авидність антитіла та кількість доступних епітопів у клітинах з експресією CD105.

[00342] Авидність антитіла та кількість доступних епітопів у клітинах з експресією CD105 може бути оцінена з допомогою аналізів графіка Скетчарда з застосуванням стандартних умов.

[00343] Стисло кажучи, були здійснені аналізи прямого зв'язування мічених радіоактивною міткою анти-CD105 антитіл з лейкозними клітинами KM-3 з експресією CD105 та субконфлюентними проліферуючими клітинами HUVEC з застосуванням графіка Скетчарда. Очищені анти-CD105 антитіла індивідуальним чином помітили радіоактивною міткою (¹²⁵I) з

застосуванням способу Iodo-Gen та згідно зі стандартними способами, які відомі фахівцям у цій галузі. Мічені радіоактивною міткою анти-CD105 антитіла відповідно досліджували на кількість атомів йоду (в середньому) на молекулу IgG. Експерименти по титруванню проводили з застосуванням фіксованої кількості (0.1 мкг) кожного міченого ¹²⁵I моноклонального антитіла та дворазових серійних приростів клітина KM-3 з експресією CD105 або клітин HUVEC для визначення антиген-зв'язуючої активності. Аналіз результатів зв'язування з застосуванням графіка Скетчарда проводили у відповідності з відомими способами. З допомогою цього аналізу було обчислено константу рівноваги та середнє максимальне число зв'язаних моноклональних антитіл на клітину.

Приклад 5: Вестерн-блот аналіз блокуючої активності.

[00344] Здатність анти-CD105 антитіл блокувати стимульоване білком CD105 активування клітин, у яких відбувається експресія цього білка може бути досліджена шляхом Вестерн-блот аналізу для визначення фосфорильовання білків, залучених до шляху сигналування CD105.

[00345] Вестерн-блот аналіз було здійснено для визначення фосфорильованих білків Smad1/5/8 або Smad2 у відповідності з відомими способами проведення цього аналізу. Антитіла PSmad1 та PSmad2 специфічно впізнають фосфорильований білок Smad1/5 або фосфорильований білок Smad2 у нетрансфікованих ендотеліальних клітинах. Для визначення молекул у зразках були застосовані перші антитіла до Smad1, Smad2, Smad5, Id1 (Santa Cruz) та CD105. Визначення було здійснено шляхом підсиленої хемолюмінесценції (ECL).

Приклад 6: Пригнічення росту клітин HUVEC та аналіз включення ³H-тимідину.

[00346] Кількість аналізів була прийнятною для оцінки пригнічення клітинного росту.

[00347] У одному прикладі клітини HUVEC культивували у флаконах з площиною поверхні 75 см² (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) у інкубаторі з CO₂ та температурою 37°C у субконфлюентних умовах. Відокремлення клітин здійснювали шляхом 15-хвилинного інкубування у збалансованому сольовому розчині Хенкса з 15 mM EDTA у 25 mM буфері HEPES, pH 7.3 при температурі 37°C. Після подвійного промивання крижаним PBS, клітини ресуспендували у ростовому середовищі ендотеліальних клітин з концентрацією у 25,000 клітин/мл.

[00348] У додаткових експериментах, ендотеліальні клітини пупкової вени людини (HUVEC) суспендували та культивували у вільному від ембріональної телячої сироватки (FBS) та екстрактів бичачого мозку ростовому середовищі ендотеліальних клітин. Аліквоту (200 мкл) клітинної суспензії посіяли у кожну лунку 96-луночного культурального планшета та клітини культивували у інкубаторі з CO₂ та температурою 37°C протягом ночі, після нього до них додали (у трьох примірниках) анти-CD105 антитіла, анти-VEGF антитіла, комбінацію анти-CD105 антитіл та анти-VEGF антитіл та контроль (IgG або TGF-β1). Культуральні планшети зберігали у інкубаторі протягом 72 год. з заміщенням (кожні 24 години) свіжого середовища та антитіл або контролів. Потім до кожної лунки додали ³H-тимідин (1 мкК) та планшети інкубували ще протягом 20 год. Далі клітини промили PBS та обрабили розчином трипсин-EDTA (0.05% трипсин, 0.53 mM EDTA; 100 мкл/лунку) з наступним 15-хвилинним інкубуванням при 37°C. Збір клітин здійснювали на фільтрах зі скловолна (Wallac Printed FiltermatA) з застосуванням автоматичного колектору клітин Harvester 96 (TOMTEC, HBMDen, CT) та ³H-радіоактивність визначали з допомогою лічильника Trilux 1540 MicroBeta Liquid Scintillation and Luminescence Counter (Wallac, Turku, Finland).

Приклад 7: Аналіз пригнічення клітинної міграції.

[00349] Вимірювання міграції (хемокінезу) у якості показника клітинної проліферації та активування здійснювали з застосуванням камери Бойдена.

[00350] Стисло кажучи, оцінку клітинної міграції проводили наступним чином: нуклеопорний фільтр Costar (з порами у 8 мкм) покрили фібронектином та інкубували при 4°C протягом ночі. Камеру промили фосфатно-сольовим буфером (PBS) та нижню камеру наповнили середовищем DMEM з сироваткою або без неї та з білком TGF-β3 або без нього. Клітини трипсинізували та суспендували з кінцевою концентрацією у 50,000 клітин/мл у середовищі DMEM з присутністю контрольних антитіл, анти-CD105 антитіл, анти-VEGF антитіл або їх комбінацій, після чого до верхньої камери додали аліквоту (150 мкл) клітинної суспензії та камеру інкубували при 37°C. Через 16 год. клітини промили та верхню поверхню протерли для видалення клітин, які не мігрували. Потім мембрани зафіксували у метанолі, промили водою, піддали фарбуванню та підраховували кількість клітин, присутніх на нижній поверхні.

Приклад 8: Аналіз ADCC.

[00351] Описані тут антитіла можуть бути оцінені щодо їх здатності генерувати IL-2-активовані природні кілерні (NK) клітини та викликати ADCC з застосуванням, наприклад, наступних процедур:

Виділення клітин NK та отримання клітин NK, активованих IL-2.

[00352] Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК; PBMC) виділили та залишили відпочивати на 24 год. при 4°C у розчині RPMI з 10% FBS. Потім ці клітини помістили у розчин RPMI з 2% FBS (повний об'єм - 50 мл) та 10 мл клітинної суспензії нанесли у чашку Петрі. Клітини МКПК інкубували протягом 2 год. при 37°C та зібрали неприкріплені клітини. Клітини NK культивували у кількості 8×10^6 /мл з 1000 од./мл IL-2 протягом 48 год. з наступним 5-8 денним нормальним культивуванням перед проведенням аналізу.

Аналізи природної цитотоксичності та ADCC.

[00353] Клітини NK вилучили з культури (відскрібанням) та зібрали у 50 мл конічній пробірці. Потім клітини один раз промили середовищем RPMI (повний склад) та піддали 10-хвилинному центрифугуванню при 1200 об/хв. Потім клітини NK ресуспендували у 5 мл середовища RPMI (повний склад) та підраховували. Перед проведенням аналізу, кількість клітин NK нормалізували до співвідношення ефектор:мішень, як 10:1. Нормалізовані клітини NK нанесли на планшети, до призначених лунок додали 10 мкл анти-CD105 антитіл та планшети інкубували 30 хв. при 37°C. Контрольні зразки містили необроблені або оброблені контрольними антитілами клітинні популяції.

[00354] Інтересуючі клітини-мішені зібрали (клітини HUVEC), промили, піддали 10-хвилинному центрифугуванню при 1200 об/хв. та ресуспендували у 5 мл середовища RPMI (повний склад). Потім клітини-мішені знову промили та ресуспендували у безсироватковому середовищі RPMI до кінцевої концентрації у 1×10^6 клітин /мл. Потім ці клітини помістили кальцеїном-АМ з кінцевою концентрацією 5 мкг/мл та інкубували протягом години 1 при 37°C, після чого їх двічі промили середовищем RPMI (повний склад). Далі клітини-мішені ресуспендували та додали до лунок з клітинами NK. Комбінацію клітин-мішеней та клітин NK потім інкубували при 37°C протягом 4 год. Після інкубування планшети піддали 5-хвилинному центрифугуванню при 1200 об/хв. та клітини промили та ресуспендували у DPBS. Флуоресценцію зчитували з застосуванням співвідношення емісії/збудження у 450/530 нм та емісія була показником опосередкованої антитілами загибелі клітин.

Приклад. 9: Оцінка стійкості композицій TRC105 (анти-CD105 антитіл).

[00355] Винахідники визначили композиції, які забезпечують адекватну стійкість при концентраціях TRC105, вищих, ніж 5 мг/мл. Початкові дослідження показали, що можна досягти концентрації TRC105 у принаймні 25 мг/мл без будь-яких очевидних обмежень розчинності, отже у якості початкової концентрації TRC105 для скринінгових досліджень була вибрана концентрація у 25 мг/мл. Протягом курсу цих досліджень була проведена оцінка композицій з концентраціями TRC105, які перевищували 50 мг/мл. Додатково також було проведено оцінку композицій з концентраціями TRC105 у 7 мг/мл та 100 мг/мл.

Процедури.

Спектроскопія з ультрафіолетовим (УФ) поглинанням.

[00356] УФ-спектроскопію застосовували для визначення концентрації білка у зразках різної стійкості. Було визначено, що поглинання нефасованої речовини при довжині хвилі у 280 нм (7,0 мг/мл), яке дорівнювало 1,13 при застосуванні довжини пробігу клітини у 1 мм, веде до появи коефіцієнту екстинції у 1,61 мл/мг·см. Це значення було застосовано для всіх обчислень у цьому проекті. Додаткові вимірювання також було проведено із застосуванням 0,0096 см клітини, що більш пасує до зразків високої концентрації.

Інкубування термостійких зразків TRC105.

[00357] Кожну термостійку композицію було пропущено через фільтр Millex (0.22 мкм) з прикріпленим шприцом Luer lock, після чого його аліквоти помістили у флакони для ліофілізації об'ємом 1 мл та кожен флакон герметично закрили пробкою з бутилкаучуку з наступним обжиманням алюмінієвою кришкою. Зразки помістили при вказаній температурі до кліматичних камер та потім вони були вилучені після зазначеного періоду інкубування, який сягав протягом декількох тижнів.

Заморожування-відтавання та струшування TRC105.

[00358] Зразки для заморожування-відтавання (F/T) заморозили на 25 хв. та потім піддали відтаванню 0 або 3 або 5 разів протягом 25 хв. Всі операції заморожування здійснювали при температурі -80°C. Зразки після відтавання перевіряли на повне відтавання перед новим заморожуванням. Кожен зразок для заморожування-відтавання містив 100 мкл розчину та його зберігали у 0.5 мл мікропробірках (Eppendorf). Кожен зразок містив 0.1% F68, 0.005% Tween 80 або не містив поверхнево-активних речовин.

[00359] Зразки для досліджень струшування отримали у кількостях 350 мл на колбу та помістили ті з них, що були призначені для струшування та для нерухомого стану. Всі зразки перенесли у холодну кімнату з температурою 4°C. Зразки, помічені призначеними для

струшування розмістили на круговій качалці зі швидкістю хитання у 150 об/хв. Зразки, помічені призначеними для стану спокою розташували на полиці поблизу кругової качалці. Кожен зразок містив 0.1% F68, 0.005% Tween 80 або не містив поверхнево-активних речовин. Зразки інкубували протягом 24 год. у зазначених умовах.

5 Ексклюзійна хроматографія (SEC).

[00360] Була отримана рухлива фаза, яка містила 0.2 М моноосновний фосфат натрію, рН якої довели до 7.0 з застосуванням 1.0 М NaOH. Для всіх хроматографічних операцій була застосована колонка TSK Gel G3000 PWxl (7.8 мм × 30 см, частинки # P0047-02PN(7 мкм)) зі швидкістю потоку 1 мл/хв. та довжиною хвилі визначення у 280 нм. Об'єм ін'єкції дорівнював 2 мкл для зразків з концентрацією 25 мг/мл та 1 мкл для зразків з концентрацією 50 мг/мл. Перед нанесенням кожного зразка (дослідження кожного зразка повторювали тричі) колонку кілька раз промивали буфером та ці хроматограми були, відповідно, відняті. Об'єднання піків було проведено з допомогою програмного забезпечення Chromeleon 6.08.

Капілярне ізоелектричне фокусування (cIEF).

15 [00361] Аналіз шляхом капілярного ізоелектричного фокусування (cIEF) проводили, як описано у PA 800 plus Application Guide published by Beckman Coulter. Більш детальний опис можна знайти у Mack et al. (Electrophoresis 2009, 30 (23), 4049-4058). Всі аналізи здійснювали з застосуванням системи для капілярного електрофорезу Beckman Coulter P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Inc.; Brea, CA) при температурі навколишнього середовища з повною довжиною нейтрального капіляру, яка дорівнювала 30 см (ефективна - 20 см) (внутрішній діаметр - 50 мкм). Нейтральний капіляр було отримано шляхом іммобілізації полі(акриламід) до капілярної стінки з застосуванням способу, описаного у Gao et al. (Anal Chem 2004, 76 (24), 7179-7186). Всі зразки для cIEF-аналізу були отримані шляхом змішування інтересуючого білка з концентрацією 0.25 мг/мл з сумішшю гелю urea-cIEF від 3М, який містив амфоліт, катодний стабілізатор, анодний стабілізатор та маркери для ізоелектричної точки (pI). Зразки вводили у капіляр під тиском 0, 655 бар протягом 4.1 хв., після чого їх зосереджували протягом 15 хв. між анодом та катодом з застосуванням напруги у 25 кВ. Після цього протягом 30 хв. відбувалася хімічна мобілізація речовини при 30 кВ між анодом та хімічним мобілізатором. Маркери pI та інтересуючий білок визначали під час етапу мобілізації при довжині поглинання у 280 нм. pI білка обчислювали з допомогою отриманого рівняння регресії pI у порівнянні з моментом першого піку, отриманим при застосуванні pI - стандартів.

Результати та обговорення.

Дослідження 1.

35 [00362] Зразки TRC105 були успішно піддані концентруванню до концентрацій, які перевищували 5 мг/мл. В результаті цього, дослідження 1 проводили з застосуванням концентрації білка у 25 мг/мл. Зразки зберігали протягом двох тижнів при температурі 40°C. 16 композицій були отримані з зосередженням на впливі рН та буферної композиції (Таблиця 2). Основним аналітичним способом, застосованим для оцінки стійкості цих зразків була ексклюзійна хроматографія (SEC). Після зберігання протягом двох тижнів при 40°C при застосуванні SEC спостерігали дуже маленький заряд як для мономерного вмісту, так і для агрегатів з високою молекулярною масою (Таблиця 3). Всі композиції зберегли більш, ніж 99% мономерів після зберігання.

Таблиця 2

Склад композиції TRC105, оцінку якої проводили у дослідженнях 1

№ композиції	pH	Фосфат (мМ)	Гістидин (мМ)	Цитрат (мМ)	Ацетат (мМ)	NaCl (мМ)	Трегалоза (мМ)
F01	7	20	0	0	0	130	0
F02	6	20	0	0	0	130	0
F03	6	0	20	0	0	130	0
F04	5	0	20	0	0	130	0
F05	6	0	0	20	0	130	0
F06	5	0	0	20	0	130	0
F07	4	0	0	0	20	130	0
F08	5	0	0	0	20	130	0
F09	5	0	20	0	0	0	240
F10	5	0	0	20	0	0	240

Таблиця 2

Склад композиції TRC105, оцінку якої проводили у дослідженнях 1

№ композиції	pH	Фосфат (мМ)	Гістидин (мМ)	Цитрат (мМ)	Ацетат (мМ)	NaCl (мМ)	Трегалоза (мМ)
F11	5	0	0	0	20	0	240
F12	6	10	0	0	0	0	240
F13	6	0	10	0	0	0	240
F14	6	10	0	0	0	80	120
F15	6	0	10	0	0	80	120

Таблиця 3

Підсумкові результати досліджень рівнів мономерів та агрегатів, виміряні шляхом SEC для композицій з досліджень 1 у початкову точку часу та через два тижні (t2)

№ композиції	pH	Початковий % агрегатів	Початковий % мономерів	% агрегатів через два тижні	% мономерів через два тижні
F01	7	0,32	99,54	0,48	99,52
F02	6	0,19	99,70	0,22	99,71
F03	6	0,19	99,78	0,14	99,82
F04	5	0,14	99,82	0,13	99,85
F05	6	0,19	99,78	0,28	99,71
F06	5	0,13	99,83	0,21	99,77
F07	4	0,11	99,86	0,10	99,88
F08	5	0,11	99,85	0,26	99,72
F09	5	0,16	99,81	0,09	99,90
F10	5	0,13	99,84	0,19	99,79
F11	5	0,15	99,82	0,16	99,82
F12	6	0,19	99,78	0,53	99,45
F13	6	0,21	99,76	0,15	99,81
F14	6	0,20	99,76	0,45	99,52
F15	6	0,21	99,79	0,21	99,77

[00363] Було відмічено, що TRC105 був дуже стійким.

Дослідження 2.

- 5 [00364] Після отримання результатів дослідження 1 було розроблено план досліджень 2. У цих дослідженнях pH змінювали у діапазоні від 4,0 до 5,5 з оцінкою ацетату, гістидину та цитрату. У якості модифікаторів/стабілізаторів для цих досліджень були вибрані сорбіт та трегалоза. Зрештою, окрім композицій з концентрацією 25 мг/мл, також були перевірені три композиції з концентрацією 50 мг/мл.

10

Таблиця 4

Склад композиції TRC105, оцінку якої проводили у дослідженнях 2

№ композиції	pH	Білок Мг/мл	Гістидин (мМ)	Цитрат (мМ)	Ацетат (мМ)	Сорбіт	Трегалоза
F01	5,5	25	0	0	20	0	0
F02	4,5	25	0	0	20	0	0
F03	5,5	25	0	20	0	0	0
F04	5,5	25	20	0	0	0	0
F05	4,5	25	0	0	10	0	0
F06	4,0	25	0	0	10	0	0
F07	5,5	25	20	0	0	240	0
F08	5,5	25	20	0	0	0	240
F09	4,0	25	0	0	20	240	0

Таблиця 4

Склад композиції TRC105, оцінку якої проводили у дослідженнях 2

№ композиції	pH	Білок Мг/мл	Гістидин (мМ)	Цитрат (мМ)	Ацетат (мМ)	Сорбіт	Трегалоза
F10	4,0	25	0	0	20	0	240
F11	5,5	25	0	10	0	240	0
F12	5,5	25	0	10	0	0	240
F13	5,5	25	10	0	0	240	0
F14	5,5	25	10	0	0	0	240
F15	4,0	50	0	0	10	0	0
F16	5,0	50	0	0	20	0	0
F17	5,5	50	20	0	0	240	0

[00365] Враховуючи стійкість композицій TRC105, ці зразки зберігали протягом чотирьох тижнів при 40°C з метою спробувати більш докладніше відрізнити композиції. Головним засобом перевірки була SEC-хроматографія.

5

Таблиця 5

Підсумкові результати досліджень рівнів мономерів та агрегатів, виміряні шляхом SEC для композицій з досліджень 1 у початкову точку часу та через чотири тижні

№ композиції	pH	Буфер	Початковий % агрегатів	Початковий % мономерів	% агрегатів через чотири тижні	% мономерів через чотири тижні
F01	5,5	ацетат	0,17	99,83	0,27	99,73
F02	4,5	ацетат	0,10	99,90	0,16	99,84
F03	5,5	цитрат	0,14	99,86	0,22	99,78
F04	5,5	гістидин	0,17	99,83	0,13	99,87
F05	4,5	ацетат	0,11	99,89	0,14	99,86
F06	4,0	ацетат	0,10	99,90	0,12	99,88
F07	5,5	гістидин	0,15	99,85	0,13	99,87
F08	5,5	гістидин	0,23	99,77	0,16	99,84
F09	4,0	ацетат	0,14	99,86	0,15	99,85
F10	4,0	ацетат	0,15	99,85	0,15	99,85
F11	5,5	цитрат	0,16	99,84	0,30	99,70
F12	5,5	цитрат	0,21	99,79	0,28	99,72
F13	5,5	гістидин	0,19	99,81	0,15	99,85
F14	5,5	гістидин	0,27	99,73	0,16	99,84
F15	4,0	ацетат	0,17	99,83	0,16	99,84
F16	5,0	ацетат	0,19	99,81	0,85	99,15
F17	5,5	гістидин	0,24	99,76	0,26	99,74

[00366] Подібно до спостереженого у дослідженнях 1, вміст мономерів майже всіх мономерів у наведених вище композиціях перевищував 99,5% навіть після місяця зберігання при температурі 40°C (Таблиця 5). Схоже, що один зразок (F16) показав підвищений рівень агрегації, однак цей зразок не було піддано повторній перевірці, щоб переконатися в тому, що це був дійсно вірний результат. Схоже на те, що показники pH 4 у ацетаті та pH 5.5 у гістидині забезпечують адекватну та прийнятну для порівняння стійкість. Через проблеми з цитратом та подразнення, його було вилучено з подальшого розгляду.

[00367] Ці зразки також піддали аналізу з застосуванням капілярного ізоелектричного фокусування (cIEF). Спочатку були здійснені обчислення загального центру cIEF-електрофорограми. Ці значення можуть вважатися середніми значеннями pI зразка (Таблиця 6).

Таблиця 6

Середнє значення рІ для композицій TRC з досліджень 2 у початкову точку часу та через чотири тижні

№ композиції	pH	Буфер	Початкове значення	Значення через 4 тижні
F01	5,5	ацетат	8,97	8,88
F02	4,5	ацетат	8,76	8,94
F03	5,5	цитрат	8,84	8,88
F04	5,5	гістидин	8,94	8,88
F05	4,5	ацетат	8,78	8,87
F06	4,0	ацетат	8,86	8,89
F07	5,5	гістидин	8,87	8,88
F08	5,5	гістидин	8,93	8,87
F09	4,0	ацетат	8,92	8,90
F10	4,0	ацетат	8,92	8,92
F11	5,5	цитрат	8,96	8,87
F12	5,5	цитрат	8,92	8,85
F13	5,5	гістидин	8,91	8,90
F14	5,5	гістидин	8,95	8,92
F15	4,0	ацетат	8,90	8,87
F16	5,0	ацетат	8,90	8,86
F17	5,5	гістидин	8,95	8,93

5 [00368] Загальним чином, мале змінення значення рІ для будь-якої композиції свідчить про те, що деамідування, тобто гідроліз аспарагіну бічних ланцюгів, який веде до утворення заряджених аспарагінових продуктів є відносно низьким (Таблиця 6). Отже, схоже, що ці композиції TRC105 є фізично стійкими (тобто мають низький рівень агрегації або взагалі її не мають) та хімічно стійкими (тобто не розпадаються на фрагменти та мають низький рівень деамінування або взагалі його не мають).

10 [00369] Іншим питанням було виявити, чи будуть ці композиції з підвищеною концентрацією демонструвати неприйнятний рівень в'язкості, що тим самим обмежить їх клінічне застосування.

Таблиця 7

Динамічна в'язкість TRC105 у ацетатному та гістидиновому буфері при концентраціях у ~25 та ~50 мг/мл

Композиція	pH	[Білок]	В'язкість (сSt)
20 мМ ацетат	4,0	25,1	1,19 ± 0,01
	4,0	51,8	1,53 ± 0,01
20 мМ гістидин	5,5	23,8	1,22 ± 0,01
	5,5	47,6	1,65 ± 0,04

15 [00370] Навіть при концентрації у 50 мг/мл, TRC105 демонструє в'язкість, яка є меншою, ніж 2 сСт, що є значно нижчим, ніж будь-яке значення, яке буде спричинювати обмеження у застосуванні цього композиції та у поводженні з ним (див. Таблицю 7).

Дослідження струшування.

20 [00371] Хоча тепловий стрес є корисним для розрізнення композицій різної стійкості, білки можуть зустрітись не тільки зі стресом. Також звичайно мають місце поверхневі пошкодження білків та чутливість до таких пошкоджень також треба оцінити. Це було здійснено з допомогою перевірки на струшування та повторюючихся циклів заморожування-відтавання (F/T).

Таблиця 8

Отриманий шляхом SEC мономерний вміст композицій TRC105, який струшували протягом 24 год. при 150 об./хв. та відповідні зразки, які зберігали у стані спокою. Всі зразки тримали при температурі 4°C

Композиція	Поверхнево-активна речовина	Білок	Мономер (Q)	Мономер (S)
pH 5, 20 mM ацетат	відсутня	25	99,84	99,84
	F68	25	99,83	99,83
	PS80	25	99,81	99,82
pH 5, 20 mM ацетат	відсутня	50	99,82	99,83
	F68	50	99,82	99,82
	PS80	50	99,81	99,83
pH 5,5, 20 mM гістидин	відсутня	25	99,75	99,76
	F68	25	99,74	99,76
	PS80	25	99,76	99,77
pH 5,5, 20 mM гістидин	відсутня	50	99,77	99,75
	F68	50	99,76	99,75
	PS80	50	99,76	99,77

[00372] Дослідники не спостерігали помітних втрат мономерів при струшуванні у всіх композицій, які показали більш, ніж 99,7% вмісту мономерів та відсутність значної різниці у порівнянні з контролем у стані спокою (Таблиця 8). Додавання поверхнево-активної речовини, як-то Pluronic F-68 або полісорбат 80, схоже не погіршує та не покращує стійкості при струшуванні.

Дослідження заморожування/відтавання.

[00373] Другі дослідження були присвячені перевірці чутливості TRC105 до поверхневого стресу, викликаного впливом повторюючихся циклів заморожування-відтавання. Така перевірка не тільки надає інформацію про поверхневі пошкодження (як-то поверхня розділу льоду та води), але й також надає необхідну інформацію про те, чи можуть зразки TRC105 бути заморожені для подальшого аналізу або під час їх перевезення.

Таблиця 9

Отриманий шляхом SEC мономерний вміст композицій TRC105, який піддали 0, 3 та 5 циклам заморожування/відтавання

Композиція	Поверхнево-активна речовина	Білок Мг/мл	0 циклів	3 циклів	5 циклів
pH 5, 20 mM ацетат	відсутня	25	99,86	99,83	99,82
	F68	25	99,84	99,81	99,82
	PS80	25	99,84	99,83	99,80
pH 5, 20 mM ацетат	відсутня	50	99,81	99,64	99,80
	F68	50	99,81	99,68	99,81
	PS80	50	99,82	99,65	99,80
pH 5,5, 20 mM гістидин	відсутня	25	99,79	99,74	99,72
	F68	25	99,79	99,75	99,73
	PS80	25	99,76	99,74	99,74
pH 5,5, 20 mM гістидин	відсутня	50	99,76	99,79	99,75
	F68	50	99,75	99,82	99,73
	PS80	50	99,75	99,79	99,73

[00374] Змінень мономерного вмісту під час повторюючихся циклів заморожування/відтавання практично відмічено не було. (Таблиця 9). Несподівано було показано, що додавання поверхнево-активної речовини, як-то Pluronic F-68 або полісорбат 80 не змінює стійкість під час цих циклів. Разом з результатами досліджень струшування це

свідчить про відсутність показань того, що TRC105 є настільки поверхнево-активним композиціям, що поверхневі пошкодження будуть становити проблему. Отже, немає необхідності у додаванні поверхнево-активних речовин до рідкої композиції.

Підсумки:

5 [00375] Скринінгові дослідження композиції були проведені з TRC105 з концентраціями білка до 50 мг/мл. Цей білок є досить стійким та SEC-хроматографічний аналіз виявив тільки незначні зменшення мономерного вмісту навіть після чотирьохтижневого зберігання при 40°C та не виявив жодного випадку його фрагментації. Тим часом cIEF-аналіз виявив тільки незначні зміння загальної ізоелектричної точки (pI), що свідчить про те, що деамідування у

10 досліджуваному діапазоні рН (4.0-5.5) було мінімальним. Не виявлено доказів чутливості цієї композиції до поверхневого пошкодження, що свідчить про те, що рідка композиція TRC105 не потребує додавання поверхнево-активної речовини.

[00376] У складі основних композицій було застосовано ацетатний буфер з рН 4.0 або гістидиновий буфер з рН 5.5 разом з сорбітом або трегалозою у якості модифікатора тоничності

15 та стабілізатора.

Приклад 10: Оцінка довготривалої стійкості композицій TRC105 .

[00377] Оцінку довготривалої стійкості проводили з метою перевірки результатів досліджень 1 та 2. Наведені у Таблиці 10 зразки композицій зберігали при температурі 5°C та 25°C.

Таблиця 10

Композиції для перевірки досліджень

№ композиції	Композиція	[білок]
F01	рН 5,5, 20 мМ гістидин, 240 мМ трегалоза	25 мг/мл
F02	рН 5,5, 20 мМ гістидин, 240 мМ сорбіт	25 мг/мл
F03	рН 4,0, 20 мМ ацетат, 240 мМ сорбіт	25 мг/мл
F04	рН 5,5, 20 мМ гістидин, 240 мМ трегалоза	50 мг/мл
F05	рН 4,0, 20 мМ ацетат, 240 мМ трегалоза	50 мг/мл
F06	рН 5,5, 20 мМ гістидин, 240 мМ трегалоза	100 мг/мл
F07	рН 4,0, 20 мМ ацетат, 240 мМ трегалоза	100 мг/мл

Результати та обговорення.

[00378] Сім тестових композицій досліджували протягом року при температурі 5°C та 6 місяців при температурі 25°C. При температурі 5°C всі композиції показали добрі результати. Візуальні спостереження всіх зразків у всі періоди часу досліджень показали, що вони були прозорими та безбарвними. Значення рН всіх нових композицій також головним чином залишалися постійними, доки тривали дослідження (див. Таблиці 11 та 12). Вони мали незначне підвищення на 0,1-0,2 одиниці порівняно з контрольними зразками, але залишалися надалі у такому стані. Значення концентрацій нових композицій, які були визначені шляхом УФ-детекції також залишалися постійними з відхиленням у межах ~3-4 % від оригінального контрольного значення незалежно від концентрації (див. Таблиці 11 та 12). Ці значення також значно не змінювалися протягом курсу досліджень. З допомогою SEC-хроматографії було визначено мінімальний відсоток втрати мономерів при 5°C (див. Таблицю 13) та з допомогою cIEF-аналізу були визначені мінімальні значення хімічної деградації (див. Таблиці 15 та 16). Незважаючи на деякі відмінності у результатах зв'язування CD105, отриманих шляхом ІФА, всі значення (за виключенням початкових результатів для F05) знаходилися у межах критерію прийнятності, які дорівнювали 50% - 150% порівняно до подібних меж еталонного стандартного зразка, що узгоджується з етапом проведення ІФА-аналізу (див. Таблицю 17). Результати перевірки з допомогою капілярного електрофорезу у присутності додецилсульфату натрію (CE-SDS) свідчать про те, що зразки були прийнятними до порівняння з еталонним матеріалом при 5°C протягом одного року зберігання (дані не наведені).

[00379] У той час, як зразки, які зберігали при 5°C суттєво не змінилися, параметри композицій мали вплив на стійкість зразків при температурі 25 °C. Перш за все, композиції, які містили ацетатну буферну систему (F03, F05, F07) показали більше зменшення відсоткового мономерного вмісту у порівнянні з композиціями, які містили гістидиновий буфер (F01, F02, F04, та F06) (див. Таблицю 14). При цьому зміння концентрації білка скоріш за все мали незначний ефект або взагалі не мали ефекту. Дві композиції з концентраціями 100 мг/мл (F06, F07) можна порівняти з подібними композиціями з концентрацією 50 мг/мл (F04, F05) з точки зору їх SEC та cIEF профілей.

Таблиця 11

Показники pH та отримані з допомогою УФ-спектроскопії концентрації композицій (у мг/мл) при 5°C

№ композиції	Початкове значення		3 місяці		6 місяців		12 місяців	
	pH	конц.	pH	конц.	pH	конц.	pH	конц.
F01	5,6	25	5,6	24	5,6	27	5,6	24
F02	5,6	24	5,5	23	5,6	25	5,6	25
F03	4,2	25	4,2	25	4,3	27	4,2	26
F04	5,6	50	5,6	51	5,6	54	5,5	52
F05	4,2	50	4,3	52	4,3	54	4,2	52
F06	5,6	98	5,7	99	5,7	104	5,6	105
F07	4,3	99	4,4	102	4,4	108	4,3	102

Таблиця 12

Показники pH та отримані з допомогою УФ-спектроскопії концентрації композицій (у мг/мл) при 25°C

№ композиції	Початкове значення		3 місяці		6 місяців		12 місяців	
	pH	конц.	pH	конц.		pH	конц.	pH
F01	n/a	n/a	5,6	25	5,6	27	5,6	26
F02	n/a	n/a	5,6	24	5,6	25	5,6	24
F03	n/a	n/a	4,3	25	4,3	27	4,3	26
F04	n/a	n/a	5,8	50	5,6	53	5,6	51
F05	n/a	n/a	4,3	53	4,3	53	4,3	52
F06	n/a	n/a	5,7	100	5,8	105	5,6	105
F07	n/a	n/a	4,4	109	4,5	104	4,4	103

Таблиця 13

Ексклюзійна хроматографія (SEC) при 5°C

№ композиції	% мономерів			
	Початкове значення	3 місяці	6 місяців	12 місяців
F01	99,36	99,36	99,38	99,37
F02	99,37	99,37	99,34	99,37
F03	99,37	99,35	99,31	99,24
F04	99,35	99,33	99,32	99,31
F05	99,38	99,35	99,31	99,24
F06	99,24	99,22	99,19	99,18
F07	99,35	99,29	99,23	99,17

Таблиця 14

Ексклюзійна хроматографія (SEC) при 25°C

№ композиції	% мономерів		
	Початкове значення	3 місяці	6 місяців
F01	99,36	99,27	96,37
F02	99,37	99,28	96,25
F03	99,37	96,02	93,64
F04	99,35	99,18	96,51
F05	99,38	96,07	93,70
F06	99,24	98,99	96,23
F07	99,35	96,02	93,84

Таблиця 15

Результати cIEF-аналізу: середні значення ізоелектричної точки (pI) при 5°C

№ композиції	Середнє значення pI			
	Початкове значення	3 місяці	6 місяців	12 місяців
F01	9,0	8,9	9,0	9,0
F02	8,9	8,9	8,9	9,0
F03	8,9	8,9	9,0	9,1
F04	8,9	8,9	8,9	9,0
F05	8,9	8,9	8,9	9,0
F06	8,9	8,9	8,9	9,0
F07	8,9	8,9	8,9	9,0

Таблиця 16

Результати cIEF-аналізу: середні значення ізоелектричної точки (pI) при 25°C

№ композиції	Середнє значення pI		
	Початкове значення	3 місяці	6 місяців
F01	9,0	8,9	9,0
F02	8,9	9,0	8,9
F03	8,9	8,9	8,9
F04	8,9	8,9	8,9
F05	8,9	8,9	8,8
F06	8,9	8,9	8,9
F07	8,9	8,9	8,9

Таблиця 17

Результати ІФА-аналізу зв'язування CD105 при 5°C

№ композиції	Відсоток відносної зв'язувальної здатності CD105		
	Початкове значення	6 місяців	12 місяців
F01	101	94	68
F02	90	90	69
F03	124	NT	77
F04	123	97	74
F05	179	NT	96
F06	93	95	115
F07	100	NT	86

5 Приклад 11: Оцінка довготривалої стійкості композиції TRC105 (4 мг/мл).

[00380] Дослідження стійкості проводили з застосуванням композиції TRC105, отриманої з концентрацією 4 мг/мл у 17 мМ фосфатному буфері з 145 мМ NaCl при pH 7.2 (Lot FIN-0536). Були отримані дані щодо стійкості композиції при її 36-місячному зберіганні в рекомендованих умовах (з температурою 2-8°C) та зберіганні протягом одного місяця в умовах для прискорених досліджень (з температурою 25°C/ 60% відносної вологості). Результати досліджень стійкості наведені у таблицях нижче. Оскільки у будь-якому з проведених тестувань не було відмічено жодних значних змінень, ці дослідження вказують на те, що композиція TRC105, отримана з концентрацією 4 мг/мл у 17 мМ фосфатному буфері з 145 мМ NaCl при pH 7.2 зберігає свою стійкість протягом принаймні 36 місяців при температурі 2-8°C.

15

Таблиця 18

Результати досліджень стійкості TRC105 при зберіганні у рекомендованих умовах з температурою 2-8°C

Перевірка	Початок досліджень	6 місяців	9 місяців	12 місяців
Зовнішній вигляд та опис	Прозорий безбарвний розчин. Незначний сірий пил, подібний до частинок	Прозорий безбарвний розчин без видимої наявності частинок	Прозорий безбарвний розчин з незначною кількістю білих частинок.	Прозорий безбарвний розчин з незначною кількістю білих частинок.
SDS-PAGE невідновл.	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом
SDS-PAGE відновл.	98%	96%	97%	98%
IEF	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом
SEC-HPLC	96,62%	96,97 %	96,91 %	96,77 %
ІФА-аналіз зв'язування CD105	зв'язувальна активність дорівнює 88% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 110% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 104% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 91% порівняно з еталонним стандартом
УФ-поглинання (A ₂₈₀)	4,3 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл
pH	7,2	7,3	7,2	7,2
Стерильність	не перевірено	не перевірено	не перевірено	не перевірено

Таблиця 18 (продовження)

Перевірка	18 місяців	24 місяців	30 місяців	36 місяців
Зовнішній вигляд та опис	Прозорий безбарвний розчин з незначною кількістю білих частинок	Прозорий безбарвний розчин без видимої наявності частинок	Прозорий безбарвний розчин без видимої наявності частинок	Прозорий безбарвний розчин без видимої наявності частинок
SDS-PAGE невідновл.	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом
SDS-PAGE відновл.	97%	96%	97%	96%
IEF	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом
SEC-HPLC	96,32 %	96,86 %	96,60 %	94,04%
ІФА-аналіз зв'язування CD105	зв'язувальна активність дорівнює 88% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 136% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 88% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 105% порівняно з еталонним стандартом
УФ-поглинання (A ₂₈₀)	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл
pH	7,2	7,2	7,2	7,3
Стерильність	не перевірено	-	не перевірено	-

SDS-PAGE- аналіз шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (відновлених та невідновлених білків та пептидів)

IEF - аналіз шляхом ізоелектричного фокусування/капілярного електрофорезу.

5 SEC-HPLC- аналіз шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії.

Таблиця 19

Результати досліджень стійкості композиції Lot FIN-0536, яку зберігали в умовах для прискорених досліджень (з температурою 25°C/60% відносної вологості)

Перевірка	Початок досліджень	1 місяць
Зовнішній вигляд та опис	Прозорий безбарвний розчин. Незначний сірий пил, подібний до частинок	Прозорий безбарвний розчин без видимої наявності частинок
SDS-PAGE невідновл.	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом
SDS-PAGE відновл.	98%	96%
IEF	порівняно зі стандартом	порівняно зі стандартом
SEC-HPLC	96,62%	96,45%
ІФА-аналіз зв'язування CD105	зв'язувальна активність дорівнює 88% порівняно з еталонним стандартом	зв'язувальна активність дорівнює 91% порівняно з еталонним стандартом
УФ-поглинання (A ₂₈₀)	4,3 мг/мл	4,2 мг/мл
pH	7,2	7,3

Процедури аналізу шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії та УФ-детекції були такими ж, як описано у Прикладі 9. Процедура ІФА-аналізу зв'язування CD105 була такою ж, як описано у Прикладі 3. Процедури аналізу шляхом електрофорезу відновлених та невідновлених білків та пептидів в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та ізоелектричного фокусування описані нижче.

Електрофорез невідновлених білків та пептидів в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію; фарбування барвником Кумасі.

[00381] Ідентичність та чистоту досліджуваних сполук оцінювали з застосуванням аналізу шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі. Розділення білків здійснювали в умовах денатурації з застосуванням готового розчину 4-12% Bis-Tris SDS-, який містив гелі. SDS є аніонним детергентом, який взаємодіє з білками з утворенням негативно заряджених комплексів. Ці комплекси переміщуються крізь поліакриламідні гелі у відповідності до їх розмірів, наприклад, більш дрібні білки переміщуються швидше, ніж білки більшого розміру. Стандарти та контрольні та досліджувані сполуки денатурують та наносять на гель. Після завершення пробігу гелі фарбують барвником (Кумасі блакитним). Для сканування гелів застосовують скануючий денситометр.

[00382] Відносну кількість кожної забарвленої смужки визначають шляхом денситометрії для лінії від кожної досліджуваної сполуки. Ці кількості наведені у вигляді відсотку від загальної кількості у повній смузі, отриманої для цієї лінії. Значення молекулярної маси (кДа) смужок досліджуваних сполук визначають на основі порівняння з маркерами молекулярної маси.

Електрофорез відновлених білків та пептидів в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію; фарбування барвником Кумасі.

[00383] Електрофорез відновлених білків в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію є таким, як описано у Розділі 1.3.2 (вище) для невідновлених зразків, але з додаванням етапу відновлення (для розщеплення внутрішньо- та міжмолекулярних дисульфідних зв'язків для вивільнення білкових субодиниць, а також інших агрегатів). Для відновлення білків, до зразків та стандартів додають дитіотрейтол (50 mM), після чого їх нагрівають протягом 5 хвилин при 85°C. При русі відновлених білків у гелі, до рухливого буферу додають антиоксидант.

Застосування горизонтального ізоелектричного фокусування (IEF).

[00384] У цьому способі розділення білків здійснюють на основі їх різного заряду, який виникає при дії електричного струму. Градієнт pH встановлюють між катодом та анодом, з катодом, який має підвищений pH. Оскільки білки мають амфотерні властивості, вони будуть мати позитивно заряджені значення, які знаходяться нижче їх ізоелектричної точки та негативно заряджені значення, які знаходяться вище їх ізоелектричної точки. Під впливом електричного

струму встановлюється градієнт рН та білки будуть переміщуватися та зосереджуватися у власних ізоелектричних точках. Ця процедура полягає у застосуванні ізоелектричного фокусування білкових зразків з допомогою готових гелів від виробника у горизонтальному форматі. Після електрофорезу гелі фарбують барвником Кумассі. Площину кожної смужки визначають шляхом денситометрії для кожної лінії зразка. Площину смужок обчислюють у вигляді відсотку від площини загальної смуги. Також для кожної зі смуг визначають значення pI та Rf .

Приклад 12: Клінічні дослідження колоректального раку.

[00385] У цьому прикладі описані рандомізовані, сліпі, плацебо-контрольовані, багатоцентричні дослідження другої фази, метою яких було отримання попередньої оцінки безпечності та ефективності анти-CD105 антитіл у пацієнтів з колоректальним раком. Для участі у цих дослідженнях записують приблизно 100-800 пацієнтів, з яких приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за лікувальною групою та приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за групою плацебо. Дослідження полягають у внутрішньовенному введенні пацієнтам повторюючихся доз анти-CD105 антитіла з концентрацією приблизно у 0.1-10 мг/кг або плацебо. Введення здійснюють кожні два тижні впродовж 6-10 циклів. У всіх групах також може бути застосована хіміотерапія та пригнічувач VEGF. Час проведення досліджень оцінюють, як приблизно 6 місяців - 5 років, з продовженням терапії для пацієнтів без клінічної відповіді на лікування, як вказано наприкінці початкового дослідження.

Додаткові критерії оцінки є наступними:

[00386] Головний критерій оцінки: загальна швидкість відповіді. Однією метою досліджень є проявлення підвищеної загальної швидкості відповіді на лікування анти-CD105 антитілами у порівнянні з контрольним IgG.

[00387] Додатковим критерієм оцінки може бути тривалість відповіді, час розвитку пухлин, загальний рівень виживання, тяжкі та нетяжкі несприятливі події. Наприклад, лікування може запобігати розвитку захворювання (тобто досягнення стану спокою) або може привести до покращення стану хворого. Альтернативно або додатково можуть бути виміряні інші показники дослідження відносно однієї або кількох наступних ознак: знизилося пухлинного навантаження, зниження неоваскуляризації, зменшення побічних ефектів, зниження побічних реакцій та/або збільшення дотримання пацієнтом вимог лікаря.

Приклад 13: Клінічні дослідження раку нирок.

[00388] У цьому прикладі описані рандомізовані, сліпі, плацебо-контрольовані, багатоцентричні дослідження другої фази, метою яких було отримання попередньої оцінки безпечності та ефективності анти-CD105 антитіла у пацієнтів з нирковоклітинним раком (рак нирки).. Для участі у цих дослідженнях записують приблизно 100-800 пацієнтів, з яких приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за лікувальною групою та приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за групою плацебо. Дослідження полягають у внутрішньовенному введенні пацієнтам повторюючихся доз анти-CD105 антитіла з концентрацією приблизно у 0.1-30 мг/кг або плацебо. Введення здійснюють кожні 1-3 тижні впродовж 3-6 циклів або до появи прогресу у лікуванні. У обох лікувальних групах також може бути застосовано інтерферон та пригнічувач VEGF. Час проведення досліджень оцінюють, як приблизно 6 місяців - 5 років, з продовженням терапії для пацієнтів без клінічної відповіді на лікування, як вказано наприкінці початкового дослідження. Додаткові критерії оцінки є наступними:

[00389] Головний критерій оцінки: виживання без прогресування захворювання. Однією метою досліджень є проявлення підвищення виживання без прогресування захворювання після лікування з анти-CD105 антитілами у порівнянні до плацебо.

[00390] Додатковим критерієм оцінки може бути тривалість відповіді, час розвитку пухлин, загальний рівень виживання, тяжкі та нетяжкі несприятливі події. Наприклад, лікування може запобігати розвитку захворювання (тобто досягнення стану спокою) або може привести до покращення стану хворого. Альтернативно або додатково можуть бути виміряні інші показники дослідження відносно однієї або кількох наступних ознак: знизилося пухлинного навантаження, зниження неоваскуляризації, зменшення побічних ефектів, зниження побічних реакцій та/або збільшення дотримання пацієнтом вимог лікаря.

Приклад 14: Клінічні дослідження гепатоклітинного раку.

[00391] У цьому прикладі описані рандомізовані, сліпі, плацебо-контрольовані, багатоцентричні дослідження другої фази, метою яких було отримання попередньої оцінки безпечності та ефективності анти-CD105 антитіла у пацієнтів з гепатоклітинним раком (раком печінки). Для участі у цих дослідженнях записують приблизно 100-800 пацієнтів, з яких приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за лікувальною групою та приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за групою плацебо. Дослідження полягають у внутрішньовенному введенні

пацієнтам повторюючихся доз анти-CD105 антитіла з концентрацією приблизно у 0.1-30 мг/кг або плацебо. Введення здійснюють кожні 1-3 тижні або до появи прогресу у лікуванні. У обох лікувальних групах також може бути застосовано пригнічувач VEGF. Час проведення досліджень оцінюють, як приблизно 6 місяців - 5 років, з продовженням терапії для пацієнтів без клінічної відповіді на лікування, як вказано наприкінці початкового дослідження.

Додаткові критерії оцінки є наступними:

[00392] Головний критерій оцінки: виживання без прогресування захворювання. Однією метою досліджень є проявлення підвищення виживання без прогресування захворювання після лікування з анти-CD105 антитілами у порівнянні до плацебо.

[00393] Додатковим критерієм оцінки може бути тривалість відповіді, час розвитку пухлин, загальний рівень виживання, тяжкі та нетяжкі несприятливі події. Наприклад, лікування може запобігати розвитку захворювання (тобто досягнення стану спокою) або може привести до покращення стану хворого. Альтернативно або додатково можуть бути виміряні інші показники дослідження відносно однієї або кількох наступних ознак: знизилася пухлинного навантаження, зниження неоваскуляризації, зменшення побічних ефектів, зниження побічних реакцій та/або збільшення дотримання пацієнтом вимог лікаря.

Приклад 15: Клінічні дослідження раку яєчників.

[00394] У цьому прикладі описані рандомізовані, сліпі, плацебо-контрольовані, багатоцентричні дослідження другої фази, метою яких було отримання попередньої оцінки безпечності та ефективності анти-CD105 антитіла у пацієнтів з раком яєчників. Для участі у цих дослідженнях записують приблизно 100-800 пацієнтів, з яких приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за лікувальною групою та приблизно 50-400 пацієнтів закріплюють за групою плацебо. Дослідження полягають у внутрішньовенному введенні пацієнтам повторюючихся доз анти-CD105 антитіла з концентрацією приблизно у 0.1-30 мг/кг або плацебо. Введення здійснюють кожні 1-3 тижні впродовж 5 циклів. У обох лікувальних групах також може бути застосована хіміотерапія та/або пригнічувач VEGF. Час проведення досліджень оцінюють, як приблизно 6 місяців - 5 років, з продовженням терапії для пацієнтів без клінічної відповіді на лікування, як вказано наприкінці початкового дослідження. Додаткові критерії оцінки є наступними:

[00395] Головний критерій оцінки: виживання без прогресування захворювання. Однією метою досліджень є проявлення підвищення виживання без прогресування захворювання після лікування з анти-CD105 антитілами у порівнянні до плацебо.

[00396] Додатковим критерієм оцінки може бути тривалість відповіді, час розвитку пухлин, загальний рівень виживання, тяжкі та нетяжкі несприятливі події. Наприклад, лікування може запобігати розвитку захворювання (тобто досягнення стану спокою) або може привести до покращення стану хворого. Альтернативно або додатково можуть бути виміряні інші показники дослідження відносно однієї або кількох наступних ознак: знизилася пухлинного навантаження, зниження неоваскуляризації, зменшення побічних ефектів, зниження побічних реакцій та/або збільшення дотримання пацієнтом вимог лікаря.

Приклад 16: Лікування вікової макулярної дегенерації.

Перше дослідження

[00397] Пацієнтів з ознаками вікової макулярної дегенерації лікують шляхом ін'єкційного введення у скловидне тіло анти-CD105 антитіла або контрольного антитіла для зменшення або запобігання розвитку неоваскуляризації, появи плям на рогівці та пошкоджень сітківки.

[00398] На першій стадії пацієнти проходять повне офтальмологічне обстеження для встановлення їх стану здоров'я очей на початок досліджень. Це офтальмологічне обстеження полягає у прямій офтальмоскопії, біомікроскопії з щільною лампою, огляду периферичної частини сітківки, вимірюванні внутрішньоочного тиску, вимірюванні гостроти зору (без сторонніх засобів допомоги та кращої корекції) у застосуванні симптоматології, фотографування очного дна, флуоресцентної ангіографії, оптичної когерентної томографії, електроретинографії та вимірювань в амплітудному режимі.

[00399] Після попередньої перевірки, пацієнту з ознаками вікової макулярної дегенерації здійснюють описану вище ін'єкцію у скловидне тіло. При ураженні обох очей їх можна лікувати по окремої. У око, яке підлягає лікуванню роблять ін'єкцію офтальмологічного розчину.

[00400] Після лікування очі пацієнта піддають перевірці у перший (1), другий (2), сьомий (7), п'ятнадцятий (15), тридцятий (30) та шістдесятій (60) день лікування та ще через кожен місяць після цього впродовж двох років. Через можливість повторення хвороби, пацієнти також і в подальшому повинні звертатися для періодичних оглядів на щомісячній основі. У кожен день перевірки здійснюють контроль розрідження склоподібного тіла та, крім того, пацієнтів перевіряють на наявність задніх відшарувань склоподібного тіла з застосуванням зворотної

офтальмоскопії зі вдавллюванням склери. Нарешті, ступінь вікової макулярної дегенерації у пацієнтів постійно контролюють шляхом періодичних перевірок сітківки, оптичної когерентної томографії та флуоресцентних ангіограм з метою перевірки наявності субретинальної рідини, крові, ексудатів, відшарування пігментного епітелію сітківки, кістозних змін сітківки або наявності сірувато-зеленої субретинальної неоваскулярної мембрани. Додаткові лікарські процедури можуть знадобитися, якщо спостерігаються ознаки повторення неоваскуляризації. Додаткові способи лікування можуть бути здійснені на щотижневій або щомісячній основі. У кращому варіанті втілення, початкове лікування супроводжується наступними лікувальними заходами через 1-6 місяців.

Друге дослідження.

[00401] Метою досліджень є демонстрація ефективності введення у скловидне тіло анти-CD105 антитіл для лікування неоваскулярної вікової макулярної дегенерації (ВМД). Крім того, у всіх пацієнтів може бути застосовано пригнічувач VEGF.

[00402] Способи досліджень: У цих дослідженнях можуть брати участь 50-500 пацієнтів (50-500 очей) з субфовеальною хороїдальною неоваскуляризацією (ХНВ), яка призводить до появи ВМД. Дослідження здійснюють у призначеному для цього центрі.

[00403] Критерієм повторної ін'єкції є наявність рідини у жовтій плямі сітківки, підвищена центральна товщина сітківки (CRT) принаймні у 100 мікрон, пов'язана з підвищенням кількості рідини у жовтій плямі сітківки втрата можливості побачити принаймні 5 літер на таблиці Снеллена, поява нової класичної хороїдальної неоваскуляризації або нового макулярного крововиливу. Головним підсумковим критерієм є відсоток втрати зору, як-то можливості побачити менш, ніж 15 літер на таблиці Снеллена через 12 місяців. Вимірювання гостроти зору з максимальною корекцією та клінічну офтальмологічну перевірку проводять через 1 тиждень, 1 місяць та потім щомісячно протягом 5-12 місяців.

[00404] Середню гостроту зору та середню центральну товщину сітківки вимірюють у порівнянні з початковими значеннями з зазначенням офтальмологічних та/або системних побічних ефектів.

Приклад 17: Гуманізовані-деімунізовані послідовності антитіл.

[00405] Виділене гуманізоване, деімунізоване анти-CD105 антитіло може містити змінну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 11 та змінну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID №: 12.

[00406] SEQ ID №: 11: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ala Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[00407] SEQ ID №: 12: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00408] Інші необмежені приклади гуманізованих-деімунізованих важких ланцюгів охоплюють, але без обмеження, послідовності SEQ ID №№: 13, 14, 15 та 16.

[00409] SEQ ID №: 13: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[00410] SEQ ID №: 14: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Gln Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[00411] SEQ ID №: 15: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Arg Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
Val Ser Ser

[00412] SEQ ID №: 16: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu
5 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
Val Ser Ser

10 [00413] Інші необмежені приклади гуманізованих-деімунізованих легких ланцюгів
охоплюють, але без обмеження, послідовності SEQ ID №№: 17, 18, 19, 20, 21, 22, та 23.

[00414] SEQ ID №: 17: Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
15 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00415] SEQ ID №: 18: Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
20 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00416] SEQ ID №: 19: Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
25 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00417] SEQ ID №: 20: Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
30 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00418] SEQ ID №: 21: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
35 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00419] SEQ ID №: 22: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
40 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00420] SEQ ID №: 23: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
45 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[00421] Аспекти описаних тут втілень можуть бути втілені у інших формах або впроваджені
іншим шляхом без відступу від їх суті та основних характеристик. Отже, це відкриття треба
розглядати у всіх зображених аспектах та без обмеження та всі змінення, які надходять до
50 цього значення та межі еквівалентності, призначені охоплюватися цією заявкою.

Перелік послідовностей

<110> ТРЕЙКОН ФАРМАСУТИКАЛЗ, ІНК.

<120> Композиції антитіл та їх застосування

<130> 35882-714.601

<140>

<141>

<150> 61/697,111

<151> 2012-09-05

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 2

<211> 107

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 2

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 3

<211> 118

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 3

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 330

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

полипептид

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
	225	230	235
			240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 5

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 5

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 7

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 8

Asp Ala Trp Met Asp

1 5

<210> 9

<211> 19

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 9

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 10

<211> 7

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 10

Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser
1 5

<210> 11

<211> 118

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 11

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

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

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

Gly Glu Ala Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 118

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 118

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 14

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

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

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

Gly Glu Ile Arg Ser Gln Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 118

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 15

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

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

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

Gly Glu Ile Arg Ser Arg Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 118

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 17

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

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 18

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

поліпептид

<400> 18

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

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

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

<210> 19

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 20

<211> 106

<212> 610x

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 21

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 22

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

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Композиція, що містить від приблизно 25 до приблизно 100 мг/мл антитіла до CD105, від 10 до 20 мМ буферного агента, до приблизно 240 мМ поліолу та рН від приблизно 4,0 до приблизно 5,5; де буферним агентом є ацетат, гістидин або фосфат, де поліол є цукром, і де композиція підтримує стабільність та ефективність антитіла до CD105.
2. Композиція за п. 1, в якій буферний агент є гістидином.
- 10 3. Композиція за п. 1, в якій буферний агент є ацетатом.
4. Композиція за п. 1, в якій цукор є трегалозою, сорбітом або сахарозою.
5. Композиція за п. 1, яка містить приблизно 25 мг/мл антитіла до CD105.
6. Композиція за п. 1, яка містить приблизно 50 мг/мл антитіла до CD105.
7. Композиція за п. 1, яка містить приблизно 100 мг/мл антитіла до CD105.
- 15 8. Заздалегідь заповнений шприц, придатний для внутрішньовенного або інтравітреального введення, що включає композицію за п. 1.
9. Застосування композиції за п. 1 у формуванні лікарського засобу для лікування захворювання, пов'язаного з ангіогенезом.
10. Застосування за п. 9, в якому захворювання, пов'язане з ангіогенезом, є раком або його метастазом.
- 20 11. Застосування за п. 9, в якому захворювання, пов'язане з ангіогенезом, є офтальмологічним станом.
12. Застосування за п. 11, у якому офтальмологічним станом є вікова макулярна дегенерація, діабетична ретинопатія або хоріоїдальна неоваскуляризація.

Композиції антитіл та їх застосування

A. Послідовність TRC105 V_L: CDR-ділянки підкреслено

QIVLSQSFAILSASFGKVTMTCRASSSVSYNHWYQOKPGSSPKFWIYATSNLASGVFVRFSG
SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 1)

B. Послідовність TRC105 C_L

RTVAAPSVVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

C. Послідовність TRC105 V_H: CDR-ділянки підкреслено

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSFQKLEWVAEIRSKASNHATYYA
ESVKGRTISRDDSKSSVYLQMNSLRADTGIYYCTRWRRFFDSWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO: 3)

D. Послідовність TRC105 C_H1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDFEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
EALHNYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

E. VL CDR1: RASSSVSYNH (SEQ ID NO: 5)

F. VL CDR2: ATSNLAS (SEQ ID NO: 6)

G. VL CDR3: QQWSSNFLT (SEQ ID NO: 7)

H. VH CDR1: DAWMD (SEQ ID NO: 8)

I. VH CDR2: EIRSKASNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 9)

J. VH CDR3: WRRFFDS (SEQ ID NO: 10)

Fig. 1

Модель регулювання ангиогенезу з допомогою CD105 (Ендогліну)

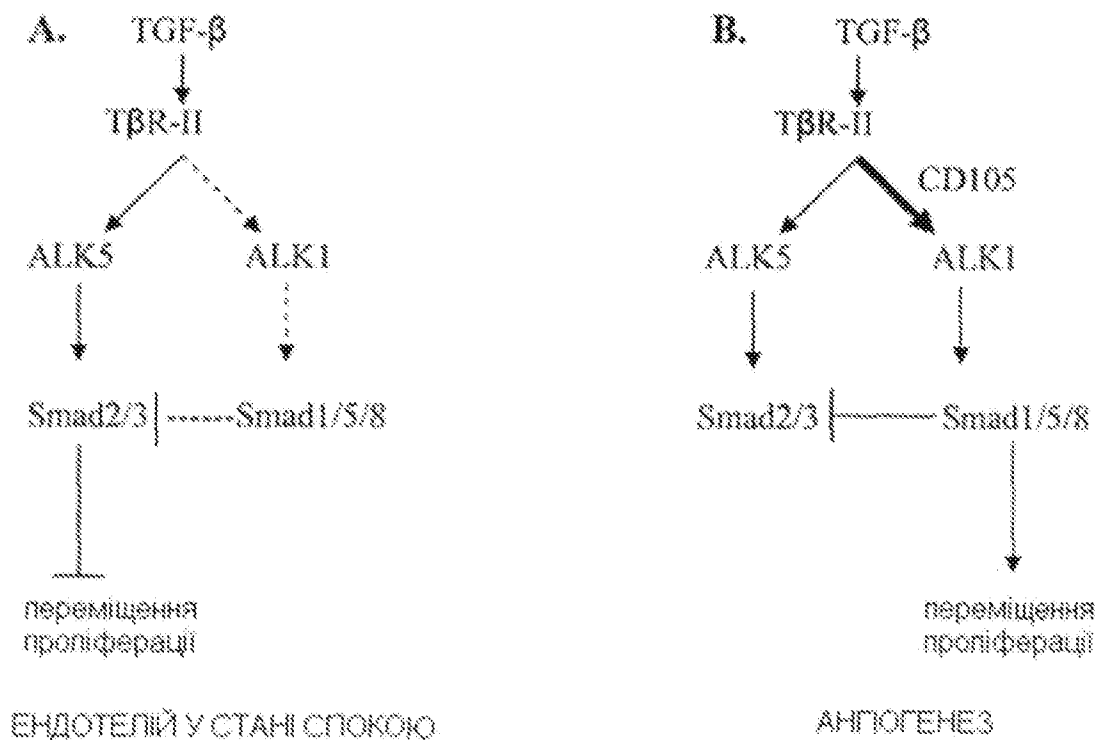


Fig. 2