



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010136940/10, 04.02.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.02.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.02.2008 US 61/026,207;
09.09.2008 US 61/095,429

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2012 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 20.09.2014 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 06.09.2010(86) Заявка РСТ:
US 2009/033042 (04.02.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/100110 (13.08.2009)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Миц, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

БЕНДЕР Стивен Ли (US),
КАСПЕРСОН Джеральд Фрайес (US),
ХУ-ЛОУ, Дана Дан (US),
ЦЗЯН Синь (US),
ЛИ Ган (US),
НОРТ Майкл Айдан (US),
ВАН Цзяньин (US),
УИКМАН Грант (GB),
БРАМС Петер (US),
ХУАН Хайчунь (US),
ДЕВО Бриджит (US),
ЧЭНЬ Хайбинь (US),
ТАНАМАЧИ Дон М. (US),
ТОЙ Кристофер (US),
ЯН Лань (US),
СПРАУЛ Тим У. (US),
ЯМАНАКА Марк (US)

(73) Патентообладатель(и):

БРИСТОЛЬ-МЕЙЕРЗ СКВИББ
КОМПАНИ (US),
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ АЛЬФА5-БЕТА 1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложено выделенное моноклональное антитело к интегрину $\alpha 5\beta 1$ человека. Антитело характеризуется тем, что содержит 6 CDR, 3 CDR из легкой цепи и 3 CDR из тяжелой цепи. Описана нуклеиновая кислота (НК), кодирующая антитело по изобретению, экспрессирующий вектор, содержащий молекулу НК; клетка-хозяин, содержащая вектор; и способ получения антитела на основе клетки. Раскрыты: композиция и способ для ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин

$\alpha 5\beta 1$ человека, на основе антитела. Описан вариант способа ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека, использующий композицию. Изобретение обеспечивает новые антитела с высоким (порядка нм, как измерено FACS) сродством связывания с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека, что может найти применение в медицине в терапии опухолей, опосредованных экспрессией интегрин $\alpha 5\beta 1$. 7 н. и 6 з.п. ф-лы, 36 ил., 3 табл., 11 пр.

(56) (продолжение):

WO2007134876 A2, 29.11.2007 WO2006053301 A2, 18.05.2006 EA 7617 B1, 29.12.2006 РОЙТ и др.
«Иммунология», пер. с англ., - М.: Мир, 2000, стр.105, 110

R U 2 5 2 8 7 3 6 C 2

R U 2 5 2 8 7 3 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010136940/10, 04.02.2009**

(24) Effective date for property rights:
04.02.2009

Priority:

(30) Convention priority:
05.02.2008 US 61/026,207;
09.09.2008 US 61/095,429

(43) Application published: **20.03.2012 Bull. № 8**

(45) Date of publication: **20.09.2014 Bull. № 26**

(85) Commencement of national phase: **06.09.2010**

(86) PCT application:
US 2009/033042 (04.02.2009)

(87) PCT publication:
WO 2009/100110 (13.08.2009)

Mail address:
129090, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, stroenie 3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mits, reg.N 364

(72) Inventor(s):
BENDER Stiven Li (US),
KASPERSON Dzheral'd Frajes (US),
KhU-LOU, Dana Dan (US),
TsZJaN Sin' (US),
LI Gan (US),
NORT Majkl Ajdan (US),
VAN Tszjan'in (US),
UIKMAN Grant (GB),
BRAMS Peter (US),
KhUAN Khajchun' (US),
DEVO Bridzhit (US),
ChEhN' Khajbin' (US),
TANAMACHi Don M. (US),
TOJ Kristofer (US),
JaN Lan' (US),
SPRAUL Tim U. (US),
JaMANAKA Mark (US)

(73) Proprietor(s):
BRISTOL'-MEJERZ SKVIBB KOMPANI (US),
PFAJZER INK. (US)

(54) ALPHA5-BETA 1 ANTIBODIES AND USING THEM

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention refers to immunology. What is presented is a recovered human integrin $\alpha 5 \beta 1$ monoclonal antibody. The antibody is characterised by the fact that it contains 6 CDR, 3 CDR from a light chain and 3 CDR from a heavy chain. A nucleic acid (NA) coding the antibody according to the invention, an expression vector containing a NA molecule, a host cell containing the vector, and a method for preparing the antibody on the basis of the cell are described. There are disclosed: a composition

and a method for growth inhibition of the tumour cells expressing human integrin $\alpha 5 \beta 1$ on the basis of the antibody. What is described is a version of the method for growth inhibition of the tumour cells expressing human integrin $\alpha 5 \beta 1$ using the composition.

EFFECT: invention provides the new antibodies with high (approximately nm, as measured by FACS) binding affinity for human integrin $\alpha 5 \beta 1$ that can find application in medicine in therapy of the tumours mediated by integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression.

13 cl, 36 dwg, 3 tbl, 11 ex

По данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/026027, поданной 5 февраля 2008, и предварительной заявки США № 61/095429, поданной 9 сентября 2008, обе они приводятся в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

5 Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее описание относится к антителам и их антигенсвязывающим участкам, которые связываются с $\alpha 5\beta 1$. Описание также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие антитела и антигенсвязывающие участки, способам создания антител и антигенсвязывающих участков против $\alpha 5\beta 1$, композициям, содержащим
10 данные антитела и антигенсвязывающие участки, и способам применения антител, антигенсвязывающих участков и композиций.

Уровень техники

Интегрин $\alpha 5\beta 1$ представляет собой гетеродимерный белок клеточной поверхности, который связывается с фибронектином и вовлечен в прикрепление клетки и ангиогенез.
15 Этот гетеродимер составлен из субъединицы $\alpha 5$ и субъединицы $\beta 1$. Интегрин $\alpha 5\beta 1$ обозначают как «классический рецептор фибронектина», который имеет ключевое значение в адгезии к матриксу, миграции, пролиферации, дифференциации и выживаемости. Несмотря на то, что с фибронектином (FN) связывается несколько интегринов, избирательным в отношении FN является интегрин $\alpha 5\beta 1$, поскольку для
20 распознавания лиганда и оптимального взаимодействия ему требуются обе пептидных последовательности на девятом (PHSRN) и десятом (RGDS) повторах типа III фибронектина FN (Danen et al. *J. Biol. Chem.* 270(37):21612-21618 (1995); Redisk et al. *J. Cell Biol.* 149(2):521-527 (2000); Takagi et al. *EMBO J.* 22:4607-4615 (2003)). Интегрин-опосредованная адгезия клетки к FN может запускать приток кальция, активировать
25 тирозин- и серин/треонин протеинкиназы и инозитол-липидный метаболизм и регулировать активность семейства небольших GTP-аз Rho, которое контролирует актиновый цитоскелет и клеточный цикл.

Экспрессия $\alpha 5\beta 1$ наблюдается в большинстве эмбриональных тканей, но после рождения уровень падает в соответствии с терминальной дифференциацией клетки
30 (Muschler & Horwitz *Development* 113(1):327-337 (1991)). У взрослых мышей дикого типа экспрессия происходит главным образом в сосудистой и соединительной ткани, хотя низкие уровни рецептора широко распространены. Экспрессия как $\alpha 5\beta 1$, так и FN существенно и согласованно повышается на кровеносных сосудах опухолей человека и в тканях, стимулированных факторами роста и цитокинами.

35 Ангиогенные цитокины, такие как bFGF, VEGF, IL-8, TGF-бета и TNF- α , повышают экспрессию $\alpha 5\beta 1$ на эндотелиальных клетках *in-vitro* и *in-vivo*, в то время как в нормальных сосудах и тканях человека эти молекулы экспрессируются в минимальном количестве (Kim et al. *Am. J. Path.* 156(4):1345-62 (2000); Enaida et al. *Fukushima J. Med. Sci.* 44(1):43-52 (1998); Klein et al. *Mol. Biol. Cell* 4(10):973-982 (1993)).

40 Высокие уровни экспрессии $\alpha 5\beta 1$ не ограничиваются сосудистой системой, поскольку также часто обнаруживают, что экспрессируют $\alpha 5\beta 1$ опухолевые клетки при многих типах рака. Гипоксия опухоли ассоциировалась с повышенной экспрессией $\alpha 5\beta 1$ опухолью (Mousa et al. *J. Cell. Biochem.* 74:135-143 (1999)). Полагают, что интегрины важны для интравазации опухоли во вновь образованные капилляры и экстравазации
45 в удаленные участки, приводя к распространению опухоли и метастазированию. В целом, паттерн экспрессии $\alpha 5\beta 1$ согласуется с большим числом значений в прогрессировании рака через опосредование активностей как стромальных, так и опухолевых клеток. В большом числе клинических исследований повышение $\alpha 5\beta 1$ на

клетках опухоли ассоциировалось с прогрессированием меланомы, оральной плоскоклеточной карциномы и В-клеточных лейкозов человека (Jin & Varner, *Br. J. Cancer* 90:561-565 (2004); Danen et al. *Histopathology* 24(3):249-256 (1994); Shinohara et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 111(1):75-88 (1999)).

5 Сущность изобретения

Настоящее описание относится к выделенным моноклональным антителам, в частности моноклональным антителам человека, у которых наблюдается высокое сродство связывания с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека. Антитела, описанные в настоящем описании, как правило, представляют собой антитела человека, хотя в альтернативных случаях антитела могут представлять собой антитела мыши, химерные антитела или гуманизированные антитела.

10 В одном из аспектов описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, где антитело: (а) связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше; и (b) способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность. Например, в одном случае антитело принадлежит подклассу, который способен индуцировать ADCC, такому как IgG1 или IgG3. В другом случае ADCC-активность является результатом введения в Fc-область углеводных модификаций, таких как измененные паттерны гликозилирования, по сравнению с нативным углеводным паттерном.

15 В некоторых случаях антитело связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 5×10^{-8} М или меньше, 2×10^{-8} М или меньше, 1×10^{-8} М или меньше, 5×10^{-9} М или меньше, 4×10^{-9} М или меньше, 3×10^{-9} М или меньше, или $2,7 \times 10^{-9}$ М или меньше.

25 В дополнительном аспекте настоящее описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, где антитело: (а) связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше; и (b) у него наблюдается повышенная ADCC-активность относительно антитела сравнения. Например, в одном из случаев антитело с повышенной ADCC-активностью содержит, по меньшей мере, одну мутацию в Fc-области по сравнению с Fc-областью дикого типа, и повышенной ADCC-активностью является по отношению к тому же антителу, но содержащему Fc-область дикого типа. В некоторых примерах антитело связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 5×10^{-8} М или меньше, 2×10^{-8} М или меньше, 1×10^{-8} М или меньше, 5×10^{-9} М или меньше, 4×10^{-9} М или меньше, 3×10^{-9} М или меньше, или $2,7 \times 10^{-9}$ М или меньше. В дополнительных примерах у антитела наблюдается повышенная ADCC-активность относительно антитела сравнения, которая повышена, по меньшей мере, в 1,1 раз, по меньшей мере, в 1,2 раз, по меньшей мере, в 1,3 раз, по меньшей мере, в 1,5 раз, по меньшей мере, в 2 раза, по меньшей мере, в 3 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 10 раз, по меньшей мере, в 20 раз, по меньшей мере, в 30 раз, по меньшей мере, в 40 раз, по меньшей мере, в 50 раз, по меньшей мере, в 100 раз, по меньшей мере, в 200 раз, по меньшей мере, в 500 раз, или, по меньшей мере, в 1000 раз по отношению к антителу сравнения, где антитело сравнения представляет собой то же антитело, но с Fc-областью дикого типа.

45 В дополнительном аспекте настоящее описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, где антитело: (а) связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше; и (b) содержит, по

меньшей мере, одну мутацию в Fc-области по сравнению с Fc-областью дикого типа. Например, в одном из случаев антитело принадлежит к подклассу IgG1, и, по меньшей мере, одна из аминокислот в Fc-области подкласса IgG1 мутирована. В дополнительном примере, по меньшей мере, одна мутация находится в позиции серин 247, аланин 338 или изолейцин 340 в Fc-области подкласса IgG1. В дополнительном примере, по меньшей мере, одну мутацию выбирают из группы, состоящей из S247D, A338L и I340E. В еще одном дополнительном примере антитело содержит мутации S247D, A338L и I340E.

В дополнительном аспекте настоящее описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, где антитело перекрестно конкурирует или конкурирует за связывание с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с антителом, которое содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, или ее консервативные модификации; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, или ее консервативные модификации.

Дополнительный аспект настоящего описания представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, которая представляет собой продукт или производное гена человека $V_H 4-39$, где антитело специфически связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека.

Дополнительный аспект настоящего описания представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельную область легкой цепи, которая представляет собой продукт или производное гена человека $V_K L6$, где антитело специфически связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека.

В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO:1, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи CDR2, содержащую SEQ ID NO:2, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи CDR3, содержащую SEQ ID NO:3, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область легкой цепи CDR1, содержащую SEQ ID NO:4, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область легкой цепи CDR2, содержащую SEQ ID NO:5, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область легкой цепи CDR3, содержащую SEQ ID NO:6, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему:

(а) вариабельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую SEQ ID NO:1, или ее консервативные модификации;

(b) вариабельную область тяжелой цепи CDR2, содержащую SEQ ID NO:2, или ее консервативные модификации;

(с) вариабельную область тяжелой цепи CDR3, содержащую SEQ ID NO:3, или ее консервативные модификации;

(d) вариабельную область легкой цепи CDR1, содержащую SEQ ID NO:4, или ее консервативные модификации;

5 (е) вариабельную область легкой цепи CDR2, содержащую SEQ ID NO:5, или ее консервативные модификации; и

(f) вариабельную область легкой цепи CDR3, содержащую SEQ ID NO:6, или ее консервативные модификации.

В дополнительном аспекте настоящее описание относится к выделенному
10 моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, или ее консервативные модификации. Например, описание относится к антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7. В дополнительном аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную
15 последовательность SEQ ID NO:8, или ее консервативные модификации. Например, описание относится к антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область легкой цепи, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична
20 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:8. В дополнительном аспекте настоящее описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, или ее консервативные модификации, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO:8, или ее консервативные модификации. Например, описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7, и вариабельную область легкой цепи, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:8.

40 В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO:13, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO:14, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи CDR3, содержащую последовательность SEQ ID
45

содержащую SEQ ID NO:37, или ее консервативные модификации. В другом аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему варибельную область легкой цепи CDR3, содержащую SEQ ID NO:38, или ее консервативные модификации. В другом аспекте

5 описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему: (a) варибельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую SEQ ID NO:33, или ее консервативные модификации; (b) варибельную область тяжелой цепи CDR2, содержащую SEQ ID NO:34, или ее консервативные модификации; (c) варибельную область тяжелой цепи CDR3,

10 содержащую SEQ ID NO:35, или ее консервативные модификации; (d) варибельную область легкой цепи CDR1, содержащую SEQ ID NO:36, или ее консервативные модификации; (e) варибельную область легкой цепи CDR2, содержащую SEQ ID NO: 37, или ее консервативные модификации; и (f) варибельную область легкой цепи CDR3, содержащую SEQ ID NO:38, или ее консервативные модификации.

15 В дополнительном аспекте настоящее описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, или ее консервативные модификации. В дополнительном аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему

20 участку, содержащему варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, или ее консервативные модификации. В дополнительном аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, или ее

25 консервативные модификации, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, или ее консервативные модификации.

В дополнительном аспекте предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий участок, которые связываются с тем же эпитопом на интегрине

30 $\alpha 5\beta 1$ человека, что и любое антитело, описанное в данном документе, и/или конкурируют за связывание с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с таким антителом.

В одном из вариантов осуществления описание относится к материалу, депонированному в АТСС под номером доступа РТА-9377. В другом варианте осуществления описание относится к материалу, депонированному в АТСС под номером

35 доступа РТА-9378. В другом варианте осуществления описание относится к выделенному антителу, которое содержит варибельную область тяжелой цепи, депонированную в АТСС под номером доступа РТА-9377. В другом варианте осуществления описание относится к выделенному антителу, которое содержит варибельную область легкой цепи, депонированную в АТСС под номером доступа РТА-9378. В другом варианте

40 осуществления описание относится к выделенному антителу, содержащему варибельную область тяжелой цепи, депонированную в АТСС под номером доступа РТА-9377, но у которого в VH-области получены мутации зародышевой линии I30S и N33S. В дополнительном варианте осуществления описание относится к выделенному антителу, которое содержит варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи,

45 депонированные в АТСС под номерами доступа РТА-9377 и РТА-9378, соответственно, или указанному антителу, у которого в VH-области созданы мутации зародышевой линии I30S и N33S. В дополнительном варианте осуществления описание относится к выделенному антителу, которое содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи

вариабельной области тяжелой цепи, депонированной в АТСС под номером доступа РТА-9377, или содержит указанные области CDR1, CDR2 и CDR3, если указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит мутации зародышевой линии I30S и N33S. В дополнительном варианте осуществления описание относится к выделенному антителу, которое содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи вариабельной области легкой цепи, депонированной в АТСС под номером доступа РТА-9378. В дополнительном варианте осуществления описание относится к выделенному антителу, которое содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи и области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, депонированных в АТСС под номерами доступа РТА-9378 и РТА-9378, соответственно, или содержит указанные области CDR1, CDR2 и CDR3, если указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит мутации зародышевой линии I30S и N33S.

Антитела по изобретению могут представлять собой, например, полноразмерные антитела, например, подкласса IgG1 или IgG4. Альтернативно, антитела могут представлять собой фрагменты антител, такие как Fab- или Fab'-фрагменты, или одноцепочечные антитела. В одном из случаев настоящее описание относится к любому антителу, описанному выше, которое представляет собой полноразмерное антитело человека подкласса IgG1, в котором, по меньшей мере, одна аминокислота в Fc-области подкласса IgG1 мутирована. В дополнительном случае, по меньшей мере, одна мутация наблюдается в позиции серин 247, аланин 338 или изолейцин 340. В дополнительном случае, по меньшей мере, одну мутацию выбирают из группы, состоящей из S247D, A338L и I340E. В еще одном дополнительном случае антитело содержит мутации S247D, A338L и I340E.

В дополнительном аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу, содержащему тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:9, или ее консервативные модификации. Например, антитело содержит тяжелую цепь, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:9. В дополнительном аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу, содержащему легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:10, или ее консервативные модификации. Например, антитело содержит легкую цепь, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:10. В дополнительном аспекте описание относится к выделенному моноклональному антителу, содержащему тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:9, или ее консервативные модификации и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:10, или ее консервативные модификации. Например, антитело содержит тяжелую цепь, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления С-концевой лизин тяжелой цепи какого-либо описанного антитела против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению расщепляют и, таким образом, он

не представлен. Например, в некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению содержат константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:43, но где С-концевой лизин не представлен. В большом числе случаев тяжелая и легкая цепи антител против $\alpha 5\beta 1$ необязательно могут включать сигнальную последовательность.

В дополнительном аспекте описание относится к композиции, содержащей любое из антител или их антигенсвязывающих участков, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте описание относится к иммуноконъюгату, содержащему любое из антител или их антигенсвязывающих участков, описанных в данном документе, связанное с терапевтическим агентом. В одном из случаев терапевтический агент представляет собой цитотоксин или радиоактивный изотоп. В дополнительном аспекте описание относится к композиции, содержащей любой иммуноконъюгат, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Описание также относится к биспецифической молекуле, содержащей антитело или его антигенсвязывающий участок, связанные со вторым функциональным фрагментом, обладающим специфичностью связывания, отличной от специфичности связывания указанного антитела или его антигенсвязывающего участка.

Также предлагаются композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий участок или иммуноконъюгат, или биспецифическую молекулу по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также изобретением охватываются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие участки, а также экспрессирующие векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие экспрессирующие векторы. Один из аспектов, например, представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или экспрессирующий вектор, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO:11, или ее консервативные модификации. Дополнительный аспект представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или экспрессирующий вектор, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO:12, или ее консервативные модификации. Дополнительный аспект представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или экспрессирующий вектор, содержащие последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:21, 22, 31, 32, 41 и 42, или ее консервативные модификации. Описание также относится к трансгенной мышью, содержащей трансгены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека, где мышь экспрессирует антитело по изобретению, а также гибридомам, полученным из такой мыши, где гибридома продуцирует антитело по изобретению.

Описание дополнительно относится к клетке-хозяину, содержащей любой из экспрессирующих векторов, описанных в данном документе.

В дополнительном аспекте описание относится к способу получения антитела против интегрина $\alpha 5\beta 1$, который включает экспрессию антитела в любой клетке-хозяине, описанной в данном документе, и выделение антитела из клетки-хозяина.

В дополнительном аспекте описание относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 5\beta 1$, включающему приведение клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим участком, которые связываются с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с $K_D 1 \times 10^{-7}$ М или меньше и способны индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность. В одном из случаев антитело представляет собой полностью антитело человека. В дополнительном случае антитело

или его антигенсвязывающий участок создают так, чтобы усилить его способность индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность. В еще одном дополнительном случае усиление достигается за счет мутации, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в Fc-области.

5 В дополнительном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 5\beta 1$, включающему приведение клеток в контакт с любым из антител или их антигенсвязывающих участков, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для ингибирования роста опухолевых клеток.

10 В дополнительном аспекте изобретение относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих участков, описанных в данном документе, для производства лекарственного препарата для лечения аномального клеточного роста. В еще одном дополнительном аспекте изобретение относится к любому из антител или их антигенсвязывающих участков, описанных в данном документе, для применения в
15 лечении и/или диагностике аномального роста клеток. В одном из вариантов осуществления данного способа аномальный рост клеток представляет собой рак, включая, но ими не ограничиваясь, мезотелиому, рак гепатобилиарной системы (печени и желчевыводящих путей), первичную или вторичную опухоль ЦНС, первичную или вторичную опухоль мозга, рак легких (NSCLC и SCLC), рак костей, рак поджелудочной
20 железы, рак кожи, рак головы или шеи, меланому кожи или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, анальный рак, рак желудка, рак органов желудочно-кишечного тракта (желудка, колоректальный и 12 перстной кишки), рак молочных желез, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному цервикального канала, карциному вагины, карциному вульвы,
25 болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак простаты, рак яичка, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную
30 карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, аденокортикальный рак, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангиокарциному, фибросаркому, нейробластому, ретинобластому или сочетание одной или нескольких вышеуказанных злокачественных
35 опухолей.

Описание также относится к способам создания «второго поколения» антител против $\alpha 5\beta 1$ на основании последовательностей антител против $\alpha 5\beta 1$, предложенных в данном документе. Например, описание относится к способу получения антитела против $\alpha 5\beta 1$, содержащему: (а) получение: (i) последовательности варьирующей области тяжелой
40 цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, 13, 23 или 33, последовательность CDR2, представленную в SEQ ID NO: 2, 14, 24 или 34, и/или последовательность CDR3, представленную в SEQ ID NO: 3, 15, 25 или 35; и/или (ii) последовательности варьирующей области легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, представленную в SEQ ID NO: 4, 16, 26 или 36,
45 последовательность CDR2, представленную в SEQ ID NO: 5, 17, 27 или 37, и/или последовательность CDR3, представленную в SEQ ID NO: 6, 18, 28 или 38; (b) изменение, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в последовательности варьирующей области тяжелой цепи антитела и/или последовательности варьирующей области легкой

цепи антитела для создания, по меньшей мере, одной измененной последовательности антитела; и (с) экспрессию измененной последовательности антитела в виде белка.

Другие особенности и преимущества настоящего описания будут понятны из следующего подробного описания и примеров, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Содержание всех ссылок, данных Генбанка, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных в данном описании изобретения, прямо приводится в данный документ в качестве ссылок.

Краткое описание чертежей

На фиг.1А представлена последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:11); на фиг.1В представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:7) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1С представлена последовательность ДНК варибельной области легкой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:12); на фиг.1D представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:8) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1Е представлена последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи антитела 24С7 (SEQ ID NO:21); на фиг.1F представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 24С7 (SEQ ID NO:19) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1G представлена последовательность ДНК варибельной области легкой цепи антитела 24С7 (SEQ ID NO:22); на фиг.1H представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 24С7 (SEQ ID NO:20) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1I представлена последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:31); на фиг.1J представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:29) - CDR-области подчеркнуты. На фиг.1K представлена последовательность ДНК варибельной области легкой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:32); на фиг.1L представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:30) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1M представлена последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:41); на фиг.1N представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:39) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1O представлена последовательность ДНК варибельной области легкой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:42); на фиг.1P представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:40) - CDR-области подчеркнуты; на фиг.1Q представлена аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 с подчеркнутыми мутациями S247D, A338L и I340E; и на фиг.1R представлена аминокислотная последовательность константной области легкой цепи IgG1.

На фиг.2 представлено выравнивание варибельного домена тяжелой цепи (V_H) антитела 22B5 с соответствующей последовательностью зародышевой линии. Кроме того, представлено выравнивание варибельного домена легкой цепи (V_L) антитела 22B5 с соответствующей последовательностью зародышевой линии. CDR-области подчеркнуты, идентичные остатки представлены пунктиром, а точки указывают на делеции.

На фиг.3 представлено наложение сенсограмм, полученных введением большого числа концентраций рекомбинантного внеклеточного домена $\alpha\beta 1$ поверх иммобилизованного 22B5/DLE. Эти данные получали в присутствии 4,0 мМ $CaCl_2$.

Порядок введений был от низкой к высокой концентрации.

На фиг.4 посредством FACS показано дозо-зависимое связывание антитела 22B5/DLE с клетками HUVEC.

На фиг.5 представлено сравнение равновесных констант диссоциации для Fcγ-рецепторов человека и мыши. «wt» обозначает IgG1 дикого типа 22B5; «DLE» обозначает 22B5/DLE.

На фиг.6 представлены результаты анализа блокады адгезии клеток HUVEC. Результаты указывают уровень ингибирования адгезии клеток HUVEC к фибронектину для антитела 22B5 и большого числа вариантов подкласса, а также отрицательного контроля (BHA2 IgG1). Также представлены рассчитанные величины IC₅₀.

На фиг.7 представлена экспрессия α5 клеток HUVEC и 20 опухолевых клеточных линий, измеренная вестерн-блотом.

На фиг.8 представлена in-vitro ADCC, индуцированная антителом 22B5/DLE по сравнению с IgG1 wt 22B5. На фиг.8A представлен анализ на основе детекции LDH, измеряющий ADCC клеток U87MG в присутствии клеток РВМС человека посредством 22B5/DLE и 22B5 wt IgG1. На фиг.8B представлен анализ на основе детекции ToxiLight, измеряющий ADCC клеток HUVEC в присутствии клеток РВМС человека посредством 22B5/DLE и 22B5 wt IgG1.

На фиг.9 представлены анализы на основе определения LDH, которые указывают на существенное усиление ADCC при использовании антитела 22B5/DLE по сравнению с антителом wt 22B5 IgG1 через широкий диапазон уровней экспрессии антигена.

На фиг.10 представлена ингибирующая активность антитела 22B5/DLE на модели экспериментального метастаза А549-Лус. Фиг.10А: величина метастаза в легкое, измеренная с помощью ВЛ на 8 неделе (n=11 для контрольной группы, n=14 для группы 22B5 IgG2 и n=12 для группы 22B5/DLE). Фиг.10В: возобновление роста опухолей легких в группе, обработанной 22B5 IgG2, после прекращения лечения. Для сравнения, в группе, обработанной 22B5/DLE, наблюдалось незначительное возобновление роста. Фиг.10С: График Каплана-Мейера степени выживаемости животных из каждой обработанной группы (конечная точка = ВЛ 1×10⁸ фотонов/секунда), p<0,0001 при сравнении контрольной группы, обработанной носителем, со всеми другими группами, и p<0,05 при сравнении между группами 22B5/DLE и 22B5 IgG2.

На фиг.11 посредством анализа FACS представлено дозо-зависимое связывание антител 1D9, 1D9/DLE, 24C7/DLE, 2D2/DLE, 22B5 и 22B5/DLE с клетками HUVEC.

На фиг.12 представлена in-vitro ADCC, индуцированная антителами 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE и 24C7/ DLE.

На фиг.13 представлена ADCC-зависимая противоопухолевая эффективность антитела 1D9/DLE на сингенной модели метастатической меланомы. Фиг.13А: Макроскопическая картина легких, резецированных из всех групп. Фиг.13В: Количественная оценка веса легкого (*p<0,05 при сравнении 1D9 IgG1 DLE с 1D9 IgG2). Фиг.13С: Количественная оценка числа метастатических колоний, видимых на поверхности легкого.

Статистический анализ посредством дисперсионного анализа ANOVA и теста множественного сравнения Бонферрони (*p<0,05, 1D9 IgG1 DLE по сравнению с 1D9 IgG2; *p<0,05, 1D9 IgG1 DLE по сравнению с IgG2 против KLH).

Подробное описание

Настоящее описание относится к выделенным моноклональным антителам, в частности, моноклональным антителам человека, которые специфически связываются с α5β1 с высоким сродством. В некоторых случаях антитела по изобретению происходят из конкретных последовательностей тяжелой и легкой цепей зародышевой линии и/или

содержат определенные структурные особенности, такие как CDR-области, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. Описание относится к выделенным антителам, способам получения таких антител, иммуноконъюгатам и биспецифическим молекулам, содержащим такие антитела, и фармацевтическим композициям, содержащим антитела, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы по изобретению. Описание также относится к способам применения антител, таким как детекция $\alpha 5\beta 1$, а также лечение заболеваний, ассоциированных с экспрессией $\alpha 5\beta 1$, таких как аномальный клеточный рост (например, рак). Соответственно, описание также относится к способам применения антител против $\alpha 5\beta 1$ или их антигенсвязывающих участков для лечения большого числа видов аномального клеточного роста, такого как рак.

С целью облегчения понимания настоящего описания некоторым терминам сначала дается определение. Дополнительные определения приводятся на протяжении подробного описания.

Если иначе не определяется в данном документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим описанием, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области. Кроме того, если контекстом не подразумевается иного, термины в единственном числе должны включать множественное число и термины во множественном числе должны включать единственное число. В целом, терминология, использованная в отношении культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанных в данном документе, и методики их проведения хорошо известны и широко используются в данной области.

Если иного не указано, способы и техники по настоящему описанию, как правило, осуществляют в соответствии со способами, хорошо известными в данной области и описанными в большом числе общих и более конкретных ссылок, которые приводятся и обсуждаются в настоящем описании изобретения. К таким ссылкам относятся, например, Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990). Ферментативные реакции и методики очистки осуществляют в соответствии с требованиями производителя, как обычно осуществляют в данной области или, как описано в данном документе. Терминология, использованная в отношении аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии, описанных в данном документе, и их лабораторные способы и техники хорошо известны и широко используются в данной области. Для химического синтеза, химического анализа, получения, смешивания и доставки лекарственного средства, и лечения пациентов используются стандартные методики.

Используемый в данном документе каждый из следующих терминов имеет значение, ассоциированное с ним в этом разделе.

Как используется в данном документе, для двадцати стандартных аминокислот и их аббревиатур придерживаются принятого употребления. См. *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Термины « $\alpha 5\beta 1$ » и «интегрин $\alpha 5\beta 1$ » используются взаимозаменяемо и включают варианты, изоформы и межвидовые гомологи интегрина $\alpha 5\beta 1$ человека. Нативный $\alpha 5\beta 1$ человека, например, составлен из субъединицы $\alpha 5$ (которая происходит из последовательности предшественника, впоследствии расщепляющейся на две цепи,

соединенные дисульфидным мостиком (номер доступа в Генбанке P08648) и субъединицы $\beta 1$ (которая происходит из последовательности предшественника, впоследствии процессирующей в зрелую форму) (номер доступа в Генбанке P05556-1). Известно, что субъединица $\beta 1$ существует в виде нескольких изоформ, продуцируемых за счет альтернативного сплайсинга (см., например, номера доступа в Генбанке P05556-2, P05556-3, P05556-4 и P05556-5). Антитела человека против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению могут в некоторых случаях перекрестно взаимодействовать с $\alpha 5\beta 1$ видов, отличных от человека. В других случаях антитела могут быть полностью специфичны в отношении $\alpha 5\beta 1$ человека, и может не наблюдаться межвидовой перекрестной реактивности или перекрестной реактивности других типов.

К «иммунному ответу», как должно быть понятно специалисту в данной области, относятся, но ими не ограничиваясь, любая детектируемая антиген-специфическая или аллогенная активация Т-хелперного или цитотоксического Т-клеточного ответа, продукция антител, опосредованная Т-клетками активация аллергических реакций и тому подобное. Термин охватывает действие, например, лимфоцитов, антиген-презентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых вышеуказанными клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному повреждению, деструкции или устранению из организма человека внедрившихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток, или, в случаях аутоиммунного ответа или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

Под «путем сигнальной трансдукции» понимают биохимическое взаимодействие между большим числом молекул сигнальной трансдукции, которые имеют значение в переносе сигнала из одной части клетки в другую часть клетки. К используемой в данном документе фразе «рецептор клеточной поверхности» относятся, например, молекулы и комплексы молекул, способные получать сигнал и переносить такой сигнал через плазматическую мембрану клетки. Примером «рецептора клеточной поверхности» по настоящему изобретению является интегрин $\alpha 5\beta 1$.

Под термином «антитело», как изложено в данном документе, понимают целые антитела и любой их антигенсвязывающий фрагмент (т.е. «антигенсвязывающий участок») или одиночные цепи. Под «антителом» понимают гликопротеин, содержащий, по меньшей мере, две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающий участок. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (обозначаемая в данном документе как V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (обозначаемой в данном документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена C_L . Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с областями, которые более консервативны, называемыми каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L составлен из трех областей CDR и четырех областей FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включающими большое число клеток иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент

(Clq) классической системы комплемента. Внутри легкой и тяжелой цепей переменные и константные области соединены областью «J», состоящей из около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область «D», состоящую из около 10 или более аминокислот. См. в целом руководство *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Под термином «антигенсвязывающий участок» антитела (или просто «участок антитела»), используемым в данном документе, понимают один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, интегрином $\alpha\beta 1$). Было показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. К примерам связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий участок» антитела, относятся (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; (v) dAb-фрагмент (Ward *et al.*, (1989) *Nature*341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенная область, определяющая комплементарность (CDR). Более того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, используя рекомбинантные техники, с помощью синтетического линкера, который позволит создать их в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H составляют пару с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, статьи Bird *et al.* (1988) *Science*242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий участок» антитела. Эти фрагменты антитела могут быть получены, используя любую подходящую технику, включая принятые техники, известные специалистам в данной области, и фрагменты могут быть скринированы на пригодность таким же образом как интактные антитела.

Под «выделенным антителом», используемым в данном документе, понимают антитело, которое по существу свободно от других антител, обладающих отличными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с $\alpha\beta 1$, практически свободно от антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от $\alpha\beta 1$). Выделенное антитело, которое специфически связывается с $\alpha\beta 1$, может, тем не менее, обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы $\alpha\beta 1$ других видов. Более того, выделенное антитело может быть, по существу, свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Под терминами «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела», используемыми в данном документе, понимают препарат молекул антитела одного молекулярного состава. У композиции моноклонального антитела наблюдается единственная специфичность связывания и сродство к конкретному эпитопу.

Под терминами «антитело человека» или «полностью антитело человека», используемыми в данном документе, понимают антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области происходят из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Более того, если антитело содержит константную область, то константная область также происходит из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Антитела

человека по изобретению или их антигенсвязывающие участки могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или за счет соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, термин «антитело человека», используемый в данном документе, не включает антител, в которых в каркасные последовательности человека трансплантированы последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь.

Под терминами «моноклональное антитело человека» или «полностью человеческое моноклональное антитело» понимают антитела, у которых наблюдается единственная специфичность связывания, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR-области происходят из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. В одном из вариантов осуществления моноклональные антитела человека продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, где В-клетку сливают с иммортализованной клеткой.

Под термином «рекомбинантное антитело человека», используемым в данном документе, понимают все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулинов человека, или из гибридомы, полученной на основе этого (дополнительно описано ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной, чтобы экспрессировать антитело человека, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг генных последовательностей иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные области, в которых каркасные и CDR-области происходят из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления, тем не менее, такие рекомбинантные антитела человека могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или при использовании животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности V_L и V_H -областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которых, несмотря на происхождение и связь с V_L и V_H -последовательностями зародышевой линии человека, может не существовать в природе в зародышевом наборе антител человека *in vivo*.

Под используемым в данном документе термином «изотип» или «класс» понимают класс антител (например, IgM или IgG), который кодируется генами константных областей тяжелых цепей. Константные домены антител не вовлекаются в связывание с антигеном, но у них наблюдается большое число эффекторных функций. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи данное антитело человека или иммуноглобулин может быть отнесено к одному из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Известно, что из большого числа классов иммуноглобулинов человека лишь IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgM человека активируют комплемент. Известно, что у людей ADCC опосредуется

IgG1 и IgG3 человека.

Под используемым в данном документе термином «подкласс» понимают дополнительную детализацию в пределах изоформа гена константной области тяжелой цепи, такую как, например, подклассы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 в изоформе IgG.

5 К используемому в данном документе термину «соединение» или «фармацевтическое соединение» относятся антитела, их антигенсвязывающие участки, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы.

10 Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное для антигена» используются в данном документе взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

Под термином «антителозависимая клеточная цитотоксичность» или «ADCC» понимают клеточно-опосредованную реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки (например, NK-клетки, нейтрофилы, макрофаги и т.д.) распознают антитело, связанное с мишенной клеткой, и после этого вызывают лизис мишенной клетки. Такие цитотоксические клетки, которые опосредуют ADCC, как правило, экспрессируют Fc-рецепторы (FcR). Основные клетки, опосредующие ADCC, (NK-клетки) экспрессируют FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII, FcγRIII и/или FcγRIV. Экспрессия FcR на гематопозитических клетках обобщается в статье Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Для оценки ADCC-активности молекулы может быть осуществлен *in vitro* анализ ADCC, такой как анализ, описанный в патенте США 5500362 или 5821337. К используемым для таких анализов эффекторным клеткам относятся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллеры (NK-клетки). Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность интересующих молекул может быть оценена *in vivo*, например, на модели на животных, такой как модель, описанная в статье Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95:652-656 (1998).

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела, где Fc-область содержит шарнирную область и домены C_H2 и C_H3 тяжелой цепи. Например, FcR может представлять собой FcR человека с нативной последовательностью. FcR может представлять собой рецептор, который связывается с IgG-антителом (гамма-рецептор), и к нему относятся рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcγRIV, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. К рецепторам FcγRIII относятся FcγRIIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют схожие аминокислотные последовательности, которые различаются в основном по их цитоплазматическим доменам. Активирующий рецептор FcγRIIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый активационный мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый ингибиторный мотив (ITIM) (см. статью Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Рецепторы FcR рассматриваются в статьях Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Термином «FcR» в данном документе охватываются и другие FcR, включая не идентифицированные в настоящее время рецепторы. К термину также относится неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)). Основной FcR-связывающий сайт на Fc-фрагментах иммуноглобулинов расположен в шарнирной области между доменами C_H1 и C_H2. Эта шарнирная область взаимодействует с FcR1-3 на различных лейкоцитах

и запускает атаку этих клеток на мишень (Wines et al., *J. Immunol.*, 164:5313-5318 (2000)). Шарнирная область охватывает, но ими не ограничиваясь, последовательности, описанные в патенте США 6165476.

Под термином «способность индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность» понимают способность агента, такого как антитело, продемонстрировать ADCC, измеренную посредством анализа(ов), известного(ых) специалистам в данной области. Такая активность обычно отличается связыванием Fc-области с большим числом рецепторов FcR. Не ограничиваясь каким-либо конкретным механизмом, специалист в данной области должен понимать, что способность антитела продемонстрировать ADCC может происходить, например, в соответствии с его подклассом (таким как IgG1 или IgG3), за счет мутаций, введенных в Fc-область, или в соответствии с модификациями углеводных паттернов в Fc-области антитела. Такие модификации описываются, например, в патентной публикации США 2007-0092521.

Под термином «производные антитела человека» понимают любую модифицированную форму антитела человека, например, конъюгат антитела и другой агент или антитело.

Под термином «гуманизованное антитело» понимают антитела, в которых в каркасные последовательности человека трансплантированы CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь. В каркасных последовательностях человека могут быть осуществлены дополнительные модификации каркасной области.

Под термином «химерное антитело» понимают антитела, в которых последовательности переменных областей происходят из одного вида, а последовательности константных областей происходят из другого вида, такие как антитело, в котором последовательности переменных областей происходят из антитела мыши, а последовательности константных областей происходят из антитела человека.

Под фразой «специфически связывается», используемой в данном документе, понимают соединение, например, белок, нуклеиновую кислоту, антитело и тому подобное, которое распознает и связывается со специфической молекулой, но практически не распознает или не связывается с другими молекулами в образце. Например, антитело или пептидный ингибитор, который распознает и связывается с когнатным лигандом (например, антитело против $\alpha 5\beta 1$, которое связывается со своим когнатным антигеном $\alpha 5\beta 1$) в образце, но практически не распознает или не связывается с другими молекулами в образце. Таким образом, при заданных условиях проведения анализа указанный связывающий фрагмент (например, антитело или его антигенсвязывающий участок) связывается преимущественно с конкретной мишенной молекулой, например, $\alpha 5\beta 1$, и не связывается в значительном количестве с другими компонентами, присутствующими в тестируемом образце. Для отбора антитела, которое специфически связывается с интересующей молекулой, может быть использовано большое число форматов анализов. Например, к числу многих исследований, которые могут быть использованы для идентификации антитела, которое специфически взаимодействует с $\alpha 5\beta 1$, относятся твердофазный иммуноанализ ELISA, иммунопреципитация, VIAcore, FACS и анализ вестерн-блот. Как правило, специфическая или селективная реакция должна быть, по меньшей мере, в два раза выше фонового сигнала или шума и лучше более чем в 10 раз выше фона, даже точнее, говорят, что антитело «специфически связывается» с антигеном, если равновесная константа диссоциации (K_D) ≤ 1 мкМ, например, ≤ 100 нМ, а также например, ≤ 10 нМ.

Под используемым в данном документе антителом, которое «специфически

связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека» понимают антитело, которое связывается с интегрином $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше, 5×10^{-8} М или меньше, 3×10^{-8} М или меньше, 1×10^{-8} М или меньше или 5×10^{-9} М или меньше.

5 Под термином « k_{on} », используемым в данном документе, понимают скорость прямой реакции или скорость ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как под термином « k_{off} », используемым в данном документе, понимают скорость обратной реакции или скорость диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Под термином « K_D », используемым в данном документе, понимают константу
10 диссоциации, которую получают из соотношения k_{off} к k_{on} (т.е. k_{off}/k_{on}) и выражают в виде молярной концентрации (М). Величины K_D для антител могут быть определены, используя способы, общепринятые в данной области. Один из способов определения K_D антитела представляет собой применение поверхностного плазмонного резонанса,
15 обычно используя биосенсорную систему, такую как система *Biacore*®.

Под используемым в данном документе термином «высокое сродство» в отношении IgG-антитела понимают антитело, имеющее K_D 1×10^{-7} М или меньше, 5×10^{-8} М или
20 меньше или 5×10^{-9} М или меньше для мишенного антигена. Тем не менее, связывание с «высоким сродством» может варьировать для других изоформ антител. Например, под связыванием с «высоким сродством» для изоформы IgM понимают антитело, имеющее K_D 10^{-6} М или меньше, 10^{-7} М или меньше или 10^{-8} М или меньше.

Под термином «конкурировать», используемым в данном документе по отношению
25 к антителу, понимают, что если первое антитело или его антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание со вторым антителом или его антигенсвязывающим участком, то связывание первого антитела со своим когнатным эпитопом снижается детектируемым образом в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Противоположное, связывание второго
30 антитела со своим эпитопом также детектируемым образом снижается в присутствии первого антитела, может быть верно, но необязательно. То есть первое антитело может ингибировать связывание второго антитела со своим эпитопом, но второе антитело может не ингибировать связывание первого антитела со своим соответствующим эпитопом. Тем не менее, если каждое антитело детектируемым образом ингибирует
35 связывание другого антитела со своим когнатным эпитопом или лигандом, либо до такой же, более высокой, либо меньшей степени, говорят, что антитела «перекрестно конкурируют» друг с другом за связывание соответствующего(их) им эпитопа(ов). Например, перекрестно конкурирующие антитела могут связываться с эпитопом или участком эпитопа, с которым связываются антитела, описанные в данном документе.
40 Настоящее изобретение охватывает применение как конкурирующих, так и перекрестно конкурирующих антител. Независимо от механизма, которым проявляется такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое несоответствие, конформационное изменение или связывание с общим эпитопом или его частью и тому подобное), специалист в данной области должен понимать, основываясь на идеях,
45 предлагаемых в данном документе, что такие конкурирующие и/или перекрестно конкурирующие антитела охватываются изобретением и могут быть использованы для способов, описанных в данном документе.

К термину «эпитоп» относится любая белковая детерминанта, способная специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором.

Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют характеристики специфической трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не с последними, снижается при наличии денатурирующих растворителей.

Под «гликоформой» понимают комплексную олигосахаридную структуру, содержащую сцепление большого числа углеводных единиц. Такие структуры описываются, например, в руководстве *Essentials of Glycobiology* Varki et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999), в котором также предлагается обзор стандартных гликобиологических обозначений. К таким гликоформам относятся, но ими не ограничиваясь, G2, G1, G0, G-1 и G-2 (см., например, международную патентную публикацию WO 99/22764).

«Паттерн гликозилирования» определяется как паттерн углеводных единиц, которые ковалентно соединены с белком (например, гликоформа), а также как сайт(ы), по которым гликоформа(ы) ковалентно присоединена(ы) к пептидному остову белка, конкретнее к белку иммуноглобулина.

По всей видимости, антитела, экспрессируемые различными клеточными линиями или в трансгенных животных, будут обладать разными гликоформами и/или паттернами гликозилирования по сравнению друг с другом. Тем не менее, все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот по данному описанию или содержащие аминокислотные последовательности по данному описанию, являются частью настоящего описания вне зависимости от гликозилирования таких антител.

Под используемым в данном документе термином «индивид» понимают любого человека или животное. Под термином «животное» понимают всех позвоночных, например, млекопитающих и животных, отличных от млекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, курицы, земноводные, рептилии и т.д.

Под используемым в данном документе термином «лечить» понимают снижение частоты, с которой пациент испытывает симптомы заболевания (т.е. рост опухоли и/или метастазирование или другой эффект, опосредованный через количество и/или активность иммунных клеток, и тому подобное). К термину относится введение соединений или агентов по настоящему изобретению для предотвращения или задержки появления симптомов, осложнений или биохимических признаков заболевания, смягчения симптомов или купирования или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или расстройства. Лечение может быть профилактическим (для предотвращения или задержки возникновения заболевания или для предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтической супрессией или смягчением симптомов после выявления заболевания.

Более подробно большое число аспектов изобретения описывается в последующих подразделах.

Антитела против $\alpha 5\beta 1$

Антитела по изобретению отличаются определенными функциональными особенностями или свойствами антител. Например, антитела специфически связываются с $\alpha 5\beta 1$ человека. Предпочтительно, чтобы антитело по изобретению связывалось с $\alpha 5\beta 1$ с высоким сродством, например, с K_D 1×10^{-7} М или меньше.

Предпочтительно, чтобы антитело связывалось с $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 5×10^{-8} М или меньше, 2×10^{-8} М или меньше, 5×10^{-9} М или меньше, 4×10^{-9} М или меньше, 3×10^{-9} М или

меньше или $2,7 \times 10^{-9}$ М или меньше. В данной области известны анализы для оценки связывающей способности антител к $\alpha 5\beta 1$, к ним относятся, например, ELISA, вестерн-блот, RIA и анализ проточной цитометрии. Подходящие анализы подробно описываются в примерах. Кинетический анализ связывания (например, средство связывания) антител также может быть оценен с помощью анализов, известных в данной области, таких как анализ Biacore.

Антитела против $\alpha 5\beta 1$ по настоящему изобретению также способны индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Такая функциональность может быть достигнута, например, путем применения специфических подклассов (например, IgG1, IgG2, IgG3), включающих мутации Fc-домена, которые могут дополнительно повысить уровень ADCC-активности антитела. Такие мутации и способы измерения ADCC дополнительно описываются в примерах.

Моноклональное антитело 22B5

Одно из наглядных антител по изобретению представляет собой моноклональное антитело человека 22B5, описанное в примерах 1 и 2. Аминокислотная последовательность V_H антитела 22B5 представлена на фиг.1B и приводится в SEQ ID NO:7. Аминокислотная последовательность V_L антитела 22B5 представлена на фиг.1D и приводится в SEQ ID NO:8. Как показано на фиг.1B и фиг.2, варибельная область тяжелой цепи антитела 22B5 содержит две мутации по сравнению с генной последовательностью зародышевой линии человека. А именно, 22B5 содержит одну мутацию изолейцина в серин по аминокислотному остатку номер 30 (I30S) и одну мутацию аспарагина в серин по аминокислотному остатку номер 33 (N33S). Под используемым в данном документе обозначением «22B5» понимают антитело, в котором были сделаны указанные мутации (I30S и N33S) варибельной области тяжелой цепи зародышевой линии.

Учитывая, что 22B5 может связываться с $\alpha 5\beta 1$, последовательности V_H и V_L могут быть «смешаны и совмещены» с другими антителами против $\alpha 5\beta 1$ для создания дополнительных связывающих молекул против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению. Связывание с $\alpha 5\beta 1$ таких «смешанных и совмещенных» антител может быть протестировано, используя анализы связывания, описанные выше и в примерах (например, анализы ELISA). В одном из случаев при смешивании и совмещении V_H и V_L -цепей V_H -последовательность определенной пары V_H/V_L замещается подобной в структурном отношении V_H -последовательностью. Аналогично, в другом случае V_L -последовательность определенной пары V_H/V_L замещается подобной в структурном отношении V_L -последовательностью.

В другом аспекте изобретение относится к антителам, которые содержат области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых и легких цепей антитела 22B5. Аминокислотная последовательность CDR1-области V_H антитела 22B5 представлена в SEQ ID NO:1. Аминокислотная последовательность CDR2-области V_H антитела 22B5 представлена в SEQ ID NO:2. Аминокислотная последовательность CDR3-области V_H антитела 22B5 представлена в SEQ ID NO:3. Аминокислотная последовательность CDR1-области V_L -области антитела 22B5 представлена в SEQ ID NO:4. Аминокислотная последовательность CDR2-области V_L -области антитела 22B5 представлена в SEQ ID NO:5. Аминокислотная последовательность CDR3-области V_L -области антитела 22B5 представлена в SEQ ID NO:6. CDR-области определяют,

используя систему Кабат (Kabat E.A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242).

Учитывая, что антитело 22B5 связывается с $\alpha 5\beta 1$ и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается преимущественно областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H -области и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L -области могут быть «смешаны и совмещены» (т.е. CDR-области различных антител против $\alpha 5\beta 1$ могут быть смешаны и совмещены, хотя каждое антитело будет содержать, как и положено, CDR1, CDR2 и CDR3 области V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 области V_L) для создания дополнительных связывающих молекул против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению. Связывание с $\alpha 5\beta 1$ таких «смешанных и совмещенных» антител может быть протестировано, используя анализы связывания, описанные выше и в примерах (например, анализы ELISA, анализ Biacore). В одном из случаев при смешивании и совмещении CDR-последовательностей области V_H последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из определенной последовательности V_H замещается структурно подобной(ыми) последовательность(ями) CDR. Аналогично, при смешивании и совмещении последовательностей CDR области V_L последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из определенной последовательности V_L , как правило, замещается структурно подобной(ыми) последовательность(ями) CDR. Специалисту в данной области будет нетрудно понять, что новые последовательности V_H и V_L могут быть созданы путем замещения одной или нескольких последовательностей CDR-областей областей V_H и/или V_L структурно подобными последовательностями исходя из CDR-последовательностей, описанных в данном документе.

Соответственно, по другому аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и/или (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; где антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$, предпочтительно с $\alpha 5\beta 1$ человека.

Моноклональные антитела 2D2, 24C7 и 1D9

Другое наглядное антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело человека 2D2, описанное в примерах 1 и 8. Аминокислотная последовательность области V_H антитела 2D2 представлена в SEQ ID NO:39. Аминокислотная последовательность области V_L антитела 2D2 представлена в SEQ ID NO:40.

Другое наглядное антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело человека 24C7, описанное в примерах 1 и 8. Аминокислотная последовательность области V_H антитела 24C7 представлена в SEQ ID NO:19.

Аминокислотная последовательность области V_L антитела 24C7 представлена в SEQ ID NO:20.

Другое наглядное антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело человека 1D9, описанное в примерах 1 и 8. Аминокислотная последовательность области V_H антитела 1D9 представлена в SEQ ID NO:29.

Аминокислотная последовательность области V_L антитела 1D9 представлена в SEQ ID NO:30.

Учитывая, что антитела 2D2, 24C7 и 1D9 могут связываться с $\alpha 5\beta 1$, последовательности V_H и V_L этих антител могут быть «смешаны и совмещены» с другими антителами против $\alpha 5\beta 1$ для создания дополнительных связывающих молекул против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению. Связывание с $\alpha 5\beta 1$ таких «смешанных и совмещенных» антител может быть протестировано, используя анализы связывания, описанные выше и в примерах (например, анализы ELISA,). В одном из случаев при смешивании и совмещении цепей V_H и V_L последовательность V_H определенной пары V_H/V_L замещается структурно подобной последовательностью V_H . Аналогично, в другом случае последовательность V_L определенной пары V_H/V_L замещается структурно подобной последовательностью V_L .

В другом аспекте изобретение относится к антителам, которые содержат области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых и легких цепей антител 2D2, 24C7 и 1D9. Соответствующие аминокислотные последовательности этих CDR-областей указаны ниже.

Антитело	CDR	SEQ ID NO:		Антитело	CDR	SEQ ID NO:
2D2	V_H CDR1	33		24C7	V_L CDR1	16
2D2	V_H CDR2	34		24C7	V_L CDR2	17
2D2	V_H CDR3	35		24C7	V_L CDR3	18
2D2	V_L CDR1	36		1D9	V_H CDR1	23
2D2	V_L CDR2	37		1D9	V_H CDR2	24
2D2	V_L CDR3	38		1D9	V_H CDR3	25
24C7	V_H CDR1	13		1D9	V_L CDR1	26
24C7	V_H CDR2	14		1D9	V_L CDR2	27
24C7	V_H CDR3	15		1D9	V_L CDR3	28

CDR-области определяют, используя систему Кабат (Kabat E.A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242).

Учитывая, что антитела 2D2, 24C7 и 1D9 связываются с $\alpha 5\beta 1$ и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается преимущественно областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 области V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 области V_L могут быть «смешаны и совмещены» (т.е. CDR-области различных антител против $\alpha 5\beta 1$ могут быть смешаны и совмещены, хотя каждое антитело будет содержать, как и положено, CDR1, CDR2 и CDR3-области области V_H и CDR1, CDR2 и CDR3-области области V_L) для создания дополнительных связывающих молекул против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению. Связывание с $\alpha 5\beta 1$ таких «смешанных и совмещенных» антител может быть протестировано, используя исследования связывания, описанные выше и в примерах (например, анализы ELISA, анализ Biacore). В одном из случаев при смешивании и совмещении CDR-последовательностей области V_H последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3

определенной последовательности V_H замещается структурно подобной(ыми) последовательностью(ями) CDR. Аналогично, при смешивании и совмещении CDR-последовательностей области V_L последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 определенной последовательности V_L , как правило, замещается структурно подобной (ыми) последовательностью(ями) CDR. Специалисту в данной области будет нетрудно понять, что новые последовательности V_H и V_L могут быть созданы замещением одной или нескольких последовательностей CDR- области V_H и/или V_L структурно подобными последовательностями из CDR-последовательностей, описанных в данном документе.

Соответственно, по другому аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; и/или (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; где антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$, предпочтительно $\alpha 5\beta 1$ человека.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; и/или (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; где антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$, предпочтительно $\alpha 5\beta 1$ человека.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27; и/или (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28; где антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$, предпочтительно $\alpha 5\beta 1$ человека.

Антитела, имеющие определенные последовательности зародышевой линии

В некоторых аспектах антитело по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи из определенного гена тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии и/или переменную область легкой цепи из определенного гена легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии.

Например, в одном из аспектов изобретение относится к выделенному

моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему
 5 вариабельную область тяжелой цепи, которая представляет собой продукт или
 производное гена человека V_H 4-39, где антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$. В
 другом аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или
 его антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельную область тяжелой цепи,
 10 которая представляет собой продукт или производное гена человека V_H 3-30.3, где
 антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$. В еще одном аспекте изобретение относится
 к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку,
 содержащему вариабельную область легкой цепи, которая представляет собой продукт
 или производное гена человека V_K L6, где антитело специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$.

В еще одном наглядном аспекте изобретение относится к выделенному
 моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, где антитело:

(a) содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая представляет собой
 15 продукт или производное гена человека V_H 4-39 (этот ген кодирует аминокислотную
 последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7) или гена человека 3-30.3 (этот ген
 кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:19, 29 или
 39);

(b) содержит вариабельную область легкой цепи, которая представляет собой продукт
 20 или производное гена человека V_K L6 (этот ген кодирует аминокислотную
 последовательность, приведенную в SEQ ID NO:8, 20, 30 или 40); и

(c) специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$, предпочтительно $\alpha 5\beta 1$ человека.

Примером антитела, имеющего V_H и V_L -последовательности генов V_H 4-39 и V_K L6
 соответственно, является 22B5. Примерами антител, имеющих V_H и
 25 V_L -последовательности генов V_H 3-30.3 и V_K L6 соответственно, являются 24C7, 2D2
 и 1D9.

Используемое в данном документе антитело человека содержит вариабельные
 области тяжелой или легкой цепи, которые представляют собой «продукт» или
 30 «производное» определенной последовательности зародышевой линии, если
 вариабельные области антитела получают из системы, в которой используются
 иммуноглобулиновые гены зародышевой линии человека. К таким системам относятся
 иммунизация трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулинов человека, с помощью
 интересующего антигена или скрининг библиотеки иммуноглобулиновых генов человека
 35 в формате фагового дисплея с помощью интересующего антигена. Антитело человека,
 которое представляет собой «продукт» или «производное» иммуноглобулиновой
 последовательности зародышевой линии человека, может быть идентифицировано в
 силу этого путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека
 с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии
 40 человека и отбора иммуноглобулиновой последовательности зародышевой линии
 человека, которая наиболее близка по последовательности (т.е. имеет самый высокий
 % идентичности) к последовательности антитела человека. Антитело человека, которое
 представляет собой «продукт» или «производное» определенной иммуноглобулиновой
 последовательности зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные
 45 отличия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, вследствие,
 например, природных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-
 специфической мутации. Тем не менее, выбранное антитело человека, как правило, по
 меньшей мере, на 90% идентично по аминокислотной последовательности с

аминокислотной последовательностью, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело человека как человеческое при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В некоторых случаях антитело человека может быть, по меньшей мере, на 95% или даже, по меньшей мере, на 96%, 97%, 98% или 99% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии. В некоторых случаях антитело человека идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой Ig геном зародышевой линии. Как правило, у антитела человека, происходящего из определенной последовательности зародышевой линии человека, будет наблюдаться не более 10 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии человека. В некоторых случаях у антитела человека может наблюдаться не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного отличия от аминокислотной последовательности, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии.

Гомологичные антитела

В еще одном аспекте антитело по изобретению содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям наглядных антител, описанных в данном документе, и где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению.

Например, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

- (а) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7, 19, 29 и 39;
- (б) переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 20, 30 и 40; и у антитела наблюдаются одно или несколько из следующих свойств:

- (i) антитело связывается с $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше;
- (ii) антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность.

В большом числе примеров антитело может представлять собой, например, антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

В других примерах аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут быть на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичны последовательностям, приведенным выше. Антитело, имеющее области V_H и V_L , обладающие высокой (т.е. 80% или больше) гомологией с областями V_H и V_L последовательностей, приведенных выше, может быть получено мутагенезом (например, сайт-специфическим или ПЦР-опосредованным мутагенезом) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 7, 19, 29, 39, 8, 20, 30 и/или 40, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела в отношении сохраненной функции (т.е. свойств, приведенных в (i) и/или (ii) выше), используя функциональные анализы, описанные в данном документе.

Используемый в данном документе процент гомологии между двумя

аминокислотными последовательностями равен проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию от числа идентичных позиций, принадлежащих последовательностям (т.е. % гомологии = # идентичных позиций/общее # позиций × 100), принимая в расчет число разрывов и длину каждого разрыва, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено, используя математический алгоритм, описанный в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен, используя алгоритм E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу остатков весовых коэффициентов PAM120, штраф за продолжающийся гэп 12 и штраф за гэп 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен, используя алгоритм Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)), который встроен в программу GAP в пакете программ GCG (доступен в), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, и штраф за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и за его продолжение 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Дополнительно или альтернативно, белковые последовательности по настоящему изобретению дополнительно могут использоваться в качестве «поисковой последовательности» для осуществления поиска в опубликованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такой поиск может быть осуществлен, используя программу XBLAST (версия 2.0) авторов Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиск белков посредством BLAST может быть осуществлен с помощью программы XBLAST, вес выравнивания = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам антител по изобретению. Для получения выравниваний с разрывами с целями сравнения может быть использована программа Gapped BLAST, описанная в статье Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Антитела с консервативными модификациями

В некоторых случаях антитело по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или несколько из этих CDR-последовательностей содержат определенные аминокислотные последовательности на основе наглядных антител, описанных в данном документе (например, 22B5, 1D9, 24C7 и 2D2) или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют одно или несколько желаемых функциональных свойств антител против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению. Соответственно, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где:

(а) последовательность переменной области тяжелой цепи CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:3, 15, 25 и 35 и их консервативных модификаций;

(b) последовательность переменной области легкой цепи CDR3 содержит

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:6, 18, 28 и 38 и их консервативных модификаций; и у антитела наблюдаются одно или несколько из следующих свойств:

(i) антитело связывается с $\alpha 5\beta 1$ человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше;

(ii) антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность.

В других случаях последовательность вариабельной области тяжелой цепи CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, 14, 24 и 34 и их консервативных модификаций; и последовательность вариабельной области легкой цепи CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, 17, 27 и 37 и их консервативных модификаций. В другом случае последовательность вариабельной области тяжелой цепи CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 13, 23 и 33 и их консервативных модификаций; и последовательность вариабельной области легкой цепи CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, 16, 26 и 36 и их консервативных модификаций.

Под используемым в данном документе термином «консервативная модификация» понимают аминокислотные модификации, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. К таким консервативным модификациям относятся замены, добавки и делеции аминокислот. Модификации могут быть введены в антитело по изобретению стандартными техниками, известными в данной области, такими как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативная модификация данной последовательности может включать такие последовательности, которые, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентичны этой последовательности. Консервативные замены аминокислот представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи. К этим семействам относятся аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в CDR-областях антитела по изобретению могут быть замещены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей и измененное антитело может быть протестировано в отношении сохраненной функции (т.е. свойств, приведенных в (i) и (ii) выше), используя функциональные анализы, описанные в данном документе. Другой тип аминокислотной модификации представляет собой устранение пар аспарагин-глицин, которые образуют сайты потенциального дезамидирования, путем изменения одного или обоих остатков. В другом примере расщепили С-концевой лизин тяжелой цепи антитела против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению и он, таким образом, не представлен. Расщепление С-концевого лизина может быть разработано заранее или может быть результатом условий, использованных для

экспрессии и очистки антитела. В большом числе случаев тяжелые и легкие цепи антител против $\alpha 5\beta 1$ могут необязательно включать сигнальную последовательность.

Антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и наглядные антитела против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению

5 В другом аспекте изобретение относится к антителам, которые связываются с тем же эпитопом на $\alpha 5\beta 1$ человека, что и любое наглядное моноклональное антитело против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению (т.е. антителам, которые способны перекрестно конкурировать за связывание с $\alpha 5\beta 1$ с любым моноклональным антителом по изобретению). Например, референсное антитело для исследований перекрестного конкурирования может
10 представлять собой моноклональное антитело 22B5 (имеющее последовательности V_H и V_L , представленные в SEQ ID NO:7 и 8 соответственно) или моноклональное антитело 24C7 (имеющее последовательности V_H и V_L , представленные в SEQ ID NO:19 и 20 соответственно), или моноклональное антитело 1D9 (имеющее последовательности V_H
15 и V_L , представленные в SEQ ID NO:29 и 30 соответственно), или моноклональное антитело 2D2 (имеющее последовательности V_H и V_L , представленные в SEQ ID NO:39 и 40 соответственно). Такие перекрестно конкурирующие антитела могут быть идентифицированы исходя из их способности перекрестно конкурировать с антителами 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2 в стандартных анализах связывания с $\alpha 5\beta 1$. Например, для
20 демонстрации перекрестной конкуренции с наглядными антителами по настоящему изобретению могут быть использованы анализ BIAcore, анализы ELISA или проточная цитометрия. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание, например, антител 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2 с $\alpha 5\beta 1$ человека указывает на то, что тестируемое антитело может конкурировать с антителами 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2 за связывание
25 с $\alpha 5\beta 1$ человека и, таким образом, связывается с тем же эпитопом на $\alpha 5\beta 1$ человека, что и антитела 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2. В одном из случаев антитело, которое связывается с тем же эпитопом на $\alpha 5\beta 1$ человека, что и антитела 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2, представляет собой моноклональное антитело человека. Такие моноклональные антитела человека могут быть получены и выделены, как описано, например, в
30 примерах.

Созданные и модифицированные антитела

Антитело или его антигенсвязывающий участок по изобретению дополнительно может быть получено, используя антитело, имеющее одну или несколько
35 последовательностей V_H и/или V_L , описанных в данном документе, в качестве исходного материала для создания модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может обладать измененными свойствами по отношению к исходному антителу. Антитело может быть создано модификацией одного или нескольких остатков в одном или обеих переменных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в одном или
40 нескольких CDR-областях и/или в одном или нескольких каркасных областях. Дополнительно или альтернативно, антитело может быть создано модификацией остатков в константной(ых) области(ях), например, с целью изменения эффекторной (ых) функции(й) антитела.

Один из типов создания переменной области, которая может быть осуществлена,
45 представляет собой пересадку CDR. Антитела взаимодействуют с мишенными антигенами преимущественно по аминокислотным остаткам, которые расположены в шести областях, определяющих комплементарность, тяжелой и легкой цепи (CDR-областях). Поэтому аминокислотные последовательности в CDR-областях больше

различаются между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR-областей. Поскольку CDR-последовательности отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, возможно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических природных антител, путем конструирования экспрессирующих векторов, которые включают CDR-последовательности из специфического природного антитела, пересаженные в каркасные последовательности отличного антитела с отличающимися свойствами (см., например, статьи Riechmann L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; патент США 5225539 автора Winter и патенты США 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370 авторов Queen *et al.*)

Соответственно, другой аспект изобретения относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему участку, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 13, 23 и 33, SEQ ID NO:2, 14, 24 и 34 и SEQ ID NO:3, 15, 25 и 35 соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:4, 16, 26 и 36, SEQ ID NO:5, 17, 27 и 37, и SEQ ID NO:6, 18, 28 и 38, соответственно. Поэтому такие антитела содержат CDR-последовательности областей V_H и V_L моноклональных антител 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2, но могут содержать каркасные последовательности, отличные от каркасных последовательностей этих антител.

Такие каркасные последовательности могут быть получены из опубликованных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают генные последовательности антитела зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов переменных областей тяжелой и легкой цепей человека могут быть найдены в базе данных последовательностей зародышевой линии человека «VBase» (доступной через интернет), а также в руководстве Kabat E.A. *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242; статьях Tomlinson I.M. *et al.* (1992), *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox J.P.L. *et al.* (1994), *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание которых прямо приводится в данном документе в качестве ссылки). В качестве другого примера, ДНК-последовательности зародышевой линии генов переменных областей тяжелой и легкой цепей человека могут быть найдены в базе данных Genbank. Например, следующие последовательности тяжелой цепи зародышевой линии, обнаруженные у мыши HCo7 HuMAb, доступны в сопроводительных номерах доступа базы данных Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 и BC070333), 3-33 (NG_0010109 и NT_024637) и 3-7 (NG_0010109 и NT_024637). В качестве другого примера, следующие последовательности тяжелой цепи зародышевой линии, обнаруженные у мыши HCo12 HuMAb, доступны в сопроводительных номерах доступа базы данных Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 и BC070333), 5-51 (NG_0010109 и NT_024637) и 4-34 (NG_0010109 и NT_024637), 3-30.3 (X92283) и 3-23 (AJ406678).

К каркасным последовательностям, используемым в антителах по изобретению, относятся, но ими не ограничиваясь, последовательности, которые в структурном отношении аналогичны каркасным последовательностям, используемым в выбранных антителах по изобретению, например, аналогичны каркасным последовательностям V_H 4-39 и/или V_H 3-30.3 и/или каркасным последовательностям V_K L6, используемым в наглядных моноклональных антителах по изобретению. Например,

последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 области V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 области V_L могут быть пересажены в каркасные области, которые имеют последовательность, идентичную последовательности, обнаруженной в иммуноглобулиновом гене зародышевой линии, из которого происходит каркасная последовательность, или CDR-последовательности могут быть пересажены в каркасные области, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях полезно мутировать остатки в каркасных областях, чтобы сохранить или усилить антигенсвязывающую способность антитела (см., например, патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторов Queen *et al.*).

Другой тип модификации варибельной области представляет собой мутирование аминокислотных остатков в областях CDR1, CDR2 и/или CDR3 областей V_H и/или V_L с целью улучшения одного или нескольких свойств связывания (например, сродства) интересующего антитела. Для введения мутации(й) может быть осуществлен сайт-специфический мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез, и влияние на связывание антитела, или другое интересующее функциональное свойство может быть оценено в анализах *in vitro* или *in vivo*, описанных в данном документе и предложенных в примерах. Как правило, вводят консервативные модификации (описанные выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавки или делеции. Более того, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в CDR-области.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к выделенным моноклональным антителам против $\alpha 5\beta 1$ или их антигенсвязывающим участкам, содержащим варибельную область тяжелой цепи, содержащую: (а) CDR1-область области V_H , содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:1, 13, 23 и 33, и аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок по сравнению с последовательностями SEQ ID NO:1, 13, 23 или 33; (б) CDR2-область области V_H , содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из последовательностей SEQ ID NO:2, 14, 24 и 34, и аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок по сравнению с последовательностями SEQ ID NO:2, 14, 24 или 34; (с) CDR3-область области V_H , содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из последовательностей SEQ ID NO:3, 15, 25 и 35, и аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок по сравнению с последовательностями SEQ ID NO:3, 15, 25 или 35; (d) CDR1-область области V_L , содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из последовательностей SEQ ID NO:4, 16, 26 и 36, и аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок по сравнению с последовательностями SEQ ID NO:4, 16, 26 или 36; (е) CDR2-область области V_L , содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из последовательностей SEQ ID NO:5, 17, 27 и 37, и аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок по сравнению с последовательностями SEQ ID NO:5, 17, 27 или 37; и (f) CDR3-область области V_L , содержащую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящую из последовательностей SEQ ID NO:6, 18, 28 и 38, и аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок по сравнению с последовательностями SEQ ID NO:6, 18, 28 или 38.

5 К созданным антителам по изобретению относятся антитела, в которых модификации осуществлены по каркасным остаткам в области V_H и/или V_L , например, для улучшения свойств антитела. Обычно такие модификации каркасных областей осуществляют с целью снижения иммуногенности антитела. Например, один из способов представляет собой «возвратное мутирование» одного или нескольких каркасных остатков к соответствующей последовательности зародышевой линии. Конкретнее, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходит. Такие остатки могут быть идентифицированы сравнением каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых антитело происходит. Для возврата последовательностей каркасной области к их зародышевой конфигурации соматические мутации могут быть «возвратно мутированы» к последовательности зародышевой линии с помощью, например, сайт-специфического мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза.

10 Другой тип модификации каркасной области включает мутирование одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одном или нескольких CDR-областях для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы таким образом снизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также обозначают как «деиммунизация», и он более подробно описывается в патентной публикации США 20030153043 авторами Carr *et al.*

15 Помимо или в противоположность к модификациям, созданным в каркасных или CDR-областях, антитела по изобретению могут быть созданы включением модификаций в Fc-область, как правило, с целью изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полувыведения из сыворотки, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело по изобретению может быть химически модифицировано (например, к антителу могут быть присоединены один или несколько фрагментов) или модифицировано с целью изменения его гликозилирования, опять же для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих аспектов более подробно описывается ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу EU по Kabat.

20 В одном из случаев шарнирную область домена CH1 модифицируют таким образом, что изменяют количество цистеиновых остатков в шарнирной области, например, увеличивают или уменьшают. Этот подход дополнительно описывается в патенте США 5677425 авторами Vodmer *et al.* Количество цистеиновых остатков в шарнирной области CH1 изменяют, например, для содействия сборке легкой и тяжелой цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

25 В другом случае подвергают мутированию шарнирную область Fc-фрагмента антитела для снижения биологического периода полувыведения антитела. Конкретнее, в пограничную область доменов CH2-CH3 Fc-шарнирного фрагмента вводят одну или несколько аминокислотных мутаций, так что связывание антитела со стафилококковым белком А (SpA) ослабевает по сравнению со связыванием SpA нативным Fc-шарнирным доменом. Этот подход более подробно описывается в патенте США 6165745 авторами Ward *et al.*

В другом случае антитело модифицируют с целью повысить его биологический период полувыведения. Возможно большое число подходов. Например, могут быть встроены одна или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описывается в патенте США 6277375 автором Ward. Альтернативно, для повышения биологического периода полувыведения антитело может быть изменено в СН1-домене или СL-области таким образом, чтобы содержать эпитоп, связывающий рецептор спасения, взятый из двух петель СН2-домена Fc-области иммуноглобулина IgG, как описано в патентах США 5869046 и 6121022 авторами Presta *et al.*

В других случаях для изменения эффекторной(ых) функции(й) антитела изменяют Fc-область путем замещения, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка отличным аминокислотным остатком. Например, одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть заменены отличным аминокислотным остатком, так что антитело будет обладать измененным сродством в отношении эффекторного лиганда, но сохранит антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, сродство к которому изменяют, может представлять собой Fc-рецептор или C1-компонент комплемента. Этот подход более подробно описывается в патентах США 5624821 и 5648260 авторами Winter *et al.*

В другом случае одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, могут быть заменены отличным аминокислотным остатком, так что антитело будет обладать измененным связыванием C1q и/или сниженной или отсутствующей комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Этот подход более подробно описывается в патенте США 6194551 авторами Idusogie *et al.*

В другом примере изменяют один или несколько аминокислотных остатков в позициях аминокислот 231 и 239, таким образом, изменяя способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описывается в РСТ публикации WO 94/29351 авторами Bodmer *et al.*

В еще одном примере Fc-область модифицируют, чтобы повысить способность антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повысить сродство антитела к Fcγ-рецептору, посредством модификации одной или нескольких аминокислот в следующих позициях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439.

Этот подход дополнительно описывается в РСТ публикации WO 00/42072 автором Presta. Более того, сайты связывания на IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы, и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Показано, что специфические мутации в позициях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, показано, что следующие сочетанные мутации улучшают связывание с FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A. Например, антитело 22B5/DLE, описанное в данном документе, имеет подкласс IgG1 изотипа IgG, но с введенными путем сайт-специфического мутагенеза следующими мутациями (по сравнению с подклассом IgG1 дикого типа): S247D; A338L и I340E. Аналогично, как более подробно описано ниже, такие мутации S247D, A338L и I340E были введены в моноклональные антитела 24C7, 1D9 и 2D2. Как дополнительно описывается в примерах, такие мутации могут повысить сродство антитела к Fcγ-рецепторам и, таким образом, повысить его

эффекторную функцию. Поэтому изобретение относится к антителу, которое содержит, по меньшей мере, одну мутацию в Fc-области и обладает детектируемо большим ADCC-ответом, чем в других отношениях идентичное антитело, не содержащее, по меньшей мере, одной мутации.

5 В еще одном примере модифицируют гликозилирование антитела. Например, может быть создано агликозилированное антитело (т.е. антитело с недостатком гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено с целью, например, повышения сродства антитела к антигену. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем изменения одного или нескольких сайтов
10 гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть осуществлены одна или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасной области варибельной области, благодаря чему устраняется гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повышать сродство антитела к антигену. Такой подход более подробно описан
15 в патентах США 5714350 и 6350861 авторами Co *et al.*

Дополнительно или альтернативно, может быть создано антитело, которое обладает измененным типом гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенное количество бисекторных структур GlcNac. Было показано, что такие
20 измененные паттерны гликозилирования повышают ADCC-способность антител. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. В данной области были описаны клетки с измененным механизмом гликозилирования, и они могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют
25 рекомбинантные антитела по изобретению, таким образом продуцируя антитело с измененным гликозилированием. Например, в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы FUT8 (альфа (1,6) фукозилтрансфераза), поэтому у антител, экспрессируемых на клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709, отсутствует
30 фукоза у их углеводов. Клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 FUT8^{-/-} создавали путем прицельного разрушения гена FUT8 в клетках CHO/DG44, используя два замещающих вектора (см. патентную публикацию США 20040110704 авторов Yamane *et al.* и статью Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng* 87:614-22). В качестве другого примера, в EP 1176195 авторами Hanai *et al.* описывается клеточная линия с функционально
35 разрушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что у антител, экспрессируемых в такой клеточной линии, наблюдается гипофукозилирование за счет снижения или устранения фермента, соответствующего альфа 1,6-связи. Авторами Hanai *et al.* также описываются клеточные линии, которые обладают низкой ферментативной активностью в отношении добавления фукозы к N-ацетилглюкозамину, который
40 связывается с Fc-областью антитела, или не обладают данной ферментативной активностью, например, миеломная клеточная линия крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В PCT публикации WO 03/035835 автором Presta описывается вариант клеточной линии CHO, клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител,
45 экспрессируемых в такой клетке-хозяине (см. также статью Shields R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). В PCT публикации WO 99/54342 авторами Umana *et al.* описываются клеточные линии, созданные для экспрессии гликопротеин-модифицированных гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), так что у антител, экспрессируемых в

созданных клеточных линиях, наблюдаются увеличенные бисекторные структуры GlcNac, что приводит к повышенной ADCC-активности антител (см. также Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Альтернативно, фукозные остатки антитела могут быть отщеплены, используя фермент фукозидазу. Например, фукозидаза альфа-L-фукозидаза удаляет с антител фукозильные остатки (Tarentino A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Другая модификация антител по изобретению представляет собой пегилирование. Антитело может быть пегилировано с целью, например, повысить биологический (например, сывороточный) период полувыведения антитела. Для пегилирования антитела антитело или его фрагмент, как правило, приводят в контакт с полиэтиленгликолем (PEG), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное PEG, в условиях, в которых одна или несколько групп PEG присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Как правило, пегилирование осуществляют через реакцию ацилирования или реакцию алкилирования с реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Под используемым в данном документе термином «полиэтиленгликоль» понимают любую форму PEG, которая использовалась для получения производных других белков, такую как моно (C1-C10) алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликольмалеимид. В некоторых случаях пегилируемое антитело представляет собой агликозилированное антитело. В данной области известны способы пегилирования белков, и они могут быть применены к антителам по изобретению. См., например, EP 0154316 авторов Nishimura *et al.* и EP 0401384 авторов Ishikawa *et al.*

Способы создания антител

Как описано выше, антитела против $\alpha 5\beta 1$, имеющие последовательности V_H и V_L , описанные в данном документе, могут быть использованы для создания новых антител против $\alpha 5\beta 1$ путем модификации последовательностей V_H и/или V_L , или константной (ых) области(ей), соединенной(ых) с ними. Таким образом, в другом аспекте изобретения структурные особенности антитела против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению, например антитела 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2, используют для создания родственных в структурном отношении антител против $\alpha 5\beta 1$, у которых сохраняется, по меньшей мере, одно функциональное свойство антитела по изобретению, такое как связывание с $\alpha 5\beta 1$ человека. Например, одна или несколько CDR-областей антител 22B5, 24C7, 1D9 или 2D2 или их мутаций могут быть объединены с помощью рекомбинантных техник с известными каркасными областями и/или другими CDR-областями для создания дополнительных, созданных с помощью рекомбинантных техник антител против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению, описанных выше. К другим типам модификаций относятся модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходный материал для способа создания представляет собой одну или несколько последовательностей V_H и/или V_L по данному изобретению или один или несколько их CDR-областей. Для создания нового антитела необязательно на самом деле получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько последовательностей V_H и/или V_L по данному изобретению или один или несколько их CDR-областей. Достаточно, чтобы информацию, содержащуюся в последовательности(ях), можно было использовать в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) «второго поколения», полученной(ых) из исходной(ых) последовательности(ей), и затем последовательность (и) «второго поколения» получают и экспрессируют в виде белка.

Соответственно, в другом аспекте изобретение относится к способу получения

антитела против $\alpha 5\beta 1$, содержащему:

(a) получение: (i) последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:1, 13, 23 и 33, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:2, 14, 24 и 34, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:3, 15, 25 и 35; и/или (ii) последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, 16, 26 и 36, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO:5, 17, 27 и 37, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, 18, 28 и 38;

(b) изменение, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела и/или последовательности вариабельной области легкой цепи антитела с целью создания, по меньшей мере, одной измененной последовательности антитела; и

(c) экспрессию измененной последовательности антитела в виде белка.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела могут быть использованы стандартные молекулярно-биологические техники.

Предпочтительно, чтобы антитело, кодируемое измененной(ыми) последовательность(ями) антитела, представляло собой антитело, которое сохранило бы одно, несколько или все функциональные свойства антител против $\alpha 5\beta 1$, описанных в данном документе, к этим функциональным свойствам относятся, но ими не ограничиваясь:

(i) связывание с $\alpha 5\beta 1$ человека с $K_D 1 \times 10^{-7}$ М или меньше;

(ii) способность индуцировать ADCC.

Функциональные свойства измененных антител могут быть оценены, используя стандартные анализы, доступные в данной области и/или описанные в данном документе, такие как анализы, приведенные в примерах (например, проточную цитометрию, анализы связывания).

В некоторых аспектах способов создания антител по изобретению мутации могут быть введены случайным образом или избирательно вдоль всей или части последовательности, кодирующей антитело против $\alpha 5\beta 1$, и полученные модифицированные антитела против $\alpha 5\beta 1$ могут быть скринированы в отношении связывающей активности и/или других функциональных свойств, описанных в данном документе. Способы мутирования описаны в данной области. Например, в РСТ публикации WO 02/092780 автором Short описаны способы создания и скринирования мутаций антител, используя насыщающий мутагенез, сборку искусственным лигированием или их сочетание. Альтернативно, в РСТ публикации WO 03/074679 авторами Lazar *et al.* описываются способы применения компьютерных методов скрининга с целью оптимизации физико-химических свойств антител.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела по изобретению

Другой аспект изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела по изобретению. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной, или практически чистой форме. Нуклеиновую кислоту «выделяют» или «делают практически чистой», очищая от других клеточных компонентов или других контаминантов, например, других нуклеиновых кислот или белков клетки, с помощью любых подходящих техник, включая обработку щелочью/SDS, CsCl-бэндинг, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие. См. руководство F. Ausubel *et al.*, ed. (1987) Current Protocols

in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота по изобретению может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержит интронные последовательности. Как правило, нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

5 Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены, используя любые подходящие техники молекулярной биологии. В отношении антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, дополнительно описанными ниже), молекулы кДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, созданного гибридомой, могут быть
10 получены с помощью ПЦР-амплификации или техник клонирования кДНК. В отношении антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, используя техники фаговых дисплеев), нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть получена из библиотеки.

К молекулам нуклеиновых кислот по изобретению относятся, например, молекулы,
15 кодирующие последовательности V_H и V_L моноклонального антитела 22B5.

Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_H антитела 22B5, представлена в SEQ ID NO:11. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_L антитела 22B5, представлена в SEQ ID NO:12. Другие наглядные
20 молекулы нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, представляют собой молекулы, кодирующие последовательности V_H и V_L моноклональных антител 24C7, 1D9 или 2D2. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_H антитела 24C7, представлена в SEQ ID NO:21. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_L антитела 24C7, представлена в SEQ ID NO:22.

25 Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_H антитела 1D9, представлена в SEQ ID NO:31. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_L антитела 1D9, представлена в SEQ ID NO:32. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_H антитела 2D2, представлена в SEQ ID NO:
30 41. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность V_L антитела 2D2, представлена в SEQ ID NO:42.

После получения ДНК-фрагментов, кодирующих сегменты V_H и V_L , эти ДНК-фрагменты могут быть дополнительно обработаны с помощью любых подходящих
35 техник рекомбинантных ДНК, например, для превращения генов переменных областей в гены цепей полноразмерного антитела, в гены Fab-фрагментов или в ген scFv. В этих манипуляциях ДНК-фрагмент, кодирующий V_L или V_H , функционально связывают с другим ДНК-фрагментом, кодирующим другой белок, таким как константная область антитела или гибкий линкер. Под термином «функционально связывают», используемым
40 в данном контексте, понимают, что два ДНК-фрагмента соединяют таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя ДНК-фрагментами, остаются в рамке считывания.

Выделенная ДНК, кодирующая V_H -область, может быть превращена в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания V_H -кодирующей
45 ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (СН1, СН2 и СН3). Последовательности генов константных областей тяжелой цепи человека известны в данной области (см., например, руководство Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth edition, U.S. Department of Health and Human

Services, NIH Publication № 91-3242), и ДНК-фрагменты, охватывающие эти области, могут быть получены стандартной ПЦР-амплификацией. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область иммуноглобулинов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительно, если представляет собой константную область IgG1 или IgG4. Последовательность константной области IgG1 может представлять собой любой из большого числа аллелей или аллотипов, как известно, обнаруживаемых среди различных индивидуумов, таких как Gm(1), Gm(2), Gm(3) и Gm(17). Эти аллотипы представляют природную аминокислотную замену в константных областях IgG1. В отношении гена тяжелой цепи Fab-фрагмента, ДНК, кодирующая V_H , может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей лишь константную область тяжелой цепи CH1.

Выделенная ДНК, кодирующая V_L -область, может быть превращена в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab-фрагмента) путем функционального связывания V_L -кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи C_L . Последовательности генов константных областей легкой цепи человека известны в данной области (см., например, руководство Kabat E.A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242), и ДНК-фрагменты, охватывающие эти области, могут быть получены стандартной ПЦР-амплификацией. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область легкой цепи каппа или лямбда.

Для создания гена scFv V_H - и V_L -кодирующие ДНК-фрагменты функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly_4-Ser)_3$, так что последовательности V_H и V_L могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка, причем V_L и V_H -области соединены гибким линкером (см., например, статьи Bird *et al.* (1988) *Science*242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature*348:552-554).

Продукция моноклональных антител по изобретению

Моноклональные антитела (mAb) по настоящему изобретению могут быть получены большим числом техник, включающих методологию, принятую для моноклональных антител, например, стандартную технику гибридизации соматических клеток авторов Kohler и Milstein (1975) *Nature* 256:495. Для продукции моноклонального антитела также могут быть использованы и другие техники, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов.

Предпочтительной системой на животных для получения гибридом является система на мышах. Продукция гибридомы у мыши является общепринятой процедурой. Протоколы иммунизации и техники выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Партнеры по слиянию (например, миеломные клетки мыши) и процедуры слияния также известны.

Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут быть получены, основываясь на последовательности моноклонального антитела мыши, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая иммуноглобулины, содержащие тяжелую и легкую цепи, может быть получена из интересующей гибридомы мыши и создана таким образом, чтобы содержать иммуноглобулиновые последовательности, отличные от мышинных (например, человека), используя подходящие молекулярно-

биологические техники. Например, для создания химерного антитела варибельные области мыши могут быть связаны с константными областями человека, используя способы, известные в данной области (см., например, патент США 4816567 авторов Cabilly *et al.*). Для создания гуманизированного антитела CDR-области мыши могут
 5 быть встроены в каркасные области человека, используя способы, известные в данной области (см., например, патент США 5225539 автора Winter и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторов Queen *et al.*).

В некоторых случаях антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против
 10 $\alpha\beta 1$, могут быть получены, используя трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих участки иммунной системы человека вместо иммунной системы мыши. К этим трансгенным или трансхромосомным мышам относятся мыши, обозначаемые в данном документе как HuMAb Mouse® и KM Mouse®, соответственно, и совместно обозначаются в данном документе как «мыши с Ig человека».

15 Мышь HuMAb® (продукция Medarex®, Inc.) содержит минилокусы иммуноглобулиновых генов человека, которые кодируют неперестроенные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой к цепей иммуноглобулина человека наряду с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и к-цепей
 20 (см., например, статью Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474):856-859). Соответственно, у мышей наблюдается сниженная экспрессия IgM или к-цепи мыши, и в ответ на иммунизацию встроены трансгены тяжелой и легкой цепей человека испытывают переключение класса и соматическую мутацию, что приводит к получению высокоаффинных моноклональных IgGk человека (Lonberg N. *et al.* (1994), *выше*;
 25 рассматривается в обзоре Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg N. и Huszar D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, и Harding F. и Lonberg N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение мыши HuMAb® и геномные модификации, которые несут такие мыши, дополнительно описаны в статьях Taylor L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen J. *et al.* (1993) *International*
 30 *Immunology* 5:647-656; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailleon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6:579-591; and Fishwild D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14; 845-851. См. дополнительно патенты США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318;
 35 5874299 и 5770429 авторов Lonberg и Kay; патент США 5545807 авторов Surani *et al.*; РСТ публикации WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962 авторов Lonberg и Kay; и РСТ публикацию WO 01/14424 авторов Korman *et al.*

В другом случае антитела человека по изобретению могут быть получены, используя
 40 мышь, которая несет иммуноглобулиновые последовательности человека на трансгенах и трансхромосомах, такую как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, обозначаемые в данном документе как «мыши KMTM», подробно описаны в РСТ публикации WO 02/43478 авторов Ishida *et al.*

45 Кроме того, в данной области доступны альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, и они могут быть использованы для получения антител против $\alpha\beta 1$ по изобретению. Например, может быть использована альтернативная трансгенная система, обозначаемая как ксеномышь

(Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 авторов Kucherlapati *et al.*

5 Более того, в данной области доступны альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, и они могут быть использованы для получения антител против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению. Например, могут быть использованы мыши, несущие как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, обозначаемые как «мыши ТС»; такие мыши описаны в статье Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Более того, в данной области описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепей человека (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894), и они могут быть
10 использованы для получения антител против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению.

Моноклональные антитела человека по изобретению также могут быть получены, используя способы фагового дисплея для скрининга библиотек иммуноглобулиновых генов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека
15 хорошо известны в данной области. См., например, патенты США 5223409; 5403484 и 5571698 авторов Ladner *et al.*; патенты США 5427908 и 5580717 авторов Dower *et al.*; патенты США 5969108 и 6172197 авторов McCafferty *et al.*; и патенты США 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 авторов Griffiths *et al.*

Моноклональные антитела человека по изобретению также могут быть получены, используя мышей SCID, в которых были восстановлены иммунные клетки человека, так что при иммунизации может быть получен антительный ответ человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США 5476996 и 5698767 авторов Wilson *et al.*

Иммунизация мышей с Ig человека

При использовании мышей с Ig человека для получения антител человека по
25 изобретению такие мыши могут быть иммунизованы с помощью очищенного или обогащенного препарата антигена $\alpha 5\beta 1$ и/или рекомбинантного $\alpha 5\beta 1$ или слитого белка $\alpha 5\beta 1$, как описано в статьях Lonberg N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474):856-859; Fishwild D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; и РСТ публикациях WO 98/24884 и WO 01/14424. Предпочтительно, чтобы при первой инфузии брались мыши в возрасте 6-16
30 недель. Например, очищенный или рекомбинантный препарат (5-50 мкг) антигена $\alpha 5\beta 1$ может быть использован для внутрибрюшинной иммунизации мышей с Ig человека. Более того, для иммунизации мышей могут быть использованы полипептидные фрагменты соответствующих белков, например, $\alpha 5$ и/или $\beta 1$. Например, полипептидные фрагменты могут быть конъюгированы с молекулой носителя для повышения их
35 иммуногенности. Такие молекулы носителя хорошо известны в данной области, и к ним относятся среди прочих гемоцианин лимфы улитки, бычий сывороточный альбумин, тиреоглобулин, дифтерийный токсин и столбнячный токсин.

Подробные процедуры получения полностью человеческих моноклональных антител против $\alpha 5\beta 1$ описаны в примере 1 ниже. Суммирующий эксперимент с большим числом антигенов показал, что трансгенные мыши отвечали при исходной внутрибрюшинной
40 иммунизации (IP) антигеном в полном адъюванте Фрейнда с последующими IP иммунизациями раз в две недели (в итоге до 6) антигеном в неполном адъюванте Фрейнда. Тем не менее, также обнаружено, что эффективны и другие наполнители, отличные от адъюванта Фрейнда. Кроме того, обнаружено, что высоко иммуногенны и целые клетки в отсутствие наполнителя. Иммунный ответ может быть
45 проконтролирован в течение курса протокола иммунизации с помощью образцов плазмы, получаемых с помощью ретроорбитальных кровотоков. Плазма может быть скринирована с помощью ELISA (как описано выше), и мыши с достаточными титрами

иммуноглобулина человека против $\alpha 5\beta 1$ могут быть использованы для слияний. Мыши могут быть стимулированы внутривенным введением антигена за 3 дня до забоя и изъятия селезенки. Предполагается, что может потребоваться 2-3 слияния для каждой иммунизации. Каждым антигеном обычно иммунизируют от 6 до 24 мышей. Обычно используют оба штамма HCo7 и HCo12. Кроме того, оба трансгена и HCo7, и HCo12 могут быть совмещены вместе в одной мышце, имеющей два различных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12). Альтернативно или дополнительно может быть использован штамм KM Mouse®, как описано в примере 1.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека по изобретению, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов иммунизированных мышцей могут быть выделены и слиты с подходящей иммортализованной клеточной линией, такой как миеломная клеточная линия мыши. Полученные гибридомы могут быть скринированы в отношении продукции антигенспецифических антител. Например, суспензии одиночных клеток лимфоцитов селезенки иммунизированных мышцей могут быть слиты с клетками несекретирующей миеломы мыши P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) в количестве один к шести с помощью 50% PEG. Клетки помещают в количестве приблизительно 2×10^5 в плоскодонный планшет для микротитрования с последующей инкубацией в течение двух недель в селективной среде, содержащей 20% сыворотку FetalClone, 18% кондиционированные среды «653», 5% origin (продукция фирмы IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, пенициллин в концентрации 50 Ед/мл, стрептомицин в концентрации 50 мг/мл, гентамицин в концентрации 50 мг/мл и 1-кратную НАТ-добавку (продукция фирмы Sigma; НАТ добавляют через 24 часа после слияния). Примерно через две недели клетки могут быть культивированы в среде, в которой НАТ заменяют на НТ. Отдельные лунки затем могут быть скринированы посредством ELISA в отношении моноклональных антител человека IgM и IgG. После появления распространенного роста гибридомы за средой можно вести наблюдение обычно через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитело, могут быть повторно помещены, вновь скринированы, и если все еще позитивны в отношении IgG человека, моноклональные антитела могут быть субклонированы, по меньшей мере, дважды с помощью предельного разведения. Устойчивые субклоны затем могут быть культивированы *in vitro* для получения небольших количеств антитела в тканевой культуральной среде для характеристики.

Для очистки моноклональных антител человека отобранные гибридомы могут быть выращены в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты могут быть отфильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с помощью белок А-сефарозы (продукция фирмы Pharmacia, Piscataway, N.J.). Для гарантии чистоты элюированный IgG может быть проверен с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Буферный раствор может быть заменен на PBS, и концентрация может быть определена по OD280, используя коэффициент гашения 1,43. Моноклональные антитела могут быть разлиты по аликвотам и оставлены на хранение при -80°C .

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела

Антитела по изобретению также могут быть получены в трансфектоне клетки-хозяина, используя, например, сочетание техник рекомбинантных ДНК и способов трансфекции генов, хорошо известные в данной области (например, Morrison S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или их фрагментов молекулы ДНК, кодирующие

фрагментарные или полноразмерные легкую и тяжелую цепи, могут быть получены стандартными молекулярно-биологическими техниками (например, ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК, используя гибридому или фаг, которые экспрессируют интересующее антитело), и молекулы ДНК могут быть встроены в экспрессирующие векторы, так что гены функционально связываются с последовательностями, контролируемыми транскрипцию и трансляцию. В этом контексте под термином «функционально связанный» понимают, что ген антитела лигируют в вектор, так что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют намеченную функцию регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующий вектор и последовательности, контролирующие экспрессию, выбирают так, чтобы они были совместимы с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или чаще оба гена встраивают в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антитела встраивают в экспрессирующий вектор любыми подходящими способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на генном фрагменте антитела и векторе или лингированием тупых концов при отсутствии сайтов рестрикции). Вариабельные области легкой и тяжелой цепей антител, описанных в данном документе, могут быть использованы для создания генов полноразмерного антитела любого изотипа и подкласса антитела путем встраивания их в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелой и легкой цепей желаемого изотипа и подкласса, таким образом, что V_H -сегмент функционально связывается с C_H -сегментом(ами) в векторе и V_K -сегмент функционально связывается с C_L -сегментом в векторе. Дополнительно или альтернативно рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор, таким образом, что сигнальный пептид связывается внутри рамки считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, отличного от иммуноглобулина).

Помимо генов цепей антитела рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению, как правило, несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Под термином «регуляторная последовательность» понимают промоторы, энхансеры и другие элементы, контролирующие экспрессию (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описываются, например, в руководстве Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалисту в данной области будет понятно, что создание экспрессирующего вектора, включая отбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. К предпочтительным регуляторным последовательностям для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего относятся вирусные элементы, которые приводят к высоким уровням экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. Альтернативно, могут быть использованы невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или β -глобиновый промотор. Более того, регуляторные элементы составлены из последовательностей от различных

источников, такие как промоторная система SR, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный терминальный повтор вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (Takebe Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

5 Помимо генов цепей антител и регуляторных последовательностей рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективирующих маркеров. Ген селективирующего маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые вектор был встроен (см., например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017 авторов 10 Axel *et al.*). Например, обычно ген селективирующего маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор был встроен. К генам селективирующих маркеров относятся ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в клетках-хозяевах dhfr- с селекцией/амплификацией на фоне метотрексата) и ген нео (для селекции на фоне G418).

15 Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессирующий(е) вектор(ы), кодирующие тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью любых подходящих техник. Под большим числом форм термина «трансфекция» понимают широкий диапазон техник, обычно используемых для встраивания экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорацию, 20 преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию DEAE-декстраном и тому подобное. Несмотря на возможность экспрессировать антитела по изобретению либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках-хозяевах, наиболее распространена экспрессия антител в эукариотических клетках и обычно в клетках-хозяевах млекопитающих.

25 К клеткам-хозяевам млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению относятся, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (включая клетки CHO dhfr-, описанные в статье Urlaub и Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, используемые с селективирующим маркером DHFR, например, как описано в статье R.J. Kaufman и P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), миеломные 30 клетки NS0, клетки COS и клетки Sp2. В частности, для применения с миеломными клетками NS0 или клетками CHO другая экспрессирующая система представляет собой экспрессирующую систему гена GS (глутаминсинтетазы), описанную в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 333841. При встраивании рекомбинантных экспрессирующих векторов, кодирующих гены антитела, в клетки-хозяева млекопитающих продуцируются антитела 35 посредством культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах или секреции антитела в культуральную среду, в которой клетки-хозяева выращиваются. Антитела могут быть извлечены из культуральной среды, используя любые подходящие способы очистки белков.

Характеристика связывания антитела с антигеном

40 Антитела или их антигенсвязывающие участки по изобретению могут быть протестированы на связывание с $\alpha\beta 1$, например, с помощью стандартного анализа ELISA. Вкратце, плашки для микротитрования покрывают очищенным $\alpha\beta 1$ в концентрации 0,25 мкг/мл в PBS и затем блокируют с помощью 5% бычьего сывороточного альбумина в PBS. В каждую лунку добавляют разведения антитела 45 (например, разведения плазмы, полученной от $\alpha\beta 1$ -иммунизированных мышей) и инкубируют в течение 1-2 часов при 37°C. Плашки отмывают с помощью PBS/Tween и затем инкубируют с вторичным реагентом (например, для антител человека с Fc-специфичным поликлональным реагентом Ig козы против человека), конъюгированным

с щелочной фосфатазой, в течение 1 часа при 37°C. После отмывки плашки обрабатывают субстратом pNPP (1 мг/мл) и анализируют при OD 405-650. Предпочтительно, для слияний должны использоваться мыши, у которых создаются самые высокие титры.

5 Анализ ELISA, описанный выше, также может использоваться для скрининга гибридом, у которых наблюдается положительная реакционноспособность с иммуногеном $\alpha 5\beta 1$. Гибридомы, которые связываются с $\alpha 5\beta 1$ с высокой авидностью, субклонированы и дополнительно характеризуют. Один клон каждой гибридомы, у которого сохраняется реакционноспособность родительских клеток (с помощью ELISA),
10 может быть отобран для создания банка клеток в объеме 5-10 ампул, хранящихся при -140°C, и для очистки антитела.

Для очистки антител против $\alpha 5\beta 1$ отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты могут быть профильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с
15 помощью белок А-сефарозы (продукция фирмы Pharmacia, Piscataway, N.J.). Чтобы гарантировать чистоту, элюированный IgG может быть проверен с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Буферный раствор может быть заменен на PBS, и концентрация может быть определена по OD280, используя коэффициент гашения 1,43. Моноклональные антитела могут быть разлиты
20 по аликвотам и оставлены на хранение при -80°C.

Дополнительно, эпитоп, связывающийся с антителом, может быть охарактеризован стандартными способами, известными в данной области. К таким способам относятся продукция набора перекрывающихся пептидных фрагментов $\alpha 5$ и/или $\beta 1$ и оценка связывания антитела с большим числом фрагментов. Альтернативно, в пептид $\alpha 5$ и/
25 или $\beta 1$ могут быть введены мутации, например, с помощью аланин-сканирующего мутагенеза, при котором каждая аминокислота замещается аланиновым остатком, и связывание антитела с мутантным пептидом может быть сравнено со связыванием антитела с белком дикого типа, таким образом, идентифицируя сайты, где мутация(и) влияет(ют) на связывание. См., например, статью Cunningham *et al.*, (1989)
30 *Science*244:1081-1085.

Для определения, связываются ли отобранные моноклональные антитела против $\alpha 5\beta 1$ или их антигенсвязывающий участок с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано, используя коммерчески доступные реагенты (продукция фирмы Pierce, Rockford, IL). Могут быть осуществлены сравнительные исследования,
35 используя немеченные моноклональные антитела и биотинилированные моноклональные антитела, с применением планшетов для проведения ELISA, покрытых $\alpha 5\beta 1$, как описано выше. Связывание биотинилированных mAb может быть детектировано с помощью зонда стрептавидин-щелочная фосфатаза.

Для определения изотипа очищенных антител могут быть осуществлены анализы
40 ELISA на определение изотипов, используя реагенты, специфичные для антител определенного изотипа. Например, для определения изотипа моноклонального антитела человека лунки планшетов для микротитрования могут быть покрыты иммуноглобулином против человека в концентрации 1 мкг/мл в течение при 4°C. После блокирования с помощью 1% BSA планшеты приводят в контакт с тестируемыми
45 моноклональными антителами или контролями очищенных изотипов в концентрации 1 мкг/мл или меньше при температуре окружающей среды в течение от одного до двух часов. Лунки затем могут быть приведены в контакт либо с IgG1-, либо с IgM человека-специфичными зондами, конъюгированными с щелочной фосфатазой. Планшеты

обрабатывают и анализируют, как описано выше.

IgG-иммуноглобулины человека против $\alpha 5\beta 1$ могут быть дополнительно протестированы в отношении взаимодействия с антигеном $\alpha 5\beta 1$ с помощью вестерн-блота. Вкратце, интегрин $\alpha 5\beta 1$ может быть получен и подвергнут электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют с помощью 10% фетальной телячьей сыворотки и обрабатывают тестируемыми моноклональными антителами. Связывание IgG человека может быть детектировано, используя IgG против человека, конъюгированный со щелочной фосфатазой, и обработав таблетками субстрата BCIP/NBT (продукция фирмы Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Иммуноконъюгаты

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против $\alpha 5\beta 1$ или его фрагменту, конъюгированному с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты обозначаются в данном документе как «иммуноконъюгаты».

Иммуноконъюгаты, которые включают один или несколько цитотоксинов, обозначаются как «иммунотоксины». К цитотоксину или цитотоксическому агенту относится любой агент, который вреден для клеток (например, уничтожает их). К примерам относятся таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидиумбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пиромидин и их аналоги или гомологи. К терапевтическим агентам также относятся, например, антимеритоболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, меклоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платина (II) (DDP) (цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин).

К другим примерам терапевтических цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим участком по изобретению, относятся дуокармицины, калихемицины, майтансины и ауристатины и их производные. Один из примеров конъюгата антитела с калихемицином коммерчески доступен (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

Цитотоксины могут быть конъюгированы с антителами по изобретению или их антигенсвязывающими участками, используя большое число технологий с применением линкеров. К примерам типов линкеров, которые были использованы для конъюгирования цитотоксина с антителом, относятся, но ими не ограничиваясь, гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Линкер может быть выбран таким образом, чтобы, например, он был чувствителен к расщеплению низкими величинами pH в лизосомальном компартменте или чувствителен к расщеплению протеазами, такими как протеазы, преимущественно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D).

Для дополнительного рассмотрения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических агентов с антителами см. также статьи Saito G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.*

52:328-337; Payne G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan I. and Kreitman R.J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Антитела или их антигенсвязывающие участки по настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с радиоактивным изотопом для получения цитотоксических радиоактивных лекарственных препаратов, также обозначаемых как радиоиммуноконъюгаты. К примерам радиоактивных изотопов, которые могут быть конъюгированы с антителами для диагностического или терапевтического применения, относятся, но ими не ограничиваясь, йод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. Способы получения радиоиммуноконъюгатов известны в данной области. Некоторые радиоиммуноконъюгатов коммерчески доступны, включая ZevalinTM (продукция фирмы IDEC Pharmaceuticals) и ВеххарTM (продукция фирмы Corixa Pharmaceuticals), и для получения радиоиммуноконъюгатов могут быть использованы аналогичные способы, используя антитела по изобретению.

Конъюгаты антител по изобретению могут быть использованы для модификации данного биологического ответа, и фрагмент лекарственного средства не должен быть истолкован как ограниченный классическими химическими терапевтическими агентами. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. К таким белкам могут относиться, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, псевдомонадный экзотоксин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухолей или интерферон γ ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 («IL-1»), интерлейкин-2 («IL-2»), интерлейкин-6 («IL-6»), гранулоцитоарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор («GM-CSF»), гранулоцитоарный колониестимулирующий фактор («G-CSF») или другие факторы роста.

Методики конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителом известны, см., например, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies for Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp.475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp.303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.* "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Биспецифические молекулы

В другом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, содержащим антитело против $\alpha\beta 1$ или его фрагмент по изобретению. Антитело по изобретению или его антигенсвязывающие участки могут образовывать производное или связываться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора) с образованием биспецифической молекулы, которая связывается, по меньшей мере, с двумя различными сайтами связывания или мишенными молекулами. Антитело по изобретению может на самом деле образовывать производное или связываться с более чем одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифических молекул, которые

связываются с более чем двумя различными сайтами связывания и/или мишенными молекулами; такие мультиспецифичные молекулы также охватываются термином «биспецифическая молекула», используемым в данном документе. Для создания биспецифической молекулы по изобретению антитело по изобретению может быть функционально связано (например, с помощью химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, в результате чего получается биспецифическая молекула.

Соответственно, настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, содержащим, по меньшей мере, одну первую специфичность связывания для $\alpha 5\beta 1$ и вторую специфичность связывания для второго мишенного эпитопа. В конкретном аспекте изобретения второй мишенный эпитоп представляет собой Fc-рецептор, например, Fc γ RI человека (CD64) или Fc γ -рецептор (CD89). Таким образом, изобретение относится к биспецифическим молекулам, способным связываться как с Fc γ R или эффекторными клетками, экспрессирующими Fc γ R (например, моноцитами, макрофагами или полиморфноядерными клетками (PMN)), так и с мишенными клетками, экспрессирующими $\alpha 5\beta 1$. Эти биспецифические молекулы нацеливают $\alpha 5\beta 1$ -экспрессирующие клетки на эффекторную клетку и запускают активности эффекторной клетки, опосредованные Fc-рецептором, такие как фагоцитоз $\alpha 5\beta 1$ -экспрессирующих клеток, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), высвобождение цитокинов или выработка супероксид-аниона.

В одном из аспектов изобретения, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифичной, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания помимо специфичности связывания против Fc и специфичности связывания против $\alpha 5\beta 1$. В одном из случаев третья специфичность связывания представляет собой участок против фактора усиления (EF), например, молекулы, которая связывается с поверхностным белком, вовлеченным в цитотоксическую активность, и за счет этого повышает иммунный ответ против мишенной клетки. «Участок против фактора усиления» может представлять собой антитело, функциональный фрагмент антитела или лиганд, который связывается с данной молекулой, например, антигеном или рецептором, и таким образом приводит к усилению влияния детерминант связывания для Fc-рецептора или антигена мишенной клетки. «Участок против фактора усиления» может связываться с Fc-рецептором или антигеном мишенной клетки. Альтернативно, участок против фактора усиления может связываться с объектом, который отличается от объекта, с которым связываются первая и вторая специфичности связывания. Например, участок против фактора усиления может связываться с цитотоксической Т-клеткой (например, через CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1) или другой иммунной клеткой, что приводит к повышенному иммунному ответу против мишенной клетки).

В одном из случаев биспецифические молекулы по изобретению содержат в качестве специфичности связывания, по меньшей мере, одно антитело или фрагмент этого антитела, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легких или тяжелых цепей, или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в патенте США 4946778 авторов Ladner *et al.*

В одном из случаев специфичность связывания Fc γ -рецептора обеспечивается моноклональным антителом, связывание которого не блокируется иммуноглобулином

G человека (IgG). Под используемым в данном документе термином «IgG-рецептор» понимают любой из восьми генов цепи γ , локализованных на хромосоме 1. Эти гены кодируют в целом двенадцать трансмембранных или растворимых изоформ рецептора, которые сгруппированы в три класса Fc γ -рецепторов: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16). В одном из случаев Fc γ -рецептор является высокоаффинным Fc γ RI человека. Fc γ RI человека представляет собой молекулу размером 72 кДа, у которой наблюдается высокое сродство для мономерного IgG (10^8 - 10^9 M $^{-1}$).

Продукция и характеристика некоторых моноклональных антител против Fc γ описаны авторами Fanger *et al.* в РСТ публикации WO 88/00052 и в патенте США 4954617. Эти антитела связываются с эпитопом Fc γ RI, Fc γ RII или Fc γ RIII в сайте, который отличается от Fc γ -связывающего сайта рецептора и таким образом их связывание по существу не блокируется физиологическими уровнями IgG. Специфические антитела против Fc γ RI, используемые по настоящему описанию, представляют собой mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 и mAb 197. Гибридома, продуцирующая mAb 32, доступна из American Type Culture Collection, ATCC под номером доступа HB9469. В других случаях антитело против Fc γ -рецептора представляет собой гуманизованную форму моноклонального антитела 22 (H22). Продукция и характеристика антитела H22 описаны в статье Graziano R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol.* 155 (10):4996-5002 и РСТ публикации WO 94/10332. Клеточную линию, продуцирующую антитело H22, депонировали в American Type Culture Collection под наименованием HA022CL1 и присвоили номер доступа CRL 11177.

В других случаях специфичность связывания Fc-рецептора обеспечивается антителом, которое связывается с IgA-рецептором человека, например, Fc-альфа-рецептором (Fc α RI (CD89)), связывание которого обычно не блокируется иммуноглобулином A человека (IgA). Под термином «IgA-рецептор» понимают генный продукт одного α -гена (Fc α RI), локализованного на хромосоме 19. Известно, что этот ген кодирует несколько альтернативно сплайсируемых трансмембранных изоформ размером от 55 до 110 кДа. Fc α RI (CD89) конститутивно экспрессируется на моноцитах/макрофагах, эозинофилах и нейтрофилах, но не на клеточных популяциях, не являющихся эффекторными. Fc α RI обладает средним сродством ($\approx 5 \times 10^7$ M $^{-1}$) как к IgA1, так и к IgA2, которое возрастает при экспозиции с цитокинами, такими как G-CSF или GM-CSF (Morton H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Было описано четыре Fc α RI-специфичных моноклональных антитела, идентифицируемых как A3, A59, A62 и A77, которые связываются с Fc α RI вне домена, связывающего лиганд IgA (Monteiro R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc α RI и Fc γ RI представляют собой наглядные триггерные рецепторы для применения в биспецифических молекулах по изобретению, поскольку они (1) экспрессируются в основном на иммунных эффекторных клетках, например, моноцитах, клетках PMN, макрофагах и дендритных клетках; (2) экспрессируются в высоких уровнях (например, 5000-100000 на клетку); (3) представляют собой медиаторы цитотоксической активности (например, ADCC, фагоцитоза); (4) опосредуют усиленную антигенную презентацию антигенов, включая сами антигены, мишенные для них.

Несмотря на то, что предпочтительны моноклональные антитела человека, другими антителами, которые могут использоваться в биспецифических молекулах по изобретению, являются мышинные, химерные и гуманизованные моноклональные антитела.

Биспецифические молекулы по настоящему описанию могут быть получены конъюгированием составляющих специфичностей связывания, например, специфичностей

связывания с FcR и с $\alpha 5\beta 1$, используя любые подходящие способы. Например, каждая специфичность связывания биспецифической молекулы может быть получена отдельно и затем конъюгирована одна с другой. Если специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, то для ковалентного конъюгирования может быть
 5 использовано большое число сочетающихся или перекрестно связывающих агентов. К примерам перекрестно связывающих агентов относятся белок А, карбодииимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис (2-нитробензойная кислота) (DTNB), орто-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-
 10 карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, статьи Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). К другим способам относятся способы, описанные в статьях Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83) и Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). К подходящим конъюгирующим агентам относятся SATA и сульфос-SMCC, оба являются
 15 продукцией фирмы Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если специфичности связывания представляют собой антитела, они могут быть конъюгированы посредством сульфгидрильной связи двух тяжелых цепей в области C-концов шарнирных областей. В одном из случаев шарнирную область модифицируют так, что бы она перед конъюгацией содержала нечетное количество сульфгидрильных
 20 остатков, такое как один остаток.

Альтернативно, обе специфичности связывания могут кодироваться в одном и том же векторе и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ можно использовать, в частности, если биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb \times mAb, mAb \times Fab, Fab \times F(ab')₂ или лиганд \times Fab.

Биспецифическая молекула по изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и одну детерминанту связывания, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две детерминанты
 25 связывания. Биспецифические молекулы могут содержать, по меньшей мере, две одноцепочечных молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США 5260203; патенте США 5455030; патенте США 4881175; патенте США 5132405; патенте США 5091513; патенте США 5476786; патенте США
 30 5013653; патенте США 5258498 и патенте США 5482858.

Связывание биспецифических молекул со своими специфическими мишенями может быть подтверждено с помощью, например, фермент-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA), анализа FACS, биоанализа (например, ингибирования роста) или анализа вестерн-блот. В каждом из этих анализов, как правило, детектируется наличие особо интересующих комплексов белок-антитело, используя меченый реагент (например, антитело), специфичное для интересующего
 35 комплекса. Например, комплексы FcR-антитело могут быть детектированы, используя, например, антитело, связанное с ферментом, или фрагмент антитела, который распознает и специфически связывается с комплексами антитело-FcR. Альтернативно, комплексы могут быть детектированы, используя любой другой иммуноанализ. Например, антитело может быть радиоактивно мечено и использовано в радиоиммуноанализе (RIA) (см., например, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on
 40 Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986*). Радиоактивный изотоп может быть детектирован такими способами, как применение γ -счетчика или сцинтилляционного счетчика или авторадиографией.

Фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящее описание относится к композиции, например, фармацевтической композиции, содержащей одно или комбинацию моноклональных антител или их антигенсвязывающего(их) участка(ов) по настоящему изобретению, находящихся в смеси наряду с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (например, два или больше различных) антител, или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул по изобретению. Например, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул), которые связываются с различными эпитопами на мишенном антигене или которые обладают взаимодополняющими активностями.

Фармацевтические композиции по изобретению также могут применяться в комбинированной терапии, например, в сочетании с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать антитело против $\alpha\beta 1$ по настоящему изобретению в сочетании, по меньшей мере, с одним другим противовоспалительным или иммуносупрессивным агентом. Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе о применении антител по изобретению.

Под используемым в данном документе «фармацевтически приемлемым носителем» понимают любой и все растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотоничные и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Как правило, носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, его антигенсвязывающий участок, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом, защищающим соединение от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут находиться в нейтральной форме (включая цвиттерионные формы) или в виде положительно или отрицательно заряженных соединений. В некоторых случаях антитела могут находиться в комплексе с контр-ионом, образуя фармацевтически приемлемую соль. Таким образом, фармацевтические соединения по изобретению могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей.

Под «фармацевтически приемлемой солью» понимают соль, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения (например, антитела) и не оказывает нежелательных токсикологических эффектов (см., например, статью Verge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Например, к термину «фармацевтически приемлемая соль» относится комплекс, содержащий одно или несколько антител и один или несколько контр-ионов, где контр-ионы происходят из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

К примерам таких солей относятся кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. К кислотно-аддитивным солям относятся соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и тому подобное, а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксилкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и тому подобное. К основно-аддитивным солям относятся соли, происходящие из

щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и тому подобное, а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и тому подобное.

5 Более того, к фармацевтически приемлемым неорганическим основаниям относятся ионы металлов. К ионам металлов относятся, но ими не ограничиваясь, соответствующие соли щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов и другие физиологически приемлемые ионы металлов. К солям, происходящим из неорганических оснований, относятся соли алюминия, аммония, кальция, кобальта, никеля, молибдена, ванадия, 10 марганца, хрома, селена, олова, меди, окисного железа, закисного железа, лития, магния, соли марганца трехвалентного, марганца двухвалентного, калия, рубидия, натрия и цинка и в своей обычной валентности.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли антители по настоящему изобретению могут быть получены из следующих кислот, включая без ограничения 15 муравьиную, уксусную, ацетамидобензойную, адипиновую, аскорбиновую, борную, пропионовую, бензойную, камфорную, карбоновую, цикламиновою, дегидрохолиевую, малоновую, этилендиаминтетрауксусную, этилсерную, fendizoic, метафосфорную, янтарную, гликолевую, глюконовую, молочную, яблочную, винную, таниновую, лимонную, азотную, аскорбиновую, глюкуроновую, малеиновую, фолиевую, фумаровую, 20 пропионовую, пировиноградную, аспарагиновую, глутаминовую, бензойную, соляную, бромистоводородную, йодистоводородную, лизин, изолимонную, трифторуксусную, памовую, пропионовую, ортоаминобензойную, мезиловую, оротовую, щавелевую, щавелевоуксусную, олеиновую, стеариновую, салициловую, аминосалициловую, кремниевую, пара-гидроксibenзойную, никотиновую, фенилуксусную, миндальную, 25 эмбоновую, сульфоновую, метансульфоновую, фосфорную, фосфониевую, этансульфоновую, этандисульфоновую, аммоний, бензолсульфоновую, пантотеновую, нафталенсульфоновую, толуолсульфоновую, 2-гидроксиэтансульфоновую, сульфаниловую, серную, азотную, азотистую, монометилловый эфир серной кислоты, циклогексиламиносульфоновую, β-гидроксibuтировую, глицин, глицилглицин, 30 глутаминовую, кокадилат, диаминогексановую, камфорсульфоновую, глюконовую, тиоциановую, оксоглутаровую, пиридоксаль-5-фосфат, хлорфеноксиуксусную, ундекановую, N-ацетил-L-аспарагиновую, муциновую и галактуроновую кислоты.

К фармацевтически приемлемым органическим основаниям относятся триметиламин, диэтиламин, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, дибензиламин, 35 диэтаноламин, этилендиамин, меглюмин (N-метилглюкамин), прокаин, циклические амины, катионы четвертичного аммония, аргинин, бетаин, кофеин, клемизол, 2-этиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, 2-диметиламиноэтанол, этандиамин, бутиламин, этаноламин, этилендиамин, N-этилморфолин, N-этилпиперидин, этилглюкамин, глюкамин, глюкозамин, гистидин, гидрабамин, имидазол, изопропиламин, 40 метилглюкамин, морфолин, пиперазин, пиридин, пиридоксин, неодимий, пиперидин, полиаминовые смолы, прокаин, пурины, теобромин, триэтиламин, трипропиламин, триэтаноламин, трометамин, метиламин, таурин, холат, 6-амино-2-метил-2-гептанол, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол, 2-амино-2-метил-1-пропанол, алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые 45 кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты, стронций, трицин, гидразин, фенилциклогексиламин, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, бис(2-гидроксиэтил)амино-трис(гидроксиметил)метан, N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновая кислота, 1,4-пиперазиндиэтансульфоновая кислота, 3-

морфолино-2-гидроксипропансульфоновая кислота, 1,3-бис[трис (гидроксиметил) метиламино]пропан, 4-морфолинпропансульфоновая кислота, 4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота, 2-[(2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил)амино]этансульфоновая кислота, N,N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота, 4-(N-морфолино)бутансульфоновая кислота, 3-(N,N-бис[2-гидроксиэтил]амино)-2-гидроксипропансульфоновая кислота, 2-гидрокси-3-[трис(гидроксиметил)метиламино]-1-пропансульфоновая кислота, 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-(2-гидроксипропансульфоновая кислота), пиперазин-1,4-бис(2-гидроксипропансульфоновая кислота)дигидрат, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновая кислота, N,N-бис(2-гидроксиэтил)глицин, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновая кислота), N-[трис(гидроксиметил)метил]-3-аминопропансульфоновая кислота, N-трис(гидроксиметил)метил-4-аминобутансульфоновая кислота, N-(1,1-диметил-2-гидроксиэтил)-3-амино-2-гидроксипропансульфоновая кислота, 2-(циклогексиламино)этансульфоновая кислота, 3-(циклогексиламино)-2-гидрокси-1-пропансульфоновая кислота, 3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновая кислота, N-(2-ацетиламино)иминодиуксусная кислота, 4-(циклогексиламино)-1-бутансульфоновая кислота, N-[трис(гидроксиметил)метил]глицин, 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол и трометамол.

Фармацевтическая композиция по изобретению также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. К примерам фармацевтически приемлемых антиоксидантов относятся: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеингидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) хелирующие агенты, связывающие ионы металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

К примерам подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, относятся вода, этанол, многоатомные спирты (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Присущее состояние текучести можно сохранить, например, используя покрывающие материалы, такие как лецитин, поддерживая желаемый размер частиц в случае дисперсий и применяя поверхностно-активные вещества.

Эти композиции также могут содержать наполнители, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предохранение от микроорганизмов может быть обеспечено как с помощью процедур стерилизации, *выше*, так и путем включения большого числа антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобного. В композиции также может быть желательно включить изотоничные агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, длительная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обусловлена включением агентов, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

К фармацевтически приемлемым носителям относятся стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо принятые среды или агент несовместимы с активным соединением,

предполагается применение их в фармацевтических композициях по изобретению. В композиции также могут быть введены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и устойчивыми в условиях производства и хранения. Композиция может находиться в смеси в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для создания высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Собственная текучесть может быть сохранена, например, используя покрытие, такое как лецитин, сохраняя желаемый размер частиц в случае дисперсии и применяя поверхностно-активные вещества. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотоничные агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннитол, сорбитол или хлорид натрия. Длительная абсорбция инъеклируемых композиций может быть обусловлена включением в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеаратов и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены введением активного соединения в желательном количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией желательных ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. В целом, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и желательные другие ингредиенты, перечисленные выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, к способам получения относятся, но ими не ограничиваясь, высушивание вакуумом и сушка с замораживанием (лиофилизация), которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из их раствора, заранее простерилизованного фильтрацией.

Количество активного ингредиента, которое может быть скомбинировано с материалом носителя для продукции единичной лекарственной формы, будет изменяться в зависимости от индивидуума, получающего лечение, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть скомбинировано с материалом носителя для продукции единичной лекарственной формы, будет в целом составлять то количество композиции, которое создает терапевтический эффект. В целом, из ста процентов это количество будет находиться в диапазоне от около 0,01 процента до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 0,1 процента до около 70 процентов, самое предпочтительное от около 1 процента до около 30 процентов активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы приема доводят для получения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введена единственная таблетка, может быть введено несколько дробных доз в течение периода времени или доза может быть пропорционально снижена или увеличена, как укажет тяжесть терапевтической ситуации. Для легкости введения и однотипности дозы особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме. Под стандартной лекарственной формой, используемой в настоящем описании, понимают физически дискретные единицы, подходящие в качестве однократных доз для индивидуумов, получающих лечение; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для продукции желаемого

терапевтического эффекта в ассоциации с желаемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм по изобретению определяется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического эффекта и (b) ограничений, существующих в данной области приготовления соединений, таких как активное соединение для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела доза находится в диапазоне от около 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или находиться в диапазоне от 1 до 10 мг/кг. Характерная схема приема включает введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз каждые от трех до 6 месяцев. Схемы приема антитела против $\alpha\beta 1$ или его антигенсвязывающего участка по изобретению включают, например, 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела путем внутривенного введения, причем антитело получают, используя одну из следующих схем приема: (i) шесть доз один раз в четыре недели, затем раз в три месяца; (ii) раз в три недели; (iii) однократно 3 мг/кг массы тела, после чего 1 мг/кг массы тела раз в три недели.

В некоторых способах два или несколько моноклональных антител с различными специфичностями связывания вводятся одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела снижается в указанных диапазонах. Антитело обычно вводят большое число раз. Интервалы между единичными дозами могут составлять, например, раз в неделю, раз в месяц, раз в три месяца или раз в год. Интервалы также могут быть нерегулярными, указываемыми измерением в крови уровней антитела для мишенного антигена у пациента. В некоторых способах дозу доводят до достижения концентрации антитела в плазме от около 1 до 1000 мкг/мл и в некоторых способах от около 25 до 300 мкг/мл.

Альтернативно, антитело может быть введено в виде препаративной формы длительного высвобождения, в этом случае требуется меньшая частота введения. Доза и частота варьируют в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. В целом, у антител человека наблюдается самый длинный период полувыведения, далее следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, отличные от человеческих. Доза и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводится относительно низкая доза с относительно длительными интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение на протяжении всей жизни. При терапевтическом применении иногда требуется относительно высокая доза при относительно коротких промежутках до снижения или прекращения прогрессирования заболевания, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не будет наблюдаться частичного или полного смягчения симптомов заболевания. После чего пациент может получать профилактическую схему.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему описанию могут варьировать таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, композиции и пути введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от большого числа фармакокинетических факторов, включающих активность используемых конкретных композиций по настоящему описанию или их сложного

эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующий анамнез пациента, получающего лечение, и подобные факторы, хорошо известные в данных областях медицины.

«Терапевтически эффективная доза» антитела против $\alpha 5\beta 1$ по изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов с отсутствием симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или нарушения вследствие тяжести заболевания. Например, при лечении $\alpha 5\beta 1$ -положительных опухолей «терапевтически эффективная доза» предпочтительно ингибирует клеточный рост или рост опухоли, по меньшей мере, на около 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, на около 40%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на около 60% и самое предпочтительное, по меньшей мере, на около 80% относительно индивидуумов, не получавших лечение. Способность соединения ингибировать опухолевый рост может быть оценена на модельной системе на животных, предсказывающей эффективность для опухолей человека. Альтернативно, это свойство композиции может быть оценено по способности соединения ингибировать, такое ингибирование *in vitro* может быть оценено посредством анализов, известных специалистам-практикам. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухоли или иным образом облегчать симптомы у индивидуума. Специалист в данной области смог бы определить такие количества на основании таких факторов как величина индивидуума, тяжесть симптомов, наблюдаемых у индивидуума, и выбранные конкретная композиция или способ введения.

Композиция по настоящему описанию может быть введена одним или несколькими путями введения, используя один или несколько из большого числа способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будут меняться в зависимости от желаемых результатов. К путям введения антител или их антигенсвязывающих участков по изобретению относятся внутривенный, внутримышечный, внутридермальный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Под фразой «парентеральное введение», используемой в данном документе, понимают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и к ним относятся без ограничения внутривенная, внутримышечная, внутриартериальная, внутриоболочечная, внутрикапсулярная, интраорбитальная, внутрисердечная, внутридермальная, внутрибрюшинная, транстрахеальная, подкожная, субкутикулярная, внутрисуставная, субкапсулярная, субарахноидальная, внутриспинальная, эпидуральная и надчревная инъекция и инфузия.

Альтернативно, антитело или его антигенсвязывающий участок по изобретению может быть введено путем, отличным от парентерального, таким как местный, эпидермальный путь введения или путь введения через слизистую оболочку, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такими как препаративная форма с контролируемым высвобождением, включающая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат,

полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры, полимолочная кислота. Многие способы получения таких препаративных форм запатентованы или в основном известны специалистам в данной области. См., например, *Sustained and Controlled release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, терапевтическая композиция по изобретению может быть введена с помощью безигольного устройства для гиподермальной инъекции, такого как устройства, описанные в патентах США 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. К примерам хорошо известных имплантов и модулей по настоящему описанию относятся: патент США 4487603, в котором описывается имплантируемая микроинфузионная помпа для введения лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США 4486194, в котором описывается терапевтическое устройство для введения лекарственных препаратов через кожу; патент США 4447233, в котором описывается инфузионная помпа для доставки лекарственного препарата с точной скоростью инфузии; патент США 4447224, в котором описывается имплантируемый аппарат для инфузии с изменяемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США 4439196, в котором описывается осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отделы; и патент США 4475196, в котором описывается осмотическая система доставки лекарственного средства. Специалистам в данной области известны и многие другие такие импланты, системы доставки и модули.

В некотором случае моноклональные антитела человека или их антигенсвязывающие участки по изобретению могут быть смешаны для достижения подходящего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Для прохождения терапевтических соединений по изобретению через BBB (при необходимости) они могут быть смешаны, например, в липосомах. В отношении способов производства липосом, см., например, патенты США 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно транспортируются в специфические клетки или органы, таким образом усиливая доставку нацеленного лекарственного средства (см., например, статью V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). К типичным нацеленным фрагментам относятся фолат или биотин (см., например, патент США 5416016 авторов Low *et al.*); маннозиды (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор сурфактантного белка А (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); также см. K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Применение и способы по изобретению

Антитела, в частности антитела человека, композиции антител и способы по настоящему описанию имеют большое число *in vitro* и *in vivo* диагностических и терапевтических применений, включая диагностику и лечение $\alpha 5\beta 1$ -опосредованных расстройств. Например, эти молекулы могут быть введены в клетки в культуре *in vitro* или *ex vivo*, или человеку, например, *in vivo*, для лечения, профилактики и диагностики большого числа заболеваний. Под используемым в данном документе термином «индивидуум» понимают человека и животных. К животным относятся все позвоночные, например, млекопитающие и животные, отличные от млекопитающих, такие как приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, курицы, земноводные и рептилии. К

предпочтительным индивидуумам относятся люди, имеющие расстройства, опосредованные активностью $\alpha 5\beta 1$. Способы особенно подходят для лечения людей, страдающих расстройством, ассоциированным с аномальной экспрессией $\alpha 5\beta 1$. При введении антител против $\alpha 5\beta 1$ наряду с другим агентом они могут быть введены в

любом порядке или одновременно.

Принимая во внимание специфическое связывание антител по изобретению с $\alpha 5\beta 1$, антитела по изобретению могут быть использованы для специфического определения экспрессии $\alpha 5\beta 1$ на поверхности клеток и, более того, могут быть использованы для очистки $\alpha 5\beta 1$ путем иммуноаффинной очистки.

Более того, принимая во внимание экспрессию $\alpha 5\beta 1$ на большом числе опухолевых клеток (см., например, пример 6, фиг.7) и его вовлеченность в ангиогенез, антитела человека, композиции антител и способы по настоящему описанию могут быть использованы для лечения индивидуума с аномальным клеточным ростом, например, страдающего расстройством, отличающимся наличием опухолевых клеток, экспрессирующих $\alpha 5\beta 1$, включая, например, мезотелиому, рак гепатобилиарной системы (печени и желчевыводящих путей), первичную или вторичную опухоль ЦНС, первичную или вторичную опухоль мозга, рак легких (NSCLC и SCLC), рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, меланому кожи или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, анальный рак, рак желудка, рак органов желудочно-кишечного тракта (желудка, колоректальный и 12 перстной кишки), рак молочных желез, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному цервикального канала, карциному вагины, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак простаты, рак яичка, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, адренокортикальный рак, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангиокарциному, фибросаркому, нейробластому, ретинобластому или сочетание одной или нескольких вышеуказанных злокачественных опухолей.

В одном из случаев антитела (например, моноклональные антитела человека, мультиспецифические и биспецифические молекулы и композиции) или их антигенсвязывающие участки по изобретению могут быть использованы для детекции уровней $\alpha 5\beta 1$ или уровней клеток, которые содержат $\alpha 5\beta 1$ на своей мембранной поверхности, причем эти уровни затем могут быть связаны с некоторыми симптомами заболевания. Альтернативно, антитела могут быть использованы для ингибирования или блокирования функции $\alpha 5\beta 1$, что, в свою очередь, может быть связано с предотвращением или смягчением некоторых симптомов заболевания, таким образом, принимая $\alpha 5\beta 1$ в качестве медиатора заболевания. Этого можно достичь приведением образца и контрольного образца в контакт с антителом против $\alpha 5\beta 1$ в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом и $\alpha 5\beta 1$. Любые комплексы, образованные между антителом и $\alpha 5\beta 1$, детектируют и сравнивают в образце и контроле.

В другом случае антитела (например, антитела человека, мультиспецифические и биспецифические молекулы и композиции) или их антигенсвязывающие участки по изобретению могут быть изначально протестированы в отношении связывающей

активности, ассоциированной с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, композиции по изобретению могут быть протестированы, используя анализы проточной цитометрии, описанные в примерах ниже.

Антитела (например, антитела человека, мультиспецифические и биспецифические молекулы, иммуноконъюгаты и композиции) или их антигенсвязывающие участки по изобретению дополнительно используют в лечении и диагностике заболеваний, связанных с $\alpha 5\beta 1$. Например, моноклональные антитела человека, мультиспецифические или биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты могут быть использованы для выявления *in vivo* или *in vitro* одной или нескольких из следующих биологических активностей: ингибирование роста и/или уничтожение клетки, экспрессирующей $\alpha 5\beta 1$; опосредование фагоцитоза или ADCC клетки, экспрессирующей $\alpha 5\beta 1$, при наличии эффекторных клеток человека, или блокирование связывания лиганда $\alpha 5\beta 1$ с $\alpha 5\beta 1$.

В конкретном случае антитела (например, антитела человека, мультиспецифические и биспецифические молекулы и композиции) или их антигенсвязывающие участки используют *in vivo* для лечения, профилактики или диагностики большого числа заболеваний, связанных с $\alpha 5\beta 1$. К примерам заболеваний, связанных с $\alpha 5\beta 1$, относятся в числе прочих аномальный клеточный рост, такой как рак. В одном из вариантов осуществления аномальный клеточный рост представляет собой рак, включая, но ими не ограничиваясь, мезотелиому, рак гепатобилиарной системы (печени и желчевыводящих путей), первичную или вторичную опухоль ЦНС, первичную или вторичную опухоль мозга, рак легких (NSCLC и SCLC), рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, меланому кожи или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, анальный рак, рак желудка, рак органов желудочно-кишечного тракта (желудка, колоректальный и 12 перстной кишки), рак молочных желез, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному цервикального канала, карциному вагины, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак простаты, рак яичка, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, аденокортикальный рак, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангиокарциному, фибросаркому, нейробластому, ретинобластому или сочетание одной или нескольких вышеуказанных злокачественных опухолей.

Подходящие пути введения композиций антител (например, моноклональных антител человека, мультиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов) или их антигенсвязывающих участков по изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и могут быть выбраны специалистом в данной области. Например, композиции антител могут быть введены с помощью инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы используемых молекул будут зависеть от возраста и веса индивидуума и концентрации и/или состава композиции антител.

Ранее описанные антитела человека против $\alpha 5\beta 1$ или их антигенсвязывающие участки по изобретению могут быть введены совместно с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, например, цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммуносупрессивным агентом. Антитело может быть связано с агентом

(в виде иммунокомплекса) или может быть введено отдельно от агента. В последнем случае (раздельное введение) антитело может быть введено до, после или одновременно с агентом или может быть введено совместно с другими известными способами лечения, например, противоракового лечения, например, облучением. К таким терапевтическим агентам относятся среди прочих антинеопластические агенты, такие как доксорубицин (адриамицин), цисплатин, сульфат блеомицина, кармустин, хлорамбуцил и циклофосфамид гидроксимочевина, которые сами по себе эффективны лишь при уровнях, токсичных или субтоксичных для пациента. Цисплатин может быть введен внутривенно по 100 мг/доза раз в четыре недели, и адриамицин вводят внутривенно по 60-75 мг/мл дозы один раз в 21 день. Сочетанное введение антител человека против $\alpha 5\beta 1$ или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с химиотерапевтическими агентами предоставляет два противораковых агента, которые влияют через различные механизмы, что приводит к цитотоксическому эффекту для опухолевых клеток человека. Такое сочетанное введение может решить проблемы, вызванные развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что сделало бы их невосприимчивыми к антителу.

Мишень-специфичные эффекторные клетки, например, эффекторные клетки, связанные с композициями (например, антителами человека, мультиспецифическими и биспецифическими молекулы), по изобретению также могут быть использованы в качестве терапевтических агентов. Эффекторные клетки для нацеливания могут представлять собой лейкоциты человека, такие как макрофаги, нейтрофилы или моноциты. К другим клеткам относятся эозинофилы, естественные клетки-киллеры и другие клетки, несущие рецепторы IgG или IgA. При необходимости эффекторные клетки могут быть получены от индивидуума, получающего лечение. Мишень-специфичные эффекторные клетки могут быть введены в виде суспензии клеток в физиологически приемлемом растворе. Количество вводимых клеток может составлять порядка от 10^8 до 10^9 , но будет меняться в зависимости от лечебной цели. В целом, количество должно быть достаточным для достижения локализации на мишенной клетке, например, опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha 5\beta 1$, и для эффекта уничтожения клетки посредством, например, фагоцитоза. Пути введения также могут варьировать.

Лечение с помощью мишень-специфичных эффекторных клеток может быть осуществлено наряду с другими техниками удаления мишеневых клеток. Например, противоопухолевая терапия с применением композиций (например, антител человека, мультиспецифических и биспецифических молекул) по изобретению и/или эффекторных клеток, усиленных этими композициями, может быть использована наряду с химиотерапией. Кроме того, комбинированная иммунотерапия может быть использована для направления двух различных популяций цитотоксических эффекторных клеток на отторжение опухолевых клеток. Например, антитела против $\alpha 5\beta 1$, связанные с рецептором анти-Fc-гамма RI или анти-CD3, могут быть использованы наряду с агентами, специфически связывающимися с рецептором IgG или IgA.

Биспецифические и мультиспецифические молекулы по изобретению также могут быть использованы для модуляции Fc γ R или уровней Fc γ R на эффекторных клетках, такой как кэппинг и устранение рецепторов на поверхности клетки. Для этой цели также могут быть использованы смеси анти-Fc-рецепторов.

При наличии комплемента также могут быть использованы композиции (например, антитела человека, гуманизированные или химерные антитела, мультиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по изобретению, которые имеют

сайты связывания комплемента, такие как участки из IgG1, -2 или -3, или IgM, которые связывают комплемент. В одном из случаев обработка *ex vivo* популяции клеток, содержащих мишенные клетки, с помощью связывающего агента по изобретению и подходящих эффекторных клеток может быть дополнена добавлением комплемента или сыворотки, содержащей комплемент. Фагоцитоз мишенных клеток, покрытых связывающим агентом по изобретению, может быть улучшен за счет связывания белков комплемента. В другом случае мишенные клетки, покрытые композициями (например, антителами человека, мультиспецифическими и биспецифическими молекулами) по изобретению также могут быть лизированы с помощью комплемента. В еще одном случае композиции по изобретению не активируют комплемент.

Композиции (например, антитела человека, гуманизированные или химерные антитела, мультиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по изобретению также могут быть введены наравне с комплементом. Соответственно, изобретение охватывает композиции, содержащие антитела человека, мультиспецифические или биспецифические молекулы и сыворотку или комплемент. Эти композиции обладают преимуществом, поскольку комплемент находится в непосредственной близости к антителам человека, мультиспецифическим или биспецифическим молекулам. Альтернативно, антитела человека, мультиспецифические или биспецифические молекулы по изобретению и комплемент или сыворотка могут быть введены раздельно.

Также настоящее изобретение охватывает наборы, содержащие композиции антител по изобретению (например, антител человека, биспецифических или мультиспецифических молекул или иммуноконъюгатов) и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать один или несколько дополнительных реагентов, таких как иммуносупрессивный реагент, цитотоксический агент или радиотоксический агент, или одно или несколько дополнительных антител человека или их антигенсвязывающих участков по изобретению (например, антитело человека, обладающее добавочной активностью, которое связывается с эпитопом на антигене $\alpha\beta 1$, отличным от эпитопа, распознаваемого первым антителом человека).

Соответственно, пациентам, получающим композиции антител по изобретению, может быть дополнительно введен (до, одновременно или после введения антитела человека по изобретению) другой терапевтический агент, такой как цитотоксический или радиотоксический агент, который усиливает или дополняет терапевтический эффект антител человека.

В других случаях индивидуум может дополнительно получать агент, который модулирует, например, усиливает или ингибирует, экспрессию или активность Fc γ или Fc γ -рецепторов, посредством, например, лечения индивидуума с помощью цитокина. К цитокинам для введения в процессе лечения мультиспецифичной молекулой относятся гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон γ (IFN γ) и фактор некроза опухолей (TNF).

Композиции (например, антитела человека, мультиспецифические и биспецифические молекулы) по изобретению также могут быть использованы для нацеливания клеток, экспрессирующих Fc γ R или $\alpha\beta 1$, например, для мечения таких клеток. Для такого применения связывающий агент может быть связан с молекулой, которая может быть детектирована. Таким образом, изобретение относится к способам локализации *ex vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, такие как Fc γ или $\alpha\beta 1$. Детектируемая метка может представлять собой, например, радиоизотоп,

флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента.

В конкретном случае изобретение относится к способам детекции наличия антигена $\alpha 5\beta 1$ в образце или измерения количества антигена $\alpha 5\beta 1$, включающим приведение в контакт образца и контрольного образца с моноклональным антителом человека или его антигенсвязывающим участком, который специфически связывается с $\alpha 5\beta 1$, в условиях, которые позволяют образовать комплекс между антителом или его частью и $\alpha 5\beta 1$. Образование комплекса затем детектируют, причем образование различных комплексов между сравниваемым образцом и контрольным образцом указывает на наличие антигена $\alpha 5\beta 1$ в образце.

В других случаях изобретение относится к способам лечения $\alpha 5\beta 1$ -опосредованного расстройства у индивидуума, например, аномального клеточного роста, такого как рак, путем введения индивидууму антител человека или их антигенсвязывающих участков, описанных выше. Такие антитела и их производные используются для ингибирования $\alpha 5\beta 1$ -индуцированных активностей, ассоциированных с некоторыми расстройствами, например, ангиогенеза, пролиферации и дифференциации. При контакте антитела с $\alpha 5\beta 1$ (например, путем введения антитела индивидууму) способность $\alpha 5\beta 1$ индуцировать такие активности ингибируется и, таким образом, лечение ассоциированного расстройства оказывается эффективным. Композиция антитела может быть введена самостоятельно или вместе с другим терапевтическим агентом, таким как цитотоксический или радиотоксический агент, который действует наравне или синергично с композицией антитела для лечения или профилактики $\alpha 5\beta 1$ -опосредованного заболевания.

В еще одном случае иммуноконъюгаты по изобретению могут быть использованы для нацеливания соединений (например, терапевтических агентов, меток, цитотоксинов, радиотоксинов, иммуносупрессантов и т.д.) на клетки, которые имеют рецепторы клеточной поверхности $\alpha 5\beta 1$, путем связывания таких соединений с антителом. Таким образом, изобретение также относится к способам локализации *ex vivo* или *in vivo* клеток, экспрессирующих $\alpha 5\beta 1$ (например, с помощью детектируемой метки, такой как радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента).

Альтернативно, иммуноконъюгаты могут быть использованы для уничтожения клеток, которые имеют рецепторы клеточной поверхности $\alpha 5\beta 1$, путем нацеливания цитотоксинов или радиотоксинов на $\alpha 5\beta 1$.

Настоящее описание дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны быть истолкованы, как ограничивающие. Содержание всех фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных на протяжении этого описания, прямо приводится в данном документе в качестве ссылок в полном объеме.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Получение гибридомы, продуцирующей антитело против $\alpha 5\beta 1$

Наглядные антитела по изобретению получали, отбирали и анализировали следующим образом:

Иммунизация и создание гибридомы:

Для получения гибридомы использовались следующие иммуногены: очищенный рекомбинантный белок интегрин $\alpha 5$ -Fc человека; интегрин $\alpha 5$ -His (продукция фирмы R&D Systems, на заказ); клетки NIH3T3, трансфицированные для экспрессии $\alpha 5$ человека; клеточная линия Jurkat, клеточная линия U-937 (ATCC Cat № CRL-1593) и клеточная линия K-562 (ATCC Cat № CCL-243), которые в естественных условиях экспрессируют

интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека.

Очищенный рекомбинантный белок интегрин $\alpha 5$ -Fc человека представляет собой химерную конструкцию внеклеточного домена интегрин $\alpha 5$ человека (аминокислоты 42-995), слитого с Fc-доменом крысы, которую клонировали в вектор pSecTag2 и экспрессировали, используя систему 293-FreeStyle (продукция фирмы Invitrogen). Клетки НИЗТЗ, трансфицированные для экспрессии $\alpha 5$ человека, продуцировали согласно следующему. кДНК полноразмерного интегрин $\alpha 5$ человека (продукция фирмы Invitrogen, Cat. № FL1002, клон ID:3629647) клонировали из клона MGC полноразмерного интегрин $\alpha 5$ человека (Invitrogen) и субклонировали в ретровирусный экспрессирующий вектор (pVabe). Вирусные частицы получали и использовали для заражения клеток НИЗТЗ (ATCC Cat. CRL-1658). Для отбора положительных стабильных клонов клеток добавляли пиромидин. Для отбора стабильных клонов клеток с высоким уровнем экспрессии осуществляли анализы экспрессии белка человека $\alpha 5$ вестерн-блот и FACS.

Полностью человеческие моноклональные антитела против интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека получали, используя штамм трансгенных по Ig человека мышей Hco7/Hco12, а также штамм трансхромосомных/трансгенных по генам человека мышей KM (продукция фирмы Medarex, Inc). Все эти штаммы экспрессируют полностью человеческие антитела, которые неотличимы от антител, выделенных от людей. В этих штаммах мышей эндогенный ген легкой каппа цепи мыши был разрушен гомозиготным образом, как описано в статье Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820, и эндогенный ген тяжелой цепи мыши был разрушен гомозиготным образом, как описано в примере 1 РСТ публикации WO 01/09187. Каждый из этих штаммов мышей несет трансген легкой каппа цепи человека KCo5, описанный в статье Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. Штамм HCo7 несет трансген тяжелой цепи человека HCo7, описанный в патентах США 5545806, 5625825 и 5545807. Штамм HCo12 несет трансген тяжелой цепи человека HCo12, описанный в примере 2 РСТ публикации WO 01/09187. Штамм HCo7/HCo12 несет оба трансгена тяжелой цепи HCo7 и HCo12. Штамм KM несет минихромосому человека, описанную в статье Ishida et al., (2002), Cloning and Stem Cells, 4:91-102.

Для получения полностью человеческих моноклональных антител против $\alpha 5\beta 1$ мышей NuMab штаммов HCo7/HCo12 и KM иммунизировали рекомбинантным белком интегрин $\alpha 5$ -Fc человека или интегрин $\alpha 5$ -His, клетками НИЗТЗ, трансфицированными для экспрессии $\alpha 5$ человека и клеточной линией Jurkat, клеточной линией U-937 и клеточной линией K-562, которые в естественных условиях экспрессируют $\alpha 5\beta 1$ человека. Общие схемы иммунизации мышей NuMab описываются в статьях Lonberg N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 и РСТ публикации WO 98/24884. При первой инфузии антигена брались мыши в возрасте 6-16 недель. Для внутрибрюшинной (IP) и подкожной (Sc) иммунизации мышей NuMab использовали очищенный рекомбинантный препарат антигена интегрин $\alpha 5$ -Fc человека или интегрин $\alpha 5$ -his (в количестве 15-20 мкг), препарат трансфицированных клеток НИЗТЗ или клеток Jurkat, клеток U-937 и клеток K-562 (1×10^7 клеток).

Трансгенных мышей иммунизировали антигеном в адьюванте Ribi внутрибрюшинно и подкожно с интервалами 1-4 недели (всего до 16 иммунизаций). Иммунный ответ наблюдали в крови, взятой посредством ретроорбитальных кровопусканий. Сыворотку скринировали посредством анализа FACS (описанного ниже), и мышей с достаточными титрами иммуноглобулина человека против $\alpha 5\beta 1$ использовали для слияний. Мышей стимулировали внутривенным введением антигена за 3 и 2 дня до забоя и извлечения селезенки и/или лимфатических узлов. Как правило, для каждого антигена осуществляли 10-20 слияний. Всего иммунизировали 60 мышей HCo7/HCo12 и KM. Каждым антигеном

иммунизировали несколько дюжин мышей.

Отбор мышей NuMab, продуцирующих антитела против $\alpha 5\beta 1$:

Для отбора мышей NuMab, продуцирующих антитела, которые связываются с $\alpha 5\beta$, сыворотку иммунизированных мышей скринировали посредством проточной цитометрии (FACS) в отношении связывания с клеточной линией, экспрессирующей полноразмерный интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека, и не связывания с контрольной клеточной линией, не экспрессирующей $\alpha 5\beta 1$. Вкратце, клетки NIH3T3, экспрессирующие $\alpha 5$, инкубировали с сывороткой иммунизированных мышей, разбавленной 1:20. Клетки отмывали, и специфическое связывание антитела детектировали с помощью Ab против IgG человека, меченого FITC. Анализы проточной цитометрии осуществляли на приборе проточном цитометре FACS (продукция фирмы Becton Dickinson, San Jose, CA). Мышей, у которых вырабатывались самые высокие титры антител против $\alpha 5\beta 1$, использовали для слияний. Слияния осуществляли, как описано ниже, и гибридомные супернатанты тестировали с помощью FACS в отношении активности против $\alpha 5\beta 1$.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека против $\alpha 5\beta 1$:

Спленоциты и/или лимфоциты из лимфатических узлов мыши, выделенные от мышей NuMab, сливали, используя электрослияние (E-слияние, технология Cyto Pulse™, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), с миеломной клеточной линией мышей Sp2/0 (ATCC, CRL-1581, Manassas, VA), используя протоколы, рекомендованные производителем. Вкратце, суспензии одиночных клеток лимфоцитов селезенки и/или лимфатических узлов иммунизированных мышей сливали с эквивалентным количеством несеكريрующих клеток миеломы мышей Sp2/0, используя E-слияние. Клетки помещали в плоскодонные планшеты для микротитрования в количестве примерно 2×10^4 спленоцитов/луночка и инкубировали в течение от 10 до 14 дней в селективной среде, содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку, 10% кондиционированную клетками P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63) среду, от 3 до 5% (IGEN) в среде DMEM (продукция фирмы Mediatech, Herndon, VA, Cat. № CRL 10013) при высоком содержании глюкозы, L-глутамина и пирувата натрия), 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мг/мл гентамицин и 1-кратный НАТ (продукция фирмы Sigma, Cat. № CRL -P-7185). Через 1-2 недели клетки культивировали в среде, в которой НАТ заменяли на НТ. Примерно через 10-14 дней после помещения клеток супернатанты из отдельных лунок скринировали вначале в отношении содержания в них антител с гамма, каппа-цепями человека. Супернатанты, которые отмечались как позитивные в отношении антител с гамма- каппа-цепями человека, затем последовательно скринировали посредством FACS (описанного выше) в отношении антител человека против $\alpha 5\beta 1$.

Моноклональные антитела IgG:

Гибридомы, секретирующие антитела, переносили в 24-луночные планшеты, вновь скринировали и при подтверждении позитивности в отношении IgG-моноклональных антител человека против $\alpha 5\beta 1$ субклонировали, по меньшей мере, дважды путем предельного разведения. Устойчивые субклоны затем культивировали *in vitro* для получения небольших количеств антитела в тканевой культуральной среде с целью дополнительной характеристики. Процедуры, описанные выше, использовали для продукции нескольких моноклональных антител против $\alpha 5\beta 1$, включая антитела, обозначенные как «22B5», «24C7», «1D9» и «2D2», которые описаны в данном документе.

Пример 2

Структурная характеристика моноклонального антитела человека 22B5

Последовательности кДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела 22B5, получали из гибридомы 22B5, используя стандартные техники ПЦР, и секвенировали, используя стандартные техники секвенирования ДНК.

5 Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области тяжелой цепи антитела 22B5 показаны на фиг.1А и 1В и в SEQ ID NO:11 и 7 соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области легкой цепи антитела 22B5 показаны на фиг.1С и 1D и в SEQ ID NO:12 и 8 соответственно.

Исходная молекула 22B5 относилась к подклассу IgG4. Подкласс IgG переключали на IgG1 для обеспечения связывания с FcγR и эффекторных функций, таких как ADCC. Для дополнительного повышения связывания с рецепторами FcγR и активности эффекторных функций в константную область IgG1 вводили три мутации (S247D, A338L и I340E) посредством сайт-специфичного мутагенеза. Антитело 22B5 с подклассом IgG1 и содержанием этих трех мутаций обозначают как «22B5/DLE» или «22B5 IgG1 DLE».

15 Две мутации переменной домены тяжелой цепи возвращали к зародышевой линии для минимизации иммуногенности (I30S и N33S). В переменной последовательности легкой цепи мутаций обнаружено не было. Тяжелая цепь 22B5/DLE представлена в виде SEQ ID NO:9, тогда как легкая цепь 22B5/DLE представлена в виде SEQ ID NO:10.

Сравнение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина 22B5 с известными последовательностями тяжелых цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в тяжелой цепи антитела 22B5 используется сегмент V_H из гена V_H 4-39 зародышевой линии человека, сегмент D из гена 3-10 зародышевой линии человека и сегмент J_H из гена J_H 6b зародышевой линии человека. Выравнивание последовательности V_H антитела 22B5 с последовательностью V_H 4-39 зародышевой

25 линии представлено на фиг.2. Дополнительный анализ последовательности V_H антитела 22B5, используя систему Kabat определения области CDR, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленному на фиг.1В и в SEQ ID NO:1, 2 и 3 соответственно.

Сравнение последовательности легкой цепи иммуноглобулина 22B5 с известными последовательностями легких цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в легкой цепи антитела 22B5 используется сегмент V_L из гена VK L6 зародышевой линии человека и сегмент JK из гена JK 4 зародышевой линии человека. Выравнивание последовательности V_L антитела 22B5 с последовательностью VK L6 зародышевой

35 линии представлено на фиг.2. Дополнительный анализ последовательности V_L антитела 22B5, используя систему Kabat определения области CDR, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленному на фиг.1D и в последовательностях SEQ ID NO:4, 5 и 6 соответственно.

Пример 3

40 Характеристика специфичности связывания и кинетический анализ связывания моноклонального антитела человека 22B5

В этом примере средство связывания и кинетический анализ связывания антитела человека против α5β1 22B5 с мутациями IgG1 DLE (22B5/DLE) оценивали посредством анализа Biacore. Также специфичность связывания оценивали с помощью проточной цитометрии (FACS).

45

Средство связывания и кинетический анализ связывания

Кинетический анализ связывания и номинальную avidность антитела 22B5/DLE к внеклеточному домену интегрина α5β1 определяли, используя анализ Biacore (Biacore

AB, Uppsala, Sweden). Для осуществления кинетических анализов VІАcore антитело 22B5/DLE иммобилизовали на биосенсорном чипе, и большое число концентраций внеклеточного домена рекомбинантного $\alpha 5\beta 1$ человека пропускали через поверхность при 25,0°C (см. фиг.3). Данные по связыванию подвели в целом под модель связывания одного-к-одному образца с дрейфующим исходным уровнем. 22B5/DLE обратимо связывается с $\alpha 5\beta 1$. Константа связывания (K_D) для внеклеточного домена рекомбинантного $\alpha 5\beta 1$ человека находилась в диапазоне от 2,7 до 4,1 нМ. K_D оказалась выше при измерении в отсутствие двухвалентных катионов, согласуясь с катион-зависимой активацией интегрин. Кинетические параметры связывания находились в диапазоне от $3,4 \times 10^{-5}$ до $4,5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ для скорости прямой реакции и от $1,2 \times 10^{-3}$ до $1,4 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ для скорости обратной реакции (см. фиг.3 и таблицу 1).

Для измерения номинальной avidности внеклеточный домен рекомбинантного $\alpha 5\beta 1$ человека иммобилизовали на биосенсорном чипе, и большое число концентраций 22B5/DLE пропускали через поверхность при 25,0°C. Величина номинальной avidности составляла 0,05 пМ в 20 мМ HEPES, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 0,005% P20 с 4,0 мМ MgCl₂.

Таблица 1

Итоговые данные по связыванию и кинетическому анализу, полученные на основании исследований VІАcore

Сродство 22B5/DLE к $\alpha 5\beta 1$ (Biacore)	
K_D (CaCl ₂)	2,7 нМ
K_D (MgCl ₂)	4,1 нМ
Скорость прямой реакции (k_{on}) (CaCl ₂)	$4,5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Скорость прямой реакции (k_{on}) (MgCl ₂)	$3,4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Скорость прямой реакции (k_{on}) (CaCl ₂)	$1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Скорость прямой реакции (k_{on}) (MgCl ₂)	$1,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Авидность 22B5/DLE к $\alpha 5\beta 1$ (K_D , Biacore)	0,05 пМ
Под CaCl ₂ понимают буфер, содержащий 10 мМ HEPES, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 0,005% P20 с 0,1575 дюймы CaCl ₂ ; под MgCl ₂ понимают буфер, содержащий 10 мМ HEPES, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 0,005% P20 с 4,0 мМ MgCl ₂ .	

Под CaCl₂ понимают буфер, содержащий 10 мМ HEPES, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 0,005% P20 с 4,0 мМ CaCl₂; под MgCl₂ понимают буфер, содержащий 10 мМ HEPES, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 0,005% P20 с 4,0 мМ MgCl₂.

Определение с помощью FACS сродства к клеткам, экспрессирующим $\alpha 5\beta 1$

Антитело 22B5/DLE тестировали на его сродство связывания с интегрином клеточной поверхности $\alpha 5$, используя анализ FACS, с применением клеток, экспрессирующих эндогенный интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека (HUVЕC). Вкратце, клетки выделяли, используя трипсин-EDTA, и отмывали с помощью охлажденного PBS. После внесения аликвот в 96-луночные планшеты клетки блокировали сывороткой и инкубировали с различными концентрациями специфического mAb в течение 1 часа при 4°C. Затем клетки отмывали и инкубировали со вторичным антителом против к-цепи человека, конъюгированным с флуорофором R-PE, и анализировали, используя проточный цитометр FACSCalibur. Для каждого образца собирали 10000 событий, не применяя какого-либо гейтирования. Для определения K_D рассчитывали среднее геометрическое гистограммы каждого образца и выражали как функцию от концентрации mAb. K_D рассчитывали после подведения под равновесную модель с двумя состояниями. Антитело 22B5/DLE связывается с эндогенным $\alpha 5\beta 1$ с K_D 2,15 нМ (n=4) в клетках HUVЕC (см. фиг.4).

Пример 4**Сродство к Fcγ-рецепторам, определенное с помощью анализа Biacore**

Способность антитела 22B5/DLE, которое содержит три мутации IgG1 DLE (описанные ранее в примере 2), усиливать связывание с рецепторами FcγR оценивали в эксперименте связывания Biacore. Сродство связывания с FcγR антитела 22B5/DLE сравнивали со сродством связывания IgG1 дикого типа (wt). Было протестировано три класса рецепторов FcγR: 1) высокоаффинный рецептор FcγRI; 2) два полиморфных варианта низкоаффинного рецептора FcγRIIa/131H и FcγRIIa/131R; и 3) два полиморфных варианта рецептора со средним сродством FcγRIIIa/158F и FcγRIIIa/158V. Результаты (представленные на фиг.5 и суммированные в таблице 2) показывают примерно 6-кратное увеличение для высокоаффинного рецептора FcγRI. Наблюдалось 122- и 70-кратное усиление связывания для рецепторов со средней аффинностью FcγRIIIa/158F и 158V соответственно. Сравнение сродства связывания антитела 22B5/DLE и IgG1 дикого типа также оценивали против Fcγ-рецепторов мыши. Максимальное усиление связывания наблюдалось для mFcγRIV, затем для mFcγRI и mFcγRIII (см. фиг.5).

Таблица 2	
Связывание с рецепторами FcγR в анализе Biacore (K _D , кратность усиления относительно wt IgG1)	
FcγR	K _D (кратность усиления относительно wt IgG1)
FcγRI человека	5,8 нМ (6-кратное)
FcγRIIa/131H человека	1000 нМ (1,6-кратное)
FcγRIIa/131R человека	650 нМ (2,3-кратное)
FcγRIIIa/158F человека	27 нМ (122-кратное)
FcγRIIIa/158V человека	9,4 нМ (70-кратное)
FcγRI мыши	96 нМ (14-кратное)
FcγRIIIa мыши	1700 нМ (5-кратное)
FcγRIV мыши	9,1 нМ (260-кратное)

Пример 5**Клеточная функциональная активность антитела 22B5/DLE****Блокада клеточной адгезии**

Была протестирована способность антитела 22B5/DLE нарушать адгезию клеток, опосредованную интегрином α5β1. Анализы клеточной адгезии осуществляли путем предварительной инкубации клеток HUVES с антителом (22B5/DLE, 22B5 IgG1, вариантами подкласса IgG2 и IgG4 или mAb отрицательного контроля (BHA2 IgG1)) и затем помещения в планшеты, покрытые фибронектином (FN) или коллагеном. Клетки HUVES (15000) смешивали с антителом в буфере для адгезии (Нерес-забуференный солевой раствор, содержащий глюкозу и бычий сывороточный альбумин) в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки добавляли в лунки 96-луночного планшета, покрытые фибронектином или коллагеном, и оставляли для адгезии к планшету в течение одного часа при 37°C/5% CO₂. Неадгезировавшие клетки удаляли отмывкой каждой лунки три раза. Измеряли количество адгезировавших клеток, оставшихся в каждой лунке. Адгезировавшие клетки лизировали путем добавления буфера, содержащего краситель CyQUANT GR, и флуоресценцию измеряли при Ex/Em: 485/535 нм с помощью плащечного ридера. Как можно видеть на фиг.6, mAb, функционально блокирующие интегрин α5β1, избирательно ингибируют адгезию клеток HUVES к фибронектину, но не к коллагену (отрицательный контроль). Как показано на фиг.6, величины IC₅₀ для 22B5/DLE и вариантов его подкласса (IgG1 дикого типа, IgG1 DLE, IgG2 и IgG4) оказались схожими в этом одночасовом анализе. Эти данные указывают на то, что связывание антитела с α5 и/или α5β1 ингибирует связывание интегрин с

фибронектином. Эти данные дополнительно указывают на то, что антитело связывается с $\alpha 5\beta 1$, если он экспрессируется на поверхности клеток. То есть эпитоп, распознаваемый антителом, доступен, если цепи $\alpha 5$ и $\beta 1$ ассоциированы, и эпитоп доступен для связывания, если интегрин экспрессируется на клеточной поверхности.

5 **Пример 6**

ADCC-эффекторная функция in vitro

Активности эффекторных функций оценивали путем анализов ADCC в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) против $\alpha 5\beta 1$ -позитивных мишенных клеток, используя стандартные способы. Уровни экспрессии интегрина $\alpha 5$ для ряда клеточных линий измеряли с помощью анализа вестерн-блот в соответствии со следующим. Клетки лизировали в лизирующем буфере RIPA (продукция фирмы Upstate), содержащем ингибиторы протеазы (продукция фирмы Roche) и фосфатазы (продукция фирмы Calbiochem). Осуществляли электрофорез лизатов (по 3 мкг общего белка в каждом) в геле SDS-PAGE и иммуноблоттинг с антителами против интегрина $\alpha 5$. Иммунореактивные полосы идентифицировали и анализировали посредством инфракрасной системы изображения Odyssey фирмы LI-COR Bioscience. Пример ряда экспрессии показан на фиг.7.

Для измерения ADCC эффекторные клетки (PBMC) выделяли, используя центрифугирование в градиенте фиколла, из образцов банка крови Сан-Диего согласно стандартным способам. Десять тысяч мишенных клеток (HUVEC или опухолевых линий) предварительно инкубировали с антителом в ростовой среде при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего добавляли один миллион клеток PBMC человека (E:T=100:1), и смесь инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 4 часов. ADCC-опосредованный клеточный лизис измеряли, используя детекцию высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) (Roche) или набор для биоанализа ToxiLight (Cambrex) согласно стандартным протоколам.

Антитело 22B5/DLE связывается с опухолью или интегрином $\alpha 5\beta 1$, экспрессируемым эндотелием, и стимулирует ADCC (до 80% лизиса мишенных клеток) с величиной EC₅₀ 0,04 нМ по сравнению с 0,23 нМ для wt 22B5 IgG1. Эти данные указывают на то, что мутации DLE усиливали ADCC-активность по сравнению с IgG1 такого типа. В четырехчасовом анализе ни для 22B5 IgG2, ни для 22B5 IgG4 ADCC-активности обнаружено не было. В качестве mAb отрицательного контроля использовали KLN IgG1. Примеры ADCC в клетках HUVEC и типичной опухолевой линии (U87MG) показаны на фиг.8 (отражает оба способа детекции).

Как показывают данные, представленные на фиг.9, клеточная цитотоксичность, индуцируемая 22B5/DLE и wt 22D5 IgG1, коррелирует с уровнем экспрессии $\alpha 5\beta 1$ клеточной линией. У клеток с самой высокой экспрессией $\alpha 5\beta 1$ (панель A, U87MG) наблюдается самый высокий уровень клеточной цитотоксичности, тогда как у клеточных линий со средней экспрессией (фиг.9, Hs578T и 3T3, 5) наблюдается промежуточная цитотоксичность. Отмечено, что антитело 22B5/DLE усилило ADCC-эффекты в клетках M24met, которые экспрессировали низкий уровень $\alpha 5\beta 1$ (примеры в нижней панели фиг.9). Эти данные указывают на то, что ADCC опосредуется, по меньшей мере, частично, связыванием антитела с $\alpha 5\beta 1$, экспрессируемым клеткой.

45 **Пример 7**

Антиметастатическая эффективность in vivo

Помимо его активностей пролиферации, миграции и выживаемости в эндотелиальных и опухолевых клетках, интегрин $\alpha 5\beta 1$ также участвует в метастазировании опухоли за счет стимуляции экстравазации опухолевых клеток и миграции в отдаленные органы.

Следующее исследование предназначено продемонстрировать антиметастатическую эффективность 22B5/DLE в предклинической модели.

Ингибирование экспериментального метастазирования A549-Luc в легкое

A549-Luc представляет собой клеточную линию немелкоклеточного рака легкого человека (NSCLC), трансфицированную геном люциферазы. При внутривенной имплантации клетки A549-Luc предпочтительно локализируются в легком, что может быть измерено посредством билюминесцентного изображения (BLI). В этом исследовании клетки A549-Luc вводили (в количестве 3×10^6 на животного) через хвостовую вену в мышей SCID BALB/c, которые получили предварительную дозу соответствующего антитела за два дня до инъекции. После имплантации животные получали дозы один раз в неделю до 8 недели. Билюминесценцию каждого животного измеряли один раз в неделю до 20 недели.

У антитела 22B5/DLE наблюдалась наибольшая эффективность против метастазирования опухоли с TGI (ингибированием роста опухоли) 97% на 8 неделе (конечная неделя введения дозы), что является статистически значимым ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой. Введение дозы антитела 22B5 IgG1, которое, как предполагается, не опосредует ADCC в этой модели, также приводило к существенному TGI, составившему 89%, на 8 неделе (фиг.10A). Величины p сравнения между 22B5/DLE и 22B5 IgG2 на 5, 6, 7 и 8 неделях составили 0,07; 0,03; 0,08 и 0,17, соответственно. Все способы лечения прекращали после 8 недели, тогда как ежедневный мониторинг нежелательных физиологических признаков и еженедельные измерения посредством BLI животных продолжали.

Опухоли в группе, обработанной 22B5/DLE, остались супрессированными через 13 недель, тогда как в группе, обработанной 22B5 IgG2, начали быстро расти примерно через 2 недели после отмены лекарственного средства (фиг.10B). Конечную точку исследования полагали достигнутой при достижении BLI опухоли 1×10^8 фонотов/секунда, в это время мышей забивали. На графике Каплана-Мейера (фиг.10C) показано, что антитело 22B5/DLE существенно удлиняло среднее время выживаемости животных до 20 недель по сравнению с 14 неделями для животных, обработанных 22B5 IgG2, и 10 неделями для контрольной группы.

Эти данные указывают на то, что в этой модели противоопухолевый эффект антитела 22B5 не опосредуется исключительно ADCC-активностью. То есть 22B5-IgG2 ингибировало рост/инвазию опухоли, хотя неизвестно, опосредует ли IgG2 человека эффекторные функции, включая клеточную цитотоксичность, а также опосредованные антителом противоопухолевые эффекты. Кроме того, данные показали, что рост опухоли, оставшийся супрессированным после введения 22B5-IgG1-DLE, прекратился. Эти данные указывают на то, что блокирование связывания $\alpha 5\beta 1$ с FN опосредует противоопухолевый эффект (22B5-IgG2), который дополнительно усиливается ADCC-активностью (22B5-IgG1/DLE).

Пример 8

Структурная характеристика моноклональных антител человека 24C7, 1D9 и 2D2

Последовательности кДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей моноклональных антител 24C7, 1D9 и 2D2, получали из гибридом 24C7, 1D9 и 2D2 (соответственно), используя стандартные техники ПЦР, и секвенировали, используя стандартные техники секвенирования ДНК.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области тяжелой цепи антитела 24C7 показаны на фиг.1E и 1F и в последовательностях SEQ ID NO:21 и 19, соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной

области легкой цепи антитела 24C7 показаны на фиг.1G и 1H и в последовательностях SEQ ID NO:22 и 20, соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела 1D9 показаны на фиг.1I и 1J и в последовательностях SEQ ID NO:31 и 29, соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области легкой цепи антитела 1D9 показаны на фиг.1K и 1L и в последовательностях SEQ ID NO:32 и 30, соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела 2D2 показаны на фиг.1M и 1N и в последовательностях SEQ ID NO:41 и 39, соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области легкой цепи антитела 1D9 показаны на фиг.1O и 1P и в последовательностях SEQ ID NO:42 и 40, соответственно.

Исходные молекулы 24C7, 1D9 и 2D2 относились к подклассу IgG1. В отношении подкласса IgG1, для дополнительного повышения связывания с рецепторами FcγR и активности эффекторных функций в константную область IgG1 вводили три мутации (S247D, A338L и I340E) посредством сайт-специфичного мутагенеза. Таким образом, антитело 24C7, относящееся к подклассу IgG1 и содержащее эти три мутации, обозначают как «24C7/DLE» или «24C7 IgG1 DLE». Подобным образом, аналогичные антитела с этими тремя мутациями обозначают в данном документе как «1D9/DLE» или «1D9 IgG1 DLE» и «2D2/DLE» или «2D2 IgG1 DLE». Аналогично, антитела с двумя мутациями S247D и I340E обозначают в данном документе как мутанты «DE», например, «24C7/DE» или «24C7 IgG1 DE». Аналогичные наименования любых антител, описанных в данном документе, и с любой одной, двумя или тремя указанными выше мутациями обозначают в данном документе подобным же образом. Например, под «1D9/DE» понимают антитело 1D9, описанное в данном документе, относящееся к подклассу IgG1, со следующими мутациями в Fc-области - S247D и I340E. Аналогично, «2D2/L» относилось бы к антителу 2D2, описанному в данном документе, с изотипом IgG1 и содержащему мутацию A338L и так далее.

Сравнение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина 24C7 с известными последовательностями тяжелых цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в тяжелой цепи 24C7 используется сегмент V_H из гена V_H 3-30.3 зародышевой линии человека, сегмент D из гена 7-27 зародышевой линии человека и сегмент JH из гена JH 6b зародышевой линии человека. Анализ последовательности V_H антитела 24C7, используя систему Kabat определения CDR-области, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленному на фиг.1F и в последовательностях SEQ ID NO:13, 14 и 15, соответственно.

Сравнение последовательности легкой цепи иммуноглобулина 24C7 с известными последовательностями легких цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в легкой цепи 24C7 используется сегмент V_L из гена VK L6 зародышевой линии человека и сегмент JK из гена JK 2 зародышевой линии человека. Анализ последовательности V_L антитела 24C7, используя систему Kabat определения CDR-области, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленному на фиг.1H и в последовательностях SEQ ID NO:16, 17 и 18, соответственно.

Сравнение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина 1D9 с известными последовательностями тяжелых цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в тяжелой цепи 1D9 используется сегмент V_H из гена V_H 3-30.3

зародышевой линии человека и сегмент JH из гена JH 6b зародышевой линии человека. Сегмент D не мог быть сопоставлен с геном зародышевой линии из-за распространенных мутаций. Анализ последовательности V_H антитела 1D9, используя систему Kabat определения CDR-области, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленному на фиг.1J и в последовательностях SEQ ID NO:23, 24 и 25, соответственно.

Сравнение последовательности легкой цепи иммуноглобулина 1D9 с известными последовательностями легких цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в легкой цепи 1D9 используется сегмент V_L из гена VK L6 зародышевой линии человека и сегмент JK из гена JK 1 зародышевой линии человека. Анализ последовательности V_L антитела 1D9, используя систему Kabat определения CDR-области, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленному на фиг.1L и в последовательностях SEQ ID NO:26, 27 и 28, соответственно.

Сравнение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина 2D2 с известными последовательностями тяжелых цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в тяжелой цепи 2D2 используется сегмент V_H из гена V_H 3-30.3 зародышевой линии человека, сегмент D из гена 7-27 зародышевой линии человека и сегмент JH из гена JH 6b зародышевой линии человека. Анализ последовательности V_H антитела 2D2, используя систему Kabat определения CDR-области, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленному на фиг.1N и в последовательностях SEQ ID NO:33, 34 и 35, соответственно.

Сравнение последовательности легкой цепи иммуноглобулина 2D2 с известными последовательностями легких цепей иммуноглобулинов зародышевой линии человека показало, что в легкой цепи 2D2 используется сегмент V_L из гена VK L6 зародышевой линии человека и сегмент JK из гена JK 3 зародышевой линии человека. Анализ последовательности V_L антитела 2D2, используя систему Kabat определения CDR-области, привело к изображению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленному на фиг.1P и в последовательностях SEQ ID NO:36, 37 и 38, соответственно. Ниже в таблице 3 представлено использование генов в моноклональных антителах 22B5, 2D2, 24C7 и 1D9.

Таблица 3

Использование генов

<u>Антитело</u>	<u>Тяжелая цепь</u>			<u>Легкая цепь</u>	
	<u>V_H</u>	<u>D</u>	<u>J_H</u>	<u>V_K</u>	<u>J_K</u>
22B5	4-39	3-10	JH 6b	Vk L6	JK 4
2D2	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 3
24C7	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 2
1D9	3-30.3	Не определено	JH 6b	Vk L6	JK 1

Пример 9

Характеристика специфичности связывания и кинетический анализ связывания моноклональных антител человека 22B5, 24C7, 1D9 и 2D2

В этом примере специфичность связывания антител человека против $\alpha 5\beta 1$ 22B5, 24C7, 1D9 и 2D2 подкласса IgG1 при наличии и в отсутствие мутаций IgG1 DLE (т.е.

«22B5 G1 DLE», «22B5 G1», «1D9 G1 DLE», «1D9 G1» и т.д.) оценивали посредством проточной цитометрии, используя сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Определение сродства к клеткам, экспрессирующим $\alpha 5\beta 1$, с помощью FACS

5 Антитела 22B5/DLE, 24C7/DLE, 1D9/DLE и 2D2/DLE тестировали в отношении их сродства связывания к интегрину клеточной поверхности $\alpha 5$, используя анализ FACS с применением клеток, экспрессирующих эндогенный интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека (HUVEC). Вкратце, клетки выделяли, используя трипсин-EDTA, и отмывали с помощью
10 охлажденного PBS. После внесения аликвот в 96-луночные планшеты клетки блокировали сывороткой и инкубировали с различными концентрациями специфического mAb в течение 1 часа при 4°C. Затем клетки отмывали и инкубировали со вторичным антителом против к-цепи человека, конъюгированным с флуорофором R-PE, и анализировали, используя проточный цитометр FACSCalibur. Для каждого образца собирали 10000 событий без применения какого-либо гейтирования. Для определения
15 K_D рассчитывали среднее геометрическое гистограммы каждого образца и выражали как функцию от концентрации mAb. K_D рассчитывали после подведения под равновесную модель с двумя состояниями. Результаты представлены на фиг.11А и 11В.

Пример 10

20 *In vitro* ADCC-эффекторная функция моноклональных антител человека 22B5, 24C7, 1D9 и 2D2

Активности эффекторных функций оценивали посредством анализов антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), описанных ранее в примере 6. Величины EC_{50} в отношении стимуляции ADCC (до 80% лизиса
25 мишеных клеток) в типичной опухолевой линии (U87MG) представлены на фиг.12 для антител 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE и 24C7/DLE.

Пример 11

In vivo ADCC-зависимая противоопухолевая эффективность в сингенной модели метастатической меланомы

30 Для демонстрации ADCC-специфического ответа моноклональное антитело человека 1D9/DLE (которое связывается с $\alpha 5\beta 1$ человека и мыши, но функционально не нейтрализует $\alpha 5\beta 1$) испытывали на модели ингибирования опухолевого роста (TGI) у сингенных мышей с интактными иммунными эффекторными клетками. Конкретно, ADCC-опосредованную противоопухолевую активность оценивали на модели сингенных
35 мышей, у которой клетки меланомы мыши B16F10 экспрессировали $\alpha 5\beta 1$. Линия меланомы мыши B16F10, экспрессирующая интегрин $\alpha 5$, является высоко метастатичной и при внутривенном введении первично колонизирует легкое. Опухолевые клетки вводили внутривенно в иммунокомпетентных мышей C57BL/6. Клетки B16F10 (2×10^5
40 на животное) вводили через хвостовую вену в сингенных мышей-хозяев C57BL/6, которые предварительно за 1 день до инъекции получали антитела (10 мг/кг, n=10 на группу). Животные получали подкожно антитело один раз в неделю в течение всего 3 недель. На 21 день животных забивали и резецировали легкие.

Как показано результатами на фиг.13, антитело 1D9/DLE продуцировало существенную противоопухолевую эффективность *in vivo*, указывая на то, что для
45 продукции TGI достаточно одного ADCC-ответа. Для отображения специфического эффекта ADCC в модели животных обрабатывали с помощью 1D9 IgG2 (нет данных об опосредовании ADCC) и 1D9 IgG1 DLE (изотип IgG1 с усилением Fc за счет мутаций DLE). Большую противоопухолевую эффективность наблюдали с 1D9 IgG1 DLE, чем

с 1D9 IgG2. Поскольку пары изотипов имеют идентичные аминокислотные последовательности в антигенсвязывающем домене и *in vitro* активности, данные указывают на то, что за повышенную эффективность 1D9 IgG1 DLE была ответственна усиленная ADCC в результате мутаций DLE.

5 Информация о депонировании

Заявители депонировали переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, обозначенного в данном документе как 22B5, в American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA 20110-2209 U.S.A. VH-область антитела 22B5 депонировали 16 июля 2008 и присвоили депозитный номер ATCC PTA-9377. VL-область антитела 22B5
10 депонировали 16 июля 2008 и присвоили депозитный номер ATCC PTA-9377. Эти депозиты сделаны в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и правилами на основании этого договора (Будапештский договор). Эти депозиты должны поддерживаться без ограничения в депозитарии ATCC в течение
15 периода 30 лет или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента независимо от его длительности, и должны быть заменены, если депозиты станут нежизнеспособными в течение этого периода. Доступность депонированных материалов не должна быть истолкована как разрешение на выполнение любых аспектов настоящего изобретения в нарушение прав, данных по уполномочию любого правительства в
20 соответствии с его законами патентования. Предполагается, что выше изложенного описания должно быть достаточно, чтобы специалист в данной области смог выполнить все аспекты настоящего изобретения. Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме депонированными материалами, поскольку депонированный вариант осуществления понимается как одна из иллюстраций некоторых аспектов
25 изобретения, и любые конструкции, которые функционально эквивалентны, охватываются данным изобретением. Депонирование материала в данном документе не является признанием, что изложенного в данном документе описания недостаточно, чтобы осуществить любой аспект изобретения, включая его лучший способ, и оно не должно быть истолковано как ограничивающее объем формулы изобретения
30 конкретными иллюстрациями, которые оно представляет. На самом деле, специалистам в данной области из вышеизложенного описания должно быть понятно большое число модификаций изобретения помимо представленных и описанных в данном документе, и они охватываются прилагаемой формулой изобретения.

35

40

45

Суммарный список последовательностей (а.а. = аминокислота; н.а. = нуклеиновая кислота)

SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность
1	V _H CDR1 а.а. 22B5	23	V _H CDR1 а.а. 1D9
2	V _H CDR2 а.а. 22B5	24	V _H CDR2 а.а. 1D9
3	V _H CDR3 а.а. 22B5	25	V _H CDR3 а.а. 1D9
4	V _L CDR1 а.а. 22B5	26	V _L CDR1 а.а. 1D9
5	V _L CDR2 а.а. 22B5	27	V _L CDR2 а.а. 1D9
6	V _L CDR3 а.а. 22B5	28	V _L CDR3 а.а. 1D9
7	V _H а.а. 22B5	29	V _H а.а. 1D9
8	V _L а.а. 22B5	30	V _L а.а. 1D9
9	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 22B5/DLE	31	V _H н.а. 1D9
10	Аминокислотная последовательность легкой цепи 22B5	32	V _L н.а. 1D9
11	V _H н.а. 22B5		
12	V _L н.а. 22B5	33	V _H CDR1 а.а. 2D2
		34	V _H CDR2 а.а. 2D2
13	V _H CDR1 а.а. 24C7	35	V _H CDR3 а.а. 2D2
14	V _H CDR2 а.а. 24C7		
15	V _H CDR3 а.а. 24C7	36	V _L CDR1 а.а. 2D2
		37	V _L CDR2 а.а. 2D2
16	V _L CDR1 а.а. 24C7	38	V _L CDR3 а.а. 2D2
17	V _L CDR2 а.а. 24C7		
18	V _L CDR3 а.а. 24C7	39	V _H а.а. 2D2
		40	V _L а.а. 2D2
19	V _H а.а. 24C7	41	V _H н.а. 2D2
20	V _L а.а. 24C7	42	V _L н.а. 2D2
21	V _H н.а. 24C7	43	Аминокислотная последовательность константных регионов тяжелой цепи IgG1 с мутациями A247D, A338L и I340E
22	V _L н.а. 24C7	44	Аминокислотная последовательность константного региона легкой цепи IgG1

Формула изобретения

1. Выделенное моноклональное антитело к интегрину $\alpha 5\beta 1$ человека, содержащее:
- CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1;
 - CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:2;

- (c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:3;
- (d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4;
- (e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:5; и
- (f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:6.

5 2. Антитело по п.1, содержащее:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; и

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

10 3. Антитело по п.1 или 2, где указанное антитело представляет собой полноразмерное IgG1-антитело человека и где по меньшей мере одна аминокислота в Fc-области указанного антитела мутирована, и дополнительно, где у указанного антитела наблюдается ADCC больше, чем у идентичного антитела, у которого указанная по меньшей мере одна аминокислота не мутирована.

15 4. Антитело по п.3, в котором по меньшей мере одна мутация происходит в аминокислотном положении серин 247, аланин 338 или изолейцин 340.

5. Антитело по п.3, где по меньшей мере одну мутацию выбирают из группы, состоящей из мутаций: серин 247 на аспарагиновую кислоту (S247D), аланин 338 на лейцин (A338L) и изолейцин 340 на глутаминовую кислоту (I340E).

20 6. Антитело по п.5, где антитело содержит мутации S247D, A338L и I340E.

7. Антитело по п.1, где указанное антитело содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:10.

25 8. Композиция для ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп.1-7.

10. Экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.9.

30 11. Клетка-хозяин для экспрессии антитела по любому из пп.1-7, содержащая экспрессирующий вектор по п.10.

12. Способ получения антитела против $\alpha 5\beta 1$, включающий экспрессию антитела в клетке-хозяине по п.11.

35 13. Способ ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 5\beta 1$ человека, включающий приведение указанных клеток в контакт с антителом по любому из пп.1-7 или композицией по п.8 в количестве, эффективном для ингибирования роста опухолевых клеток.

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Pfizer Inc and Medarex, Inc.

<120> Антитела против альфа 5 - бета 1 и их применение

<130> PC33646

<160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Человек

<400> 1

Ser Ser Ser Tyr Trp Gly
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Человек

<400> 2

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Человек

<400> 3

His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu Asp
1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Человек

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Человек

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Человек

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> Человек

<400> 7

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Человек

<400> 8

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

RU 2 528 736 C2

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

RU 2 528 736 C2

130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

 <210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Человек

 <400> 10
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

RU 2 528 736 C2

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 11
 <211> 375
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 11
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagct actggggctg gatccgccag 120
 cccccagga aggggctgga gtggattggg agtatctact atagtgggag aaactacaac 180
 aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacattac 300
 tatggttcgg ggagttccta ctactactac gatctggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 12
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 12
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 13

Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 14

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 15

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 18

Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Человек

<400> 19

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

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

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

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

RU 2 528 736 C2

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 21
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 21
 cagggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgcta tgcaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcaa taaaaactac 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatgt attactgtgc gagagaatac 300
 tggggaacct actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 22
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc aactacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaccaact ggccgtacac ttttggccag 300
 gggacsaagc tggagatcaa a 321

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 23

Ser Thr Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 24

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

Gly

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Человек

<400> 25

Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Человек

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
 1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Человек

<400> 27

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Человек

<400> 28

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> Человек

<400> 29

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

RU 2 528 736 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

<210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 31

<211> 366
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 31
 caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt acctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagtcc 300
 cccccatct actactacta cggtatggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcacccgc 360
 tcctca 366

<210> 32
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 32
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 33

Ser Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 34

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

Gly

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 35

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val
 1 5 10

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 37

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 38

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 39

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

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

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

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

RU 2 528 736 C2

50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 41
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 41

caggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt cgcaggct 120

RU 2 528 736 C2

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcac taaatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctggat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt attactgtgc gagagaatac 300
 tggggaacct actactacgg gacggacgtc tggggccaag ggaccacggt catcgtctcc 360
 tca 363

<210> 42
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 42
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttaac agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactotca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 43
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 43

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

RU 2 528 736 C2

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp 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 Leu Pro Glu 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 Glu Glu
 225 230 235 240

Met 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> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 44

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
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	

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
 CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGCT
ACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
AGTATCTACTATAGTGGGAGAACTACAACAACCCGTCCCTCAAGAGTCG
 AGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
 GCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACATTAC
TATGGTTCGGGGAGTTCCTACTACTACTACGATCTGGACGTCTGGGGCCA
 AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

ФИГ.1А

ДНК-последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:11)

QLQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSG
RNYNNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHYGSGSSYYYY
DLDVWGQGT TTVTVSS

ФИГ.1В

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
 AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGAT
GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
 TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTG
 CAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

ФИГ.1С

ДНК-последовательность варибельной области легкой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

ФИГ.1D

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 22B5 (SEQ ID NO:8)

CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
TTGATGGAAGCAATAAAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCAT
CTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGAATACTGGGGAACTACT
ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

ФИГ.1E

ДНК-последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 24C7 (SEQ ID NO:21)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISF
DGSNKNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAREYWGTY
YGMDVWGQGTTVTSS

ФИГ.1F

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 24C7 (SEQ ID NO:19)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTACCAACTGGCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA
GATCAAA

ФИГ.1G

ДНК-последовательность варибельной области легкой цепи антитела 24C7 (SEQ ID NO:22)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRTNWPYTFGQGTKLEIK

ФИГ.1H

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 24С7 (SEQ ID NO:20)
(SEQ ID NO:20)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTCAGTACCTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
ATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCCCCCCCCATCTACT
ACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
 А

ФИГ.1I

ДНК-последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:31)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSTYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPPIYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

ФИГ.1J

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 1D9
(SEQ ID NO:29)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
 AAATCAA

ФИГ.1K

ДНК-последовательность варибельной области легкой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:32)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
IGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK

ФИГ.1L

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 1D9 (SEQ ID NO:30)

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
TTGATGGAAGCACTAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGGATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTGGGGAACCTACT
ACTACGGGACGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCATCGTCTCCTCA

ФИГ.1M

ДНК-последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:41)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISF
DGSTKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTALYYCAREYWGTYYY
GTDVWGQGTTVIVSS

ФИГ.1N

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:39)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAAACAGCTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAA

ФИГ.1O

ДНК-последовательность варибельной области легкой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:42)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
IGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK

ФИГ.1P

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 2D2 (SEQ ID NO:40)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

ФИГ.1Q

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 с выделенными жирным шрифтом и подчеркнутыми мутациями S247D, A338L и I340E (SEQ ID NO:43)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФИГ.1R

Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи IgG1 (SEQ ID NO:44)

V_H

Зародышевая линия QLQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWG WIRQPPGKGLEWI
22b5 I30S N33S -----

Зародышевая линия GSIYYSG STYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
22b5 I30S N33S -----RN -N-----

Зародышевая линия QYYYGSG SYNYYYYYGMDVWGQGT'VTVSS
22b5 I30S N33S H.----- . . .S----DL-----

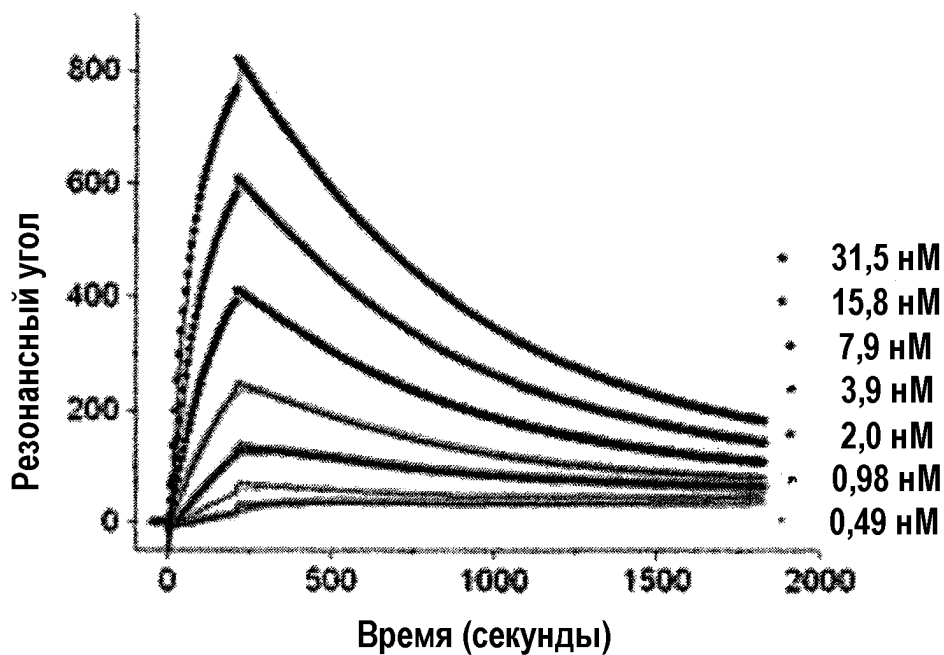
V_K

Зародышевая линия EIVLTQSPA TSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
22b5 I30S N33S -----

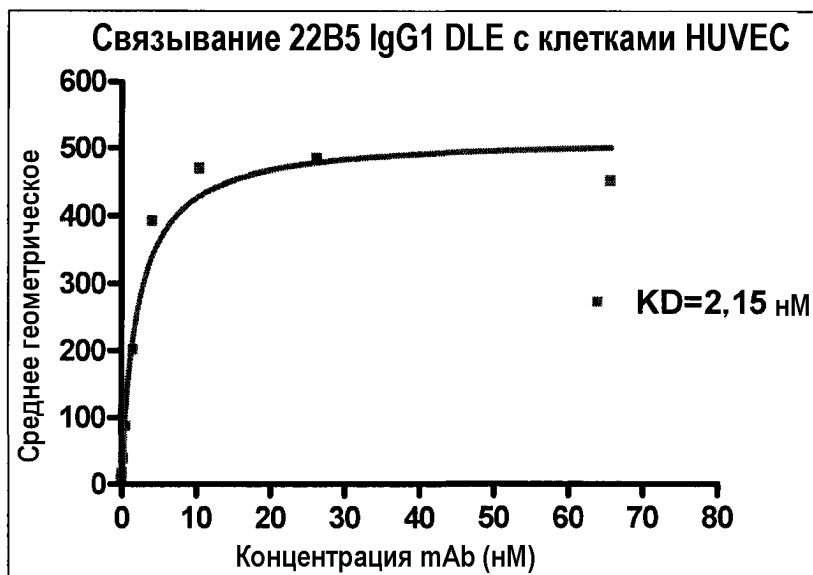
Зародышевая линия ASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGG
22b5 I30S N33S -----

Зародышевая линия GTKVEIK
22b5 I30S N33S -----

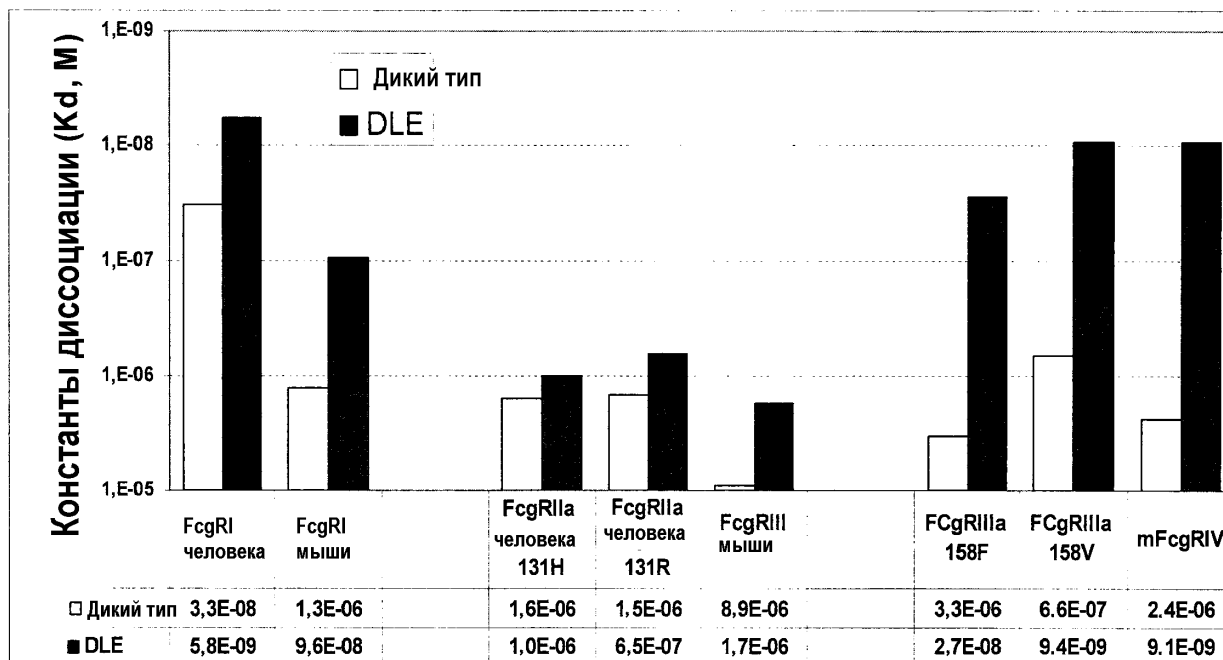
ФИГ.2



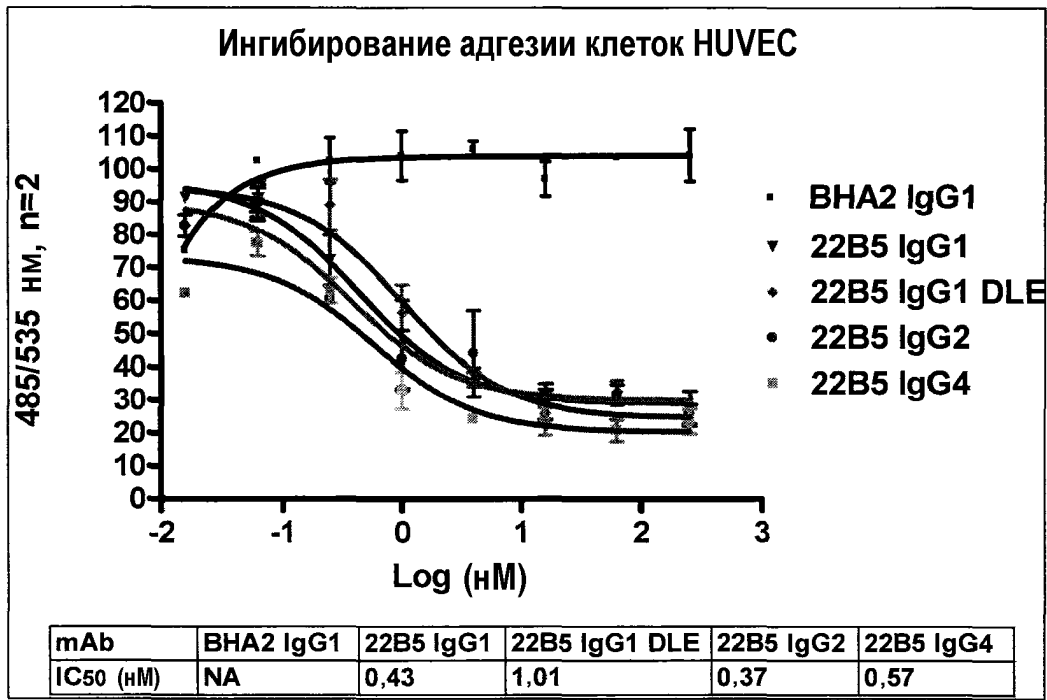
ФИГ.3



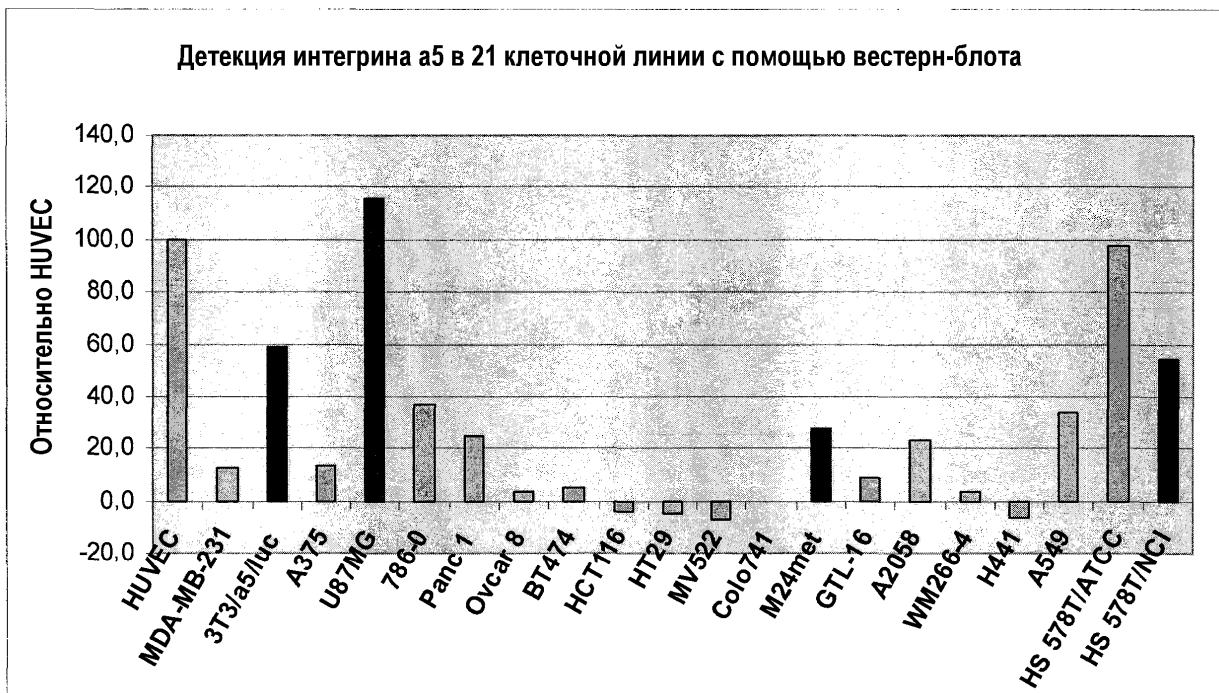
ФИГ.4



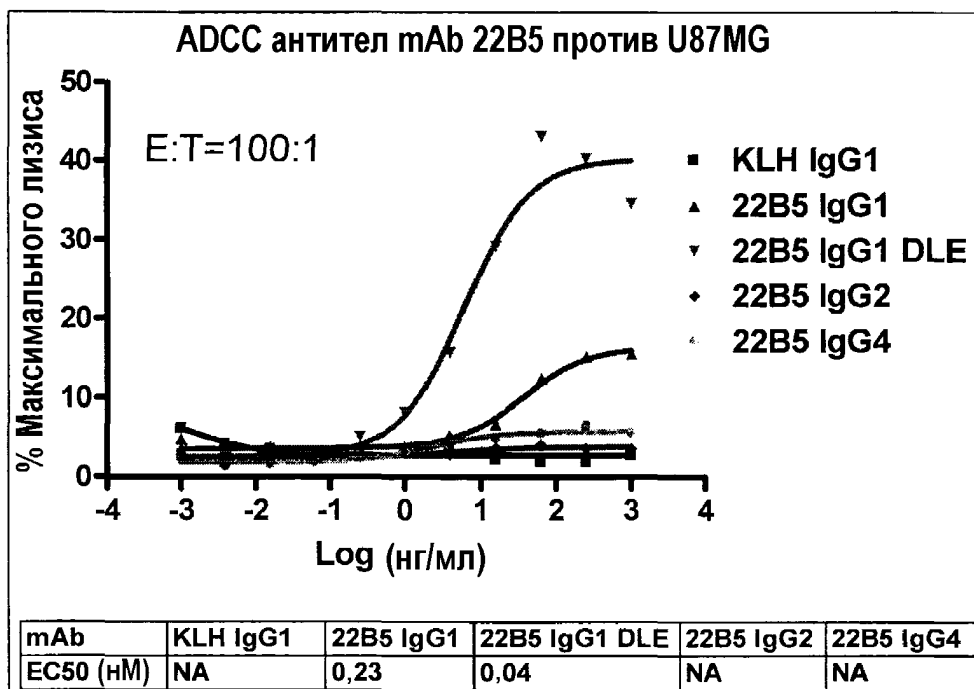
ФИГ.5



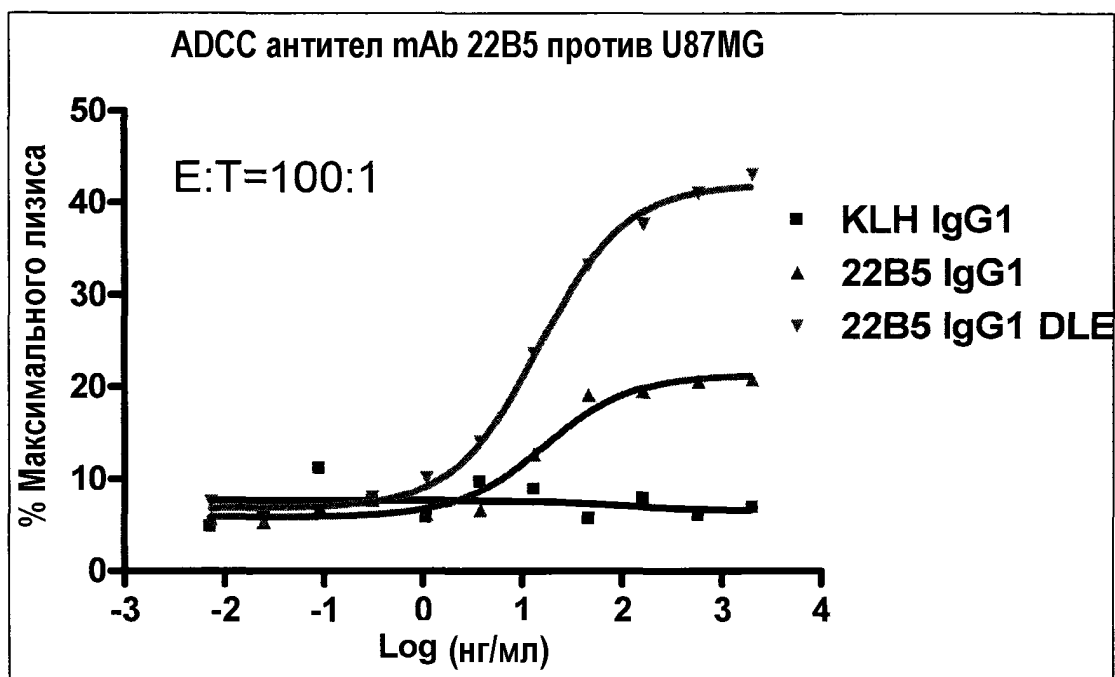
ФИГ.6



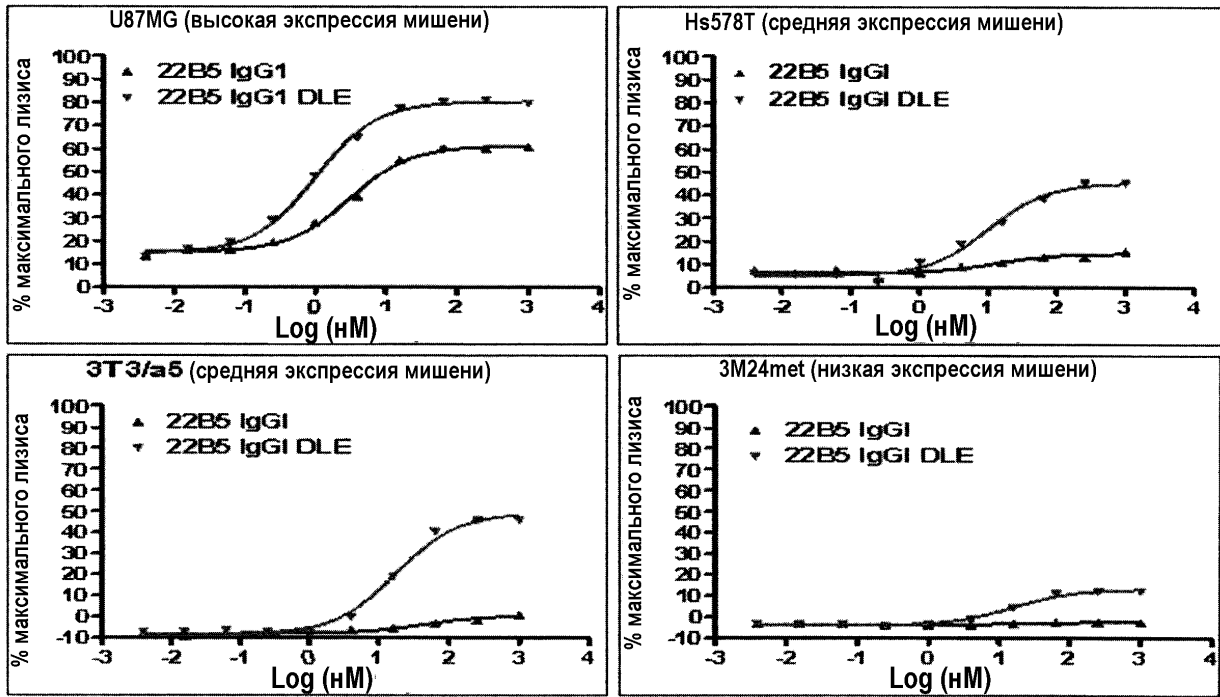
ФИГ.7



ФИГ.8А

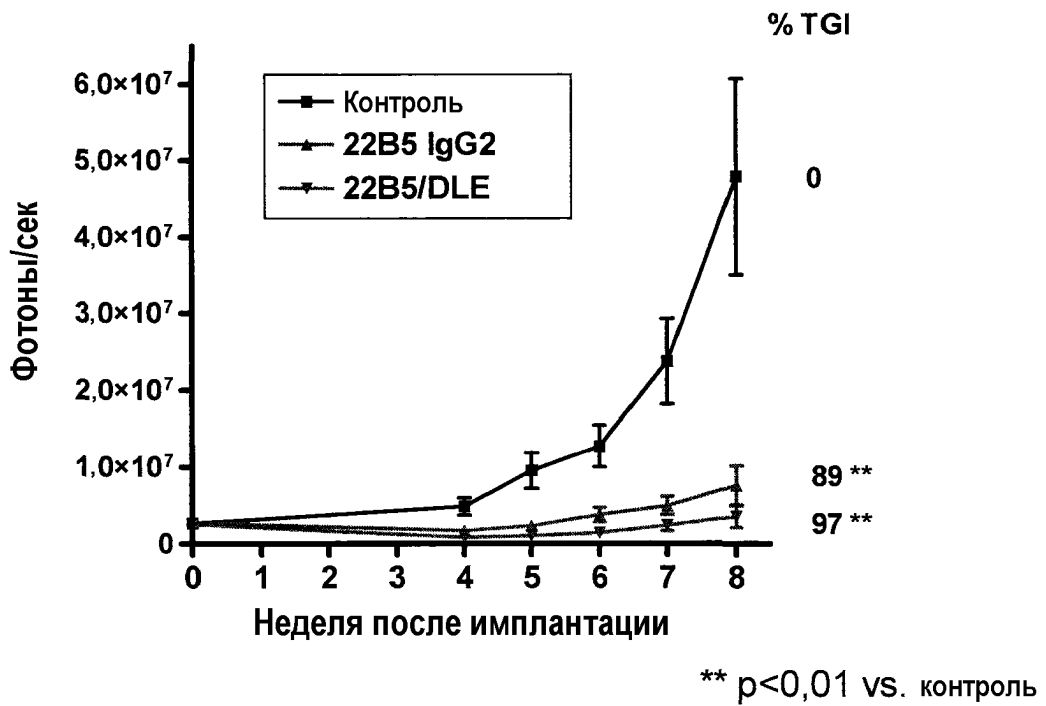


ФИГ.8В



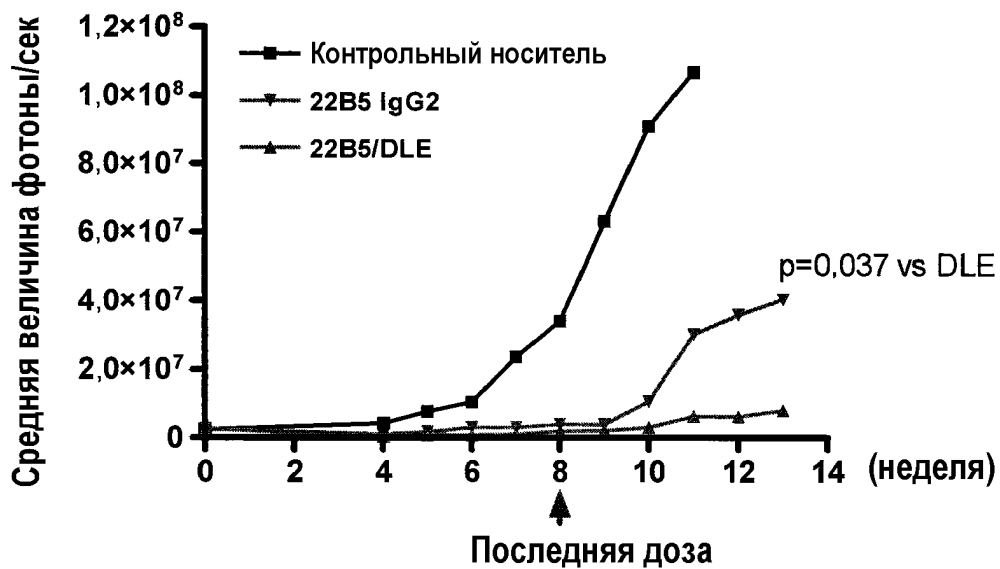
ФИГ.9

A



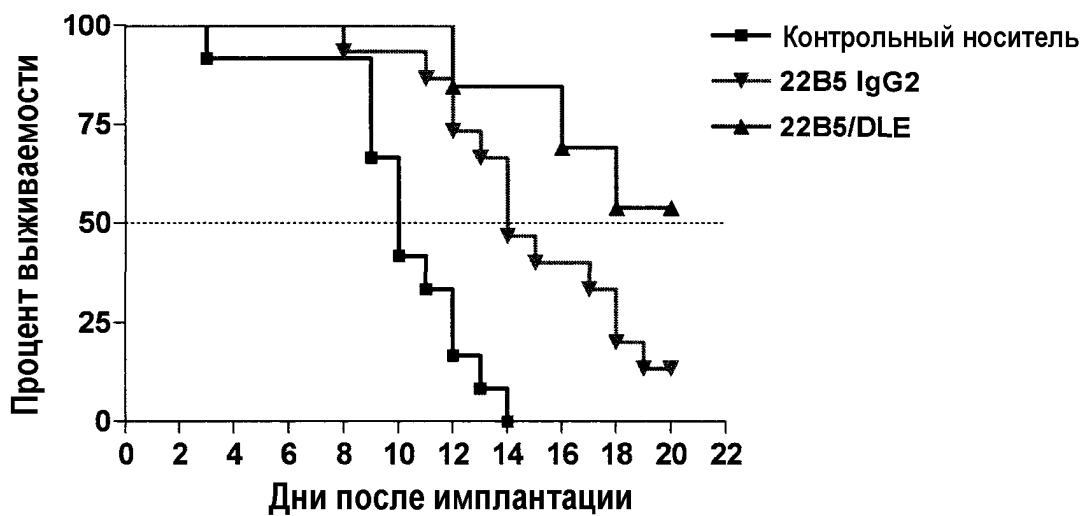
ФИГ.10А

В



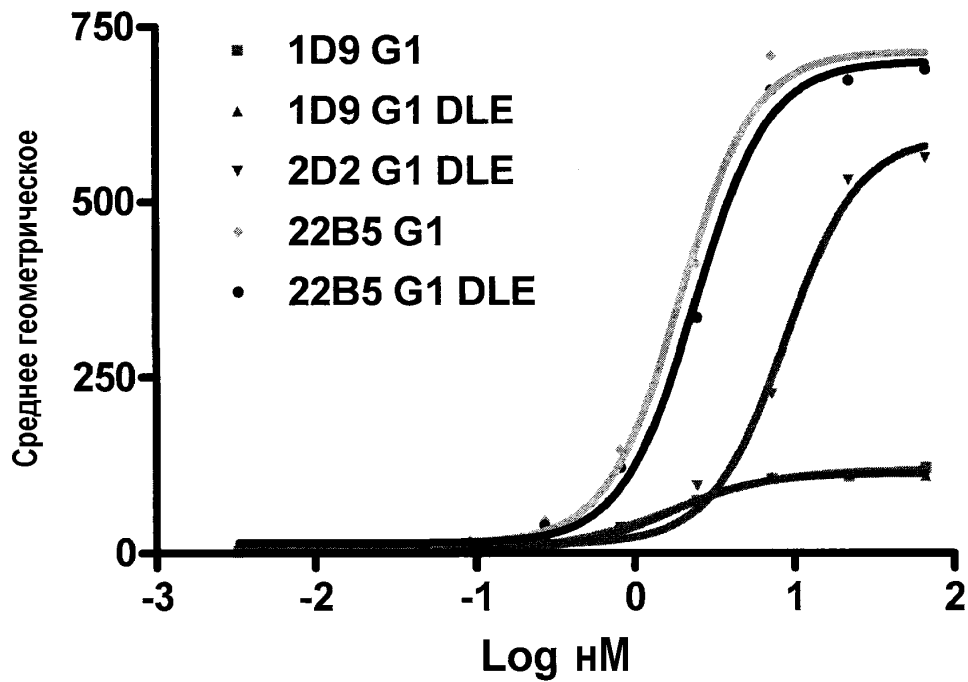
ФИГ.10В

С



ФИГ.10С

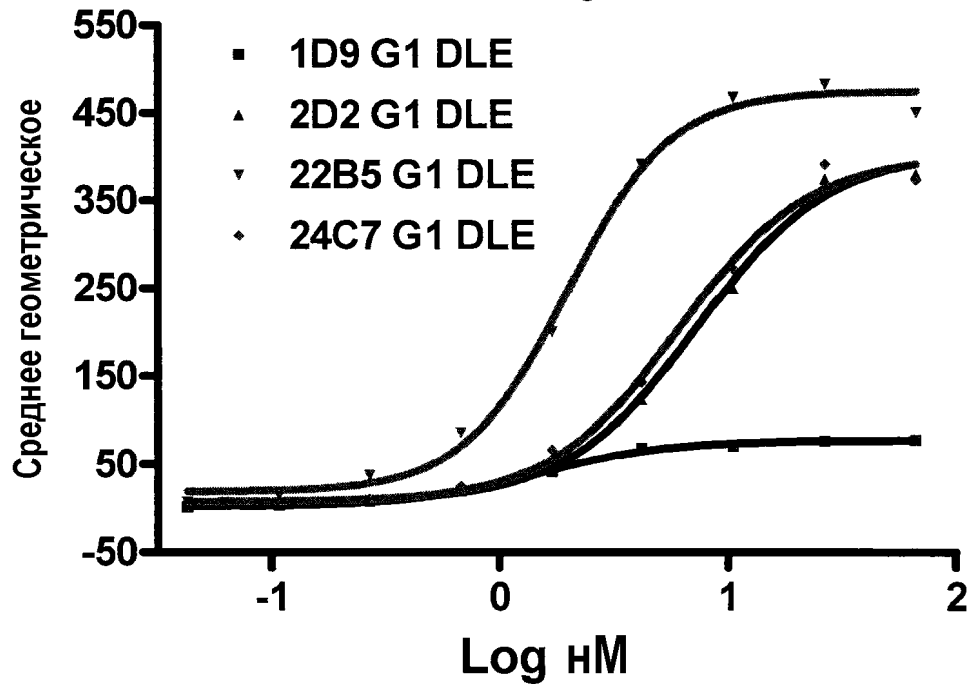
Измеренное посредством FACS связывание клонов против а5 с клетками HUVEC (030207)



mAb	1D9 G1	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1	22B5 G1 DLE
Kd (нМ)	1,69	1,68	8,78	1,95	2,42
R ²	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00

ФИГ.11

Измеренное посредством FACS связывание клонов против
а5 g1 с клетками HUVEC

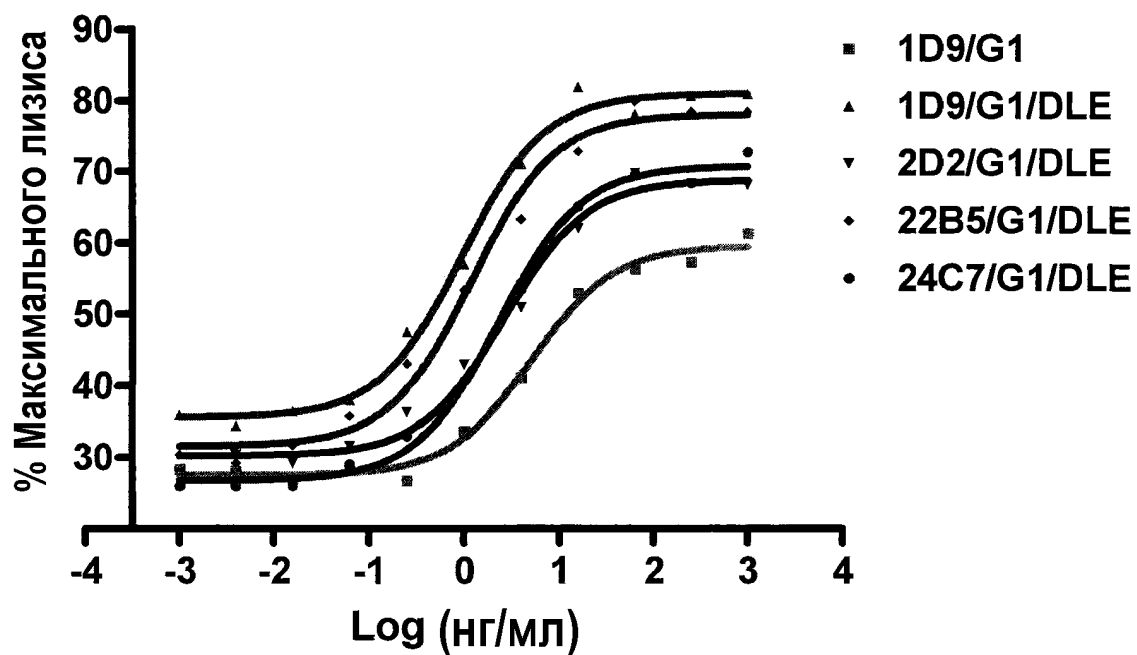


mAb	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1 DLE	24C7 G1 DLE
Kd (нМ)	1,49	7,32	1,99	6,08
R ²	1,00	1,00	1,00	0,99

ЗАМЕЧАНИЕ : 24С7 не очищен

ФИГ.11В

ADCC клонов против а5/g1 против U87MG

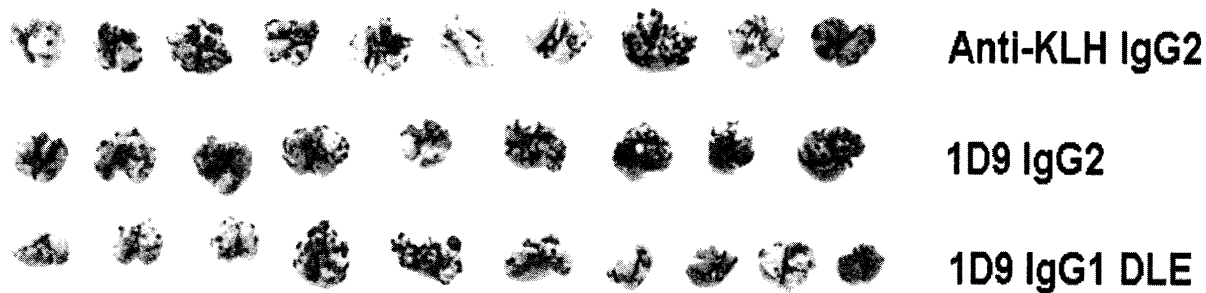


mAb	1D9/G1	1D9/G1/DLE	2D2/G1/DLE	22B5/G1/DLE	24C7/G1/DLE
EC50 (нг/мл)	5.06	0.96	2.66	1.21	2.28
R ²	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00

ЗАМЕЧАНИЕ : 24C7 не очищен

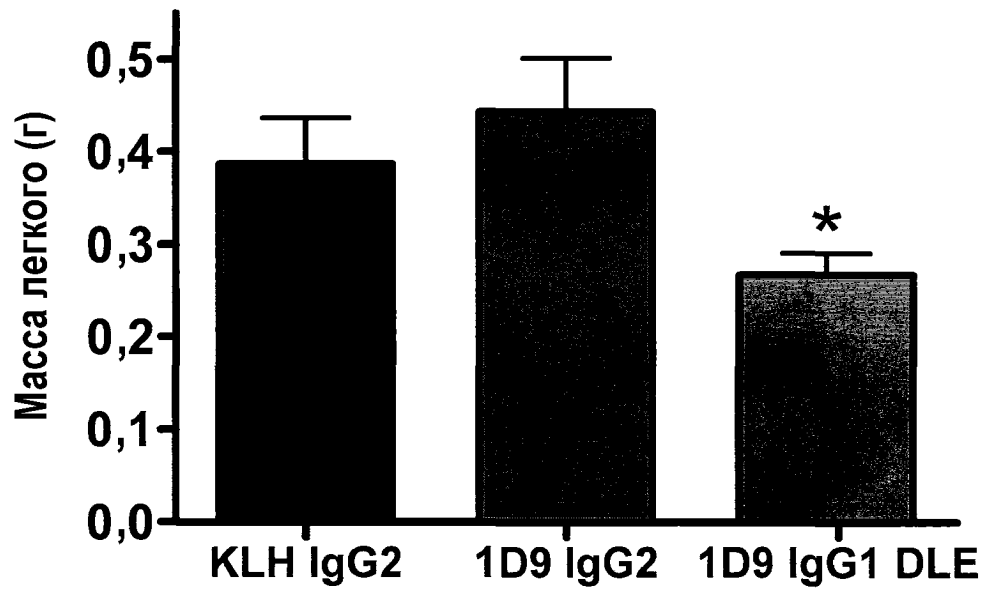
ФИГ.12

A



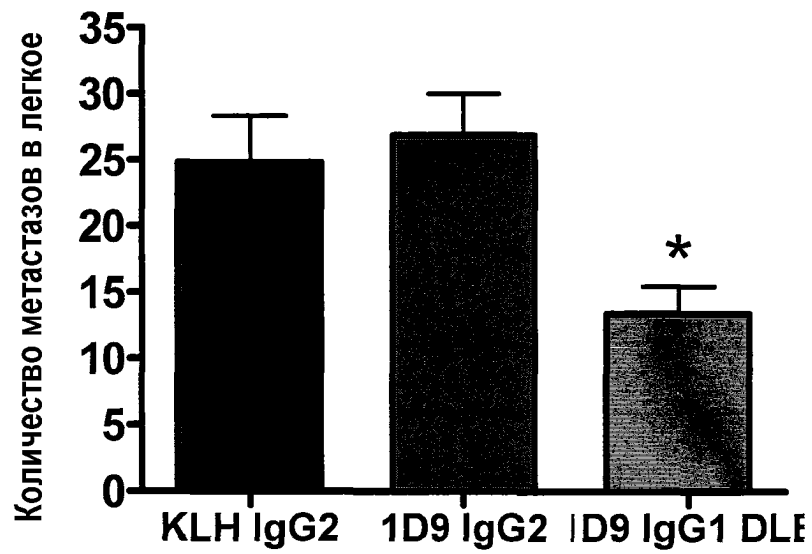
ФИГ.13А

В



ФИГ.13В

С



ФИГ.13С