

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2007116806/10, 03.10.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.10.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.10.2004 US 60/615,657

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2008 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 10.05.2011 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: КАТАОКА Н., et al. Activation of
hepatocyte growth factor/scatter factor in
colorectal carcinoma. Cancer Res., 60(21)
01.11.2000, с. 6148-6159. MIYAZAWA К., et
al. Activation of hepatocyte growth factor in the
injured tissues is mediated by hepatocyte growth
factor activator. J. Biol. Chem., 271(7),
16.02.1996, с. 3615-3618. EP 1213302,
06.12.2002.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.05.2007(86) Заявка РСТ:
US 2005/036300 (03.10.2005)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/042173 (20.04.2006)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

КИРКХОФЕР Дэниел К. (US),
ВУ Ян (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) МОДУЛЯТОРЫ АКТИВАТОРА ФАКТОРА РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой антитело, которое связывается с активатором фактора роста гепатоцитов человека (HGFA). Кроме того, представлен способ лечения заболевания, ассоциированного с нарушенной

регуляцией HGF/c-met-опосредуемого сигнала, использующий антитело. Изобретение может эффективно использоваться при лечении заболеваний, ассоциированных с регуляцией HGF/c-met-опосредуемого сигнала. 2 н.з. и 16 з.п. ф-лы, 23 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2007116806/10, 03.10.2005**(24) Effective date for property rights:
03.10.2005

Priority:

(30) Priority:
04.10.2004 US 60/615,657(43) Application published: **10.11.2008 Bull. 31**(45) Date of publication: **10.05.2011 Bull. 13**(85) Commencement of national phase: **04.05.2007**(86) PCT application:
US 2005/036300 (03.10.2005)(87) PCT publication:
WO 2006/042173 (20.04.2006)

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**KIRKKhOFER Dehniel K. (US),
VU Jan (US)**

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)

(54) MODULATORS OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and represents antibody, which is bound with human hepatocyte growth factor activator (HGFA). Also described is method of treating disease associated

with impaired regulation of HGF/c-met-mediated signal that applies antibody.

EFFECT: invention can be efficiently used in treatment of diseases, associated with regulation of HGF/c-met-mediated signal.

18 cl, 23 dwg, 1 tbl, 1 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка не является предварительной, зарегистрированной на основании раздела 1.53(b)(1) главы 37 Свода Федеральных Нормативных Актов, и притязает на приоритет на основании параграфа 119(e) раздела 35 Свода Законов США на предварительную заявку номер 60/615657, зарегистрированную 4 октября 2004 года, содержание которой полностью включено здесь посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к области молекулярной биологии и регуляции факторов роста. Более конкретно, изобретение касается модуляторов действия активатора фактора роста гепатоцитов и применения указанных модуляторов.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Фактор роста гепатоцитов (HGF) стимулирует пролиферацию клеток, миграцию, ангиогенез, выживание и морфогенез посредством активации рецепторной тирозинкиназы Met [описана в обзорах 8,9]. В дополнение к его важности в нормальной физиологии сигнальный путь HGF/Met вовлечен в инвазивный рост опухолей и метастазирование опухолей [8]. HGF обладает высоким сходством с сериновой протеазой плазминогеном и состоит из α -цепи, включающей в себя N-домен и четыре Крингл-домена, и β -цепи, гомологичной химотрипсиноподобным протеазам. Он секретируется во внеклеточный матрикс в виде неактивного одноцепочечного предшественника (pro-HGF) и для активации требует расщепления между Arg494-Val495, образуя биологически активный, связанный дисульфидными мостиками α/β -гетеродимер [10-13]. Этот шаг опосредуют pro-HGF, преобразующие сериновые протеазы, такие как активатор фактора роста гепатоцитов (HGFA) [14]. HGFA ингибируется с помощью экспрессируемых на клеточной поверхности ингибиторов Кунитца, таких как два сплайсинговых варианта ингибитора активатора фактора роста гепатоцитов HAI-1 [16-17] и HAI-1B [15], и с помощью HAI-2 [18]. HAI-2 (известный так же как плацентарный бикунин) [19] также является сильным ингибитором фактора XIa и калликреина плазмы [20], тогда как HAI-1B имеет низкую ингибиторную активность или вовсе таковой не имеет [15]. Поэтому биологическая доступность пула pro-HGF во внеклеточном матриксе регулируется активностью pro-HGF конвертаз, таких как HGFA и их ингибиторов.

Так как активация pro-HGF требует расщепления конвертазой, такой как HGFA, изменение функции HGFA и/или его взаимодействия с субстратом могло бы оказаться эффективным терапевтическим подходом. В этом отношении существует ясная необходимость идентифицировать клинически значимые факторы, способные к модулированию и/или специфичному взаимодействию с HGFA. Изобретение осуществляет эту необходимость и обеспечивает другие эффекты.

Все ссылки, цитируемые здесь, включающие патентные заявки и публикации, полностью включены посредством ссылки.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение связано со способами, композициями, наборами и изделиями для модулирования функции активатора фактора роста гепатоцитов (HGFA), таким образом модулируя физиологические эффекты действия HGFA. Модулирование функции HGFA может быть осуществлено посредством применения антител, как описано здесь.

В изобретении предоставлены молекулы-модуляторы, пригодные к применению для модулирования функции HGFA. В одном варианте осуществления изобретения

действие HGFA изменяют путем ингибирования активности HGFA (например, протеолитической активности). В общем, молекулы-модуляторы включают в себя антитело, как описано здесь. Молекулы-модуляторы способны к осуществлению модулирования или прямым образом (например, посредством связывания с HGFA и

5 препятствования протеолитической активности HGFA), или опосредованно (например, посредством нацеливания/направления действующего агента по отношению к HGFA в ткань или клетку, где действующий агент способен препятствовать протеолитической активности HGFA). В одном варианте осуществления изобретения предоставлена

10 молекула-антагонист, содержащая антитело, которое связывается с HGFA. В одном варианте осуществления изобретения связывание антагониста с HGFA препятствует протеолитической активности HGFA. В одном осуществлении изобретения связывание антагониста с HGFA препятствует активации HGF с помощью HGFA. В одном

15 варианте осуществления изобретения антитело связывается с активным участком HGFA. В одном варианте осуществления изобретения антитело связывается с HGFA в месте, отличном от активного участка HGFA (например, на внешнем участке). В одном варианте осуществления изобретения связывание антитела с HGFA на участке, отличном от активного участка HGFA, ингибирует взаимодействие HGFA с молекулой

20 его субстрата. В одном варианте осуществления изобретения связывание антитела и HGFA на участке, отличном от активного участка HGFA, ингибирует протеолитическую активность HGFA.

В одном аспекте изобретение связано с антагонистами, которые разрушают сигнальный путь HGF/c-met. Например, изобретение связано с молекулой, которая

25 ингибирует расщепление proHGF с помощью HGFA (например, расщепление по положению R494-V495). Молекула может проявлять ингибиторное действие любым количеством путей, включая, без ограничения, связывание с HGFA на активном участке и/или участке, отличном от активного участка (например, внешнем участке),

30 таком, что расщепление proHGF с помощью HGFA ингибируется. Молекула может связывать HGFA в составе комплекса или нет. Молекула может проявлять ингибиторное действие, также препятствуя одной или нескольким стадиям процесса активации HGF. Например, в одном варианте осуществления изобретения молекула-антагонист согласно изобретению связывает комплекс HGFA-proHGF, так, что

35 ингибируется расщепление proHGF. В одном варианте осуществления изобретения связывание молекулы с proHGF или HGFA (отдельно или в составе комплекса) ингибирует высвобождение HGF после расщепления под действием HGFA. В одном варианте осуществления изобретения молекула-антагонист согласно изобретению не

40 ингибирует связывание HGF с c-met. Например, в одном варианте осуществления изобретения молекула-антагонист согласно изобретению не является антителом или его фрагментом, имея похожую ингибиторную и/или связывающую способность, как антитело, произведенное гибридной линией клеток, помещенной под номером

45 доступа Американской коллекции клеточных культур ATCC HB-11894 (гибридома 1A3.3.13) или HB-11895 (гибридома 5D5.11.6). В одном варианте осуществления изобретения молекула-антагонист согласно изобретению ингибирует биологические функции, связанные с активацией HGF/c-met.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим участок CDR-H1 (CDR-участок, определяющий комплементарность), содержащий последовательность с

50 идентификационным номером последовательности SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 или 42. В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим участок CDR-H2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4, 7, 10, 13,

(iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 21;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 23.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 25;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 26.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 29.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 30;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 31;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 36;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 37;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 42;
- (ii) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 43;
- (iii) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44.

Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-44 пронумерованы в соответствии с отдельными CDR (то есть H1, H2 или H3), как указано на фиг.1, нумерацией, согласующейся с системой нумерации Kabat, как описано ниже.

В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению содержит CDR-последовательность(и) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности из H1 (SEQ ID NO: 71-84), H2 (SEQ ID NO: 85-98) и/или H3 (SEQ ID

NO: 99-112) последовательностей для каждого клона, показанного на фиг. 1B, 1C и 1D.

В одном аспекте изобретение связано с антителами, содержащими CDR-последовательности тяжелой цепи, как показано на фиг. 1A, B, C и D. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти антитела дополнительно содержат

5 варьируемый домен легкой цепи гуманизированного антитела 4D5 (huMAb4D5-8) (торговое название HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (также упоминаемого в патенте США № 6407213 и статье Lee et al., J.Mol.Biol. (2004), 340(5): 1073-93), как показано в SEQ ID NO:45, ниже.

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 15 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr (SEQ ID NO:45)

В одном варианте осуществления изобретения последовательность варьируемого домена легкой цепи антитела huMAb4D5-8 изменена в одном или нескольких

20 положениях 30, 66 и 91 (Asn, Arg и His соответственно, как указано полужирным шрифтом/курсивом выше). В одном варианте осуществления изобретения измененная последовательность huMAb4D5-8 содержит Ser в положении 30, Gly в положении 66 и/или Ser в положении 91. Соответственно в одном варианте осуществления

25 изобретения антитело согласно изобретению содержит варьируемый домен легкой цепи, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO:54, ниже.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 30 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 54)

35 (CDR-остатки подчеркнуты)

Замещенные остатки относительно huMAb4D5-8 указаны выше полужирным шрифтом/курсивом.

Антитела согласно изобретению могут дополнительно содержать любые

40 подходящие последовательности каркасного участка и/или варьируемого домена легкой цепи при условии, что сохраняется способность связывать HGFA. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитела дополнительно содержат консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы III тяжелой цепи человека. В одном варианте этих антител консенсусная последовательность

45 каркасного участка содержит замены в положениях 71, 73 и/или 78. В некоторых вариантах этих антител в положении 71 находится А, в 73 находится Т и/или 78 является А. В одном варианте осуществления изобретения эти антитела содержат последовательности каркасного участка варьируемого домена тяжелой цепи гуманизированного антитела 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South

50 San Francisco, CA, USA) (также упоминаемого в патенте США № 6407213 и статье Lee et al., J.Mol.Biol. (2004), 340(5):1073-93). В одном варианте осуществления изобретения гуманизированное 4D5-8-антитело является таким, как описано в патенте США

№ 6407213. В одном варианте осуществления изобретения эти антитела дополнительно содержат последовательность каркасного участка легкой цепи κI человека. В одном варианте осуществления изобретения эти антитела содержат последовательности

5 (SEQ ID NO:45) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (также упоминаемого в патенте США № 6407213 и статье Lee et al., J.Mol.Biol. (2004), 340(5): 1073-93), или измененный вариант его, как показано в SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению

10 содержит переменный домен тяжелой цепи, где последовательность каркасного участка (FR) содержит последовательности SEQ ID NO: 46, 47, 48 и 49 (FR1, 2, 3 и 4, соответственно) и CDR H1, H2 и H3 последовательности, как показано на фиг.1A, B, C и/или D. В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно

15 изобретению содержит переменный домен легкой цепи, где последовательность каркасного участка содержит последовательность SEQ ID NO:50, 51, 52 и 53 (FR1, 2, 3 и 4, соответственно) и CDR L1, L2 и L3 последовательности, как показано в SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению

20 содержит переменный домен тяжелой цепи, где последовательность каркасного участка содержит последовательность SEQ ID NO: 59, 60, 61 и 62 (FR1, 2, 3 и 4 соответственно) (Фиг. 1E) и CDR H1, H2 и H3, как показано на фиг.1. В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению содержит

25 переменный домен легкой цепи, где последовательность каркасного участка содержит последовательность SEQ ID NO: 55, 56, 57 и 58 (FR1, 2, 3 и 4 соответственно) (Фиг. 1E) и CDR L1, L2 и L3 последовательностей, как показано в SEQ ID NO:54.

В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению

30 содержит переменный домен тяжелой цепи, где последовательность каркасного участка содержит последовательность SEQ ID NO: 67, 68, 69 и 70 (FR1, 2, 3 и 4 соответственно) (Фиг. 1F) и CDR H1, H2 и H3-последовательности, как показано на Фиг. 1A, B, C и/или D. В одном варианте осуществления изобретения антитело

35 согласно изобретению содержит переменный домен легкой цепи, где последовательность каркасного участка содержит последовательность SEQ ID NO: 63, 64, 65 и 66 (FR1, 2, 3 и 4 соответственно) (Фиг. 1F) и CDR L1, L2 и L3 последовательности, как показано в SEQ ID NO: 54.

В одном аспекте изобретение связано с антителом, которое конкурирует с любым из вышеупомянутых антител за связывание с HGFA. В одном аспекте изобретение

40 связано с антителом, которое связывает такой же эпитоп на HGFA, как любое из вышеупомянутых антител. В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению является аффинно созревшим, гуманизированным, химерным или человеческим. В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно

45 изобретению является фрагментом антитела (как описано здесь) или в основном полноразмерным антителом. В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению содержит Fc-фрагмент дикого типа или его варианты. В одном варианте осуществления изобретения антитело согласно изобретению является IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE или IgD.

В одном аспекте молекула-антагонист согласно изобретению связана с токсином, таким как цитотоксичный агент. Эти молекулы/вещества могут быть составлены или

50 использованы в комбинации с аддитивными/усиливающими агентами, такими как радиация и/или химиотерапевтический агент.

Изобретение также связано со способами и композициями, применимыми для изменения болезненных состояний, связанных с нарушенной регуляцией сигнальной оси HGF/c-met. Таким образом, в одном аспекте изобретение связано со способом модулирования активации c-met у субъекта указанным способом, 5 предусматривающим введение субъекту молекулы-модулятора согласно изобретению, которая ингибирует расщепление proHGF под действием HGFA, на основании чего модулируется активация c-met. В одном аспекте изобретение связано со способом лечения патологического состояния, связанного с активацией c-met у субъекта, 10 указанным способом, предусматривающим введение субъекту молекулы-модулятора согласно изобретению, которая ингибирует расщепление proHGF под действием HGFA, на основании чего ингибируется активация c-met. В одном варианте осуществления изобретения молекула-модулятор согласно изобретению является антителом, которое связывается с HGFA.

15 Сигнальный путь HGF/c-met вовлечен во множество биологических и физиологических функций, например, стимуляцию клеточного роста (например, клеточную пролиферацию, выживаемость клеток, миграцию клеток, клеточный морфогенез) и ангиогенез. Таким образом, в другом аспекте изобретение связано со 20 способом ингибирования c-met-активированного клеточного роста (например, пролиферации и/или выживаемости) указанным способом, включающим в себя контактирование клетки или ткани с антагонистом согласно изобретению, посредством чего ингибируется пролиферация клеток, связанная с активацией c-met. В еще одном аспекте изобретение связано со способом ингибирования ангиогенеза, 25 включающим в себя введение в клетку, ткань и/или организм субъекта с состоянием, связанным с аномальным ангиогенезом, антагониста согласно изобретению, посредством чего ингибируется ангиогенез.

В одном аспекте изобретение связано с применением молекулы-модулятора 30 согласно изобретению при получении лекарственного препарата для терапевтического и/или профилактического лечения болезни, такой как рак, опухоль, нарушение клеточной пролиферации, иммунное (такое как аутоиммунное) нарушение и/или нарушение, связанное с ангиогенезом.

В одном аспекте изобретение связано с применением нуклеиновой кислоты 35 согласно изобретению при получении лекарственного препарата для терапевтического и/или профилактического лечения болезни, такой как рак, опухоль, нарушение клеточной пролиферации, иммунное (такое как аутоиммунное) нарушение и/или нарушение, связанное с ангиогенезом.

40 В одном аспекте изобретение связано с применением экспрессирующего вектора согласно изобретению при получении лекарственного препарата для терапевтического и/или профилактического лечения болезни, такой как рак, опухоль, нарушение клеточной пролиферации, иммунное (такое как аутоиммунное) нарушение и/или нарушение, связанное с ангиогенезом.

45 В одном аспекте изобретение связано с применением клетки-хозяина согласно изобретению при получении лекарственного препарата для терапевтического и/или профилактического лечения болезни, такой как рак, опухоль, нарушение клеточной пролиферации, иммунное (такое как аутоиммунное) нарушение и/или нарушение, 50 связанное с ангиогенезом.

В одном аспекте изобретение связано с применением изделия согласно изобретению при получении лекарственного препарата для терапевтического и/или профилактического лечения болезни, такой как рак, опухоль, нарушение клеточной

пролиферации, иммунное (такое как аутоиммунное) нарушение и/или нарушение, связанное с ангиогенезом.

В одном аспекте изобретение связано с применением набора согласно изобретению при получении лекарственного препарата для терапевтического и/или профилактического лечения болезни, такой как рак, опухоль, нарушение клеточной пролиферации, иммунное (такое как аутоиммунное) нарушение и/или нарушение, связанное с ангиогенезом.

В одном аспекте изобретение связано со способом ингибирования с-met-активированной клеточной пролиферации указанным способом, включающим в себя контактирование клетки или ткани с эффективным количеством молекулы-модулятора согласно изобретению, посредством чего ингибируется пролиферация клеток, связанная с активацией с-met.

В одном аспекте изобретение связано со способом лечения патологического состояния, связанного с нарушенной регуляцией активации с-met у субъекта указанным способом, включающим в себя введение субъекту эффективного количества молекулы-модулятора согласно изобретению, посредством чего указанное состояние излечивается.

В одном аспекте изобретение связано со способом ингибирования роста клетки, которая экспрессирует с-met или фактор роста гепатоцитов, или и то, и другое, включающим в себя приведение указанной клетки в контакт с молекулой-модулятором согласно изобретению, таким образом вызывая ингибирование роста указанной клетки. В одном варианте осуществления изобретения клетка взаимодействует с HGF, экспрессируемым другой клеткой (например, посредством паракринного механизма).

В одном аспекте изобретение связано со способом терапевтического лечения представителя семейства млекопитающих, имеющего раковую опухоль, содержащую клетку, которая экспрессирует с-met или фактор роста гепатоцитов, или же и то, и другое, причем способ включает в себя введение указанному млекопитающему эффективного количества молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом эффективно излечивая указанное млекопитающее. В одном варианте осуществления изобретения клетка взаимодействует с HGF, экспрессируемым другой клеткой (например, посредством паракринного механизма).

В одном аспекте изобретение связано со способом лечения или предотвращения нарушения клеточной пролиферации, связанного с увеличенной экспрессией или активностью HGFA, включающим в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом эффективно излечивая или предотвращая указанное нарушение клеточной пролиферации. В одном варианте осуществления изобретения указанным нарушением пролиферации является рак.

В одном аспекте изобретение связано со способом лечения или предотвращения нарушения клеточной пролиферации, связанной с увеличенной экспрессией или активностью с-met или фактора роста гепатоцитов, или их обоих, включающим в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом эффективно излечивая или предотвращая указанное нарушение клеточной пролиферации. В одном из вариантов осуществления изобретения указанным нарушением пролиферации является рак.

В одном аспекте изобретение связано со способом ингибирования роста клетки, где

рост указанной клетки, по меньшей мере частично, зависит от потенцирующего действия HGFA на рост, включающим в себя контактирование указанной клетки с эффективным количеством молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом ингибируя рост указанной клетки. В одном варианте осуществления изобретения клетка взаимодействует с HGF, экспрессируемым другой клеткой (например, посредством паракринного механизма).

В одном аспекте изобретение связано со способом ингибирования роста клетки, где рост указанной клетки, по меньшей мере частично, зависит от потенцирующего действия c-met или фактора роста гепатоцитов, или их обоих на рост, включающим в себя контактирование указанной клетки с эффективным количеством молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом ингибируя рост указанной клетки. В одном варианте осуществления изобретения клетка взаимодействует с HGF, экспрессируемым другой клеткой (например, посредством паракринного механизма).

В одном аспекте изобретение связано со способом терапевтического лечения опухоли у представителя семейства млекопитающих, где рост указанной опухоли, по меньшей мере частично, зависит от потенцирующего действия HGFA на рост, включающим в себя контактирование указанной клетки с эффективным количеством молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом эффективно излечивая указанную опухоль. В одном варианте осуществления изобретения клетка взаимодействует с HGF, экспрессируемым другой клеткой (например, посредством паракринного механизма).

В одном аспекте изобретение связано со способом терапевтического лечения опухоли у представителя семейства млекопитающих, где рост указанной опухоли, по меньшей мере частично, зависит от потенцирующего действия c-met или фактора роста гепатоцитов, или их обоих на рост, включающим в себя контактирование указанной клетки с эффективным количеством молекулы-модулятора согласно изобретению, таким образом эффективно излечивая указанную опухоль. В одном варианте осуществления изобретения клетка взаимодействует с HGF, экспрессируемым другой клеткой (например, посредством паракринного механизма).

Способы согласно изобретению могут быть использованы для воздействия на любое патологическое состояние, например, клеток и/или тканей, ассоциированное с нарушенной регуляцией сигнального пути HGF/c-met, например, через увеличенную активность HGF, связанную с активацией HGF под действием HGFA. В одном варианте осуществления изобретения клетка, которая является мишенью в способе согласно изобретению, представляет собой раковую клетку. Например, раковая клетка может быть выбрана из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, клетки рака ободочной и прямой кишки, клетки рака легкого, клетки папиллярной карциномы (например, щитовидной железы), клетки рака прямой кишки, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака яичника, клетки рака шейки матки, клетки рака центральной нервной системы, клетки остеогенной саркомы, клетки почечной саркомы, клетки гепатоцитарной карциномы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака предстательной железы, клетки карциномы желудка, клетки плоскоклеточной карциномы головы и шеи, клетки меланомы и лейкозной клетки. В одном варианте осуществления изобретения клетка, которая является мишенью в способе согласно изобретению, представляет собой гиперпролиферативную и/или гиперплазивную клетку. В одном варианте осуществления изобретения клетка, которая является мишенью в способе согласно изобретению, представляет собой диспластическую клетку. В еще одном варианте осуществления изобретения клетка, которая является

мишенью в способе согласно изобретению, представляет собой метастатическую клетку.

Способы согласно изобретению могут, кроме того, содержать дополнительные лечебные стадии. Например, в одном варианте осуществления изобретения способ дополнительно содержит стадию, где клетка-мишень и/или ткань-мишень (например, раковая клетка) подвергается радиационному воздействию или действию химиотерапевтического агента.

Как описано здесь, активация HGF/c-met является важным биологическим процессом, нарушение регуляции которого приводит к многочисленным патологическим состояниям. Соответственно в одном варианте способов согласно изобретению клетка, которая является мишенью (например, раковая клетка), представляет собой клетку, в которой активация HGF/c-met усилена по сравнению с нормальной клеткой из той же ткани. В одном варианте осуществления изобретения способ согласно изобретению вызывает смерть клеток-мишеней. Например, контакт с молекулой-модулятором согласно изобретению может приводить к неспособности клетки передавать сигнал через сигнальный путь c-met, что приводит к смерти клетки.

Нарушенная регуляция активации c-met (и, следовательно, передачи сигнала) может происходить в результате ряда изменений в клетке, включая, например, сверхэкспрессию HGF (лиганд, узнаваемый c-met), и/или HGFA, и/или увеличенную активацию HGF под действием HGFA. Соответственно в некоторых вариантах осуществления изобретения способ согласно изобретению включает в себя нацеливание на ткань, в которой один или несколько факторов из HGFA, c-met и фактора роста гепатоцитов сильнее экспрессируются и/или присутствуют в большем количестве (например, рак) по сравнению с нормальной тканью того же происхождения. Клетки, экспрессирующие HGF или c-met, могут регулироваться HGFA из ряда источников, то есть по аутокринному или паракринному пути. Например, в одном варианте способов согласно изобретению клетка-мишень контактирует/связана с фактором роста гепатоцитов, активированным под действием HGFA, экспрессированного другой клеткой (например, посредством паракринного механизма). Указанная другая клетка может принадлежать к тому же или другому типу ткани. В одном варианте осуществления изобретения клетка-мишень контактирует/связана с HGF, активированным под действием HGFA, экспрессированного самой клеткой-мишенью (например, через аутокринный механизм/петлю).

В одном из аспектов изобретение связано с композициями, содержащими одну или несколько молекул-модуляторов согласно изобретению и носитель. В одном варианте осуществления изобретения носитель является фармацевтически приемлемым.

В одном из аспектов изобретение связано с нуклеиновыми кислотами, кодирующими молекулу-модулятор согласно изобретению. В одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота согласно изобретению кодирует молекулу-модулятор, которая является или содержит антитело или его фрагмент.

В одном из аспектов изобретение связано с векторами, содержащими нуклеиновую кислоту согласно изобретению.

В одном из аспектов изобретение связано с клетками-хозяевами, содержащими нуклеиновую кислоту или вектор согласно изобретению. Вектор может быть любого типа, например, рекомбинантный вектор, такой как экспрессирующий вектор. Любые из множества клеток-хозяев могут быть использованы. В одном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является прокариотической клеткой,

например, *E.coli*. В одном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является эукариотической клеткой, например, клеткой млекопитающего, такой как клетка яичников китайского хомячка (СНО).

5 В одном из аспектов изобретение связано со способами изготовления молекулы-модулятора согласно изобретению. Например, изобретение связано со способом изготовления молекулы-модулятора, которая является или содержит антитело (или его фрагмент), включающим в себя экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора согласно изобретению, кодирующего указанное антитело
10 (или его фрагмент), и получение указанного антитела.

В одном из аспектов изобретение связано с изделием, содержащим упаковку; и композицией, содержащейся в упаковке, где композиция содержит одну или несколько молекул-модуляторов согласно изобретению. В одном варианте осуществления изобретения композиция содержит нуклеиновую кислоту согласно изобретению. В
15 одном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая молекулу-модулятор, дополнительно содержит носитель, который в некоторых вариантах осуществления изобретения является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления изобретения изделие согласно изобретению дополнительно содержит инструкции для введения композиции (например, для молекулы-модулятора) субъекту.
20

В одном аспекте изобретение содержит набор, содержащий первую упаковку, содержащую композицию, содержащую одну или несколько молекул-модуляторов согласно изобретению; и вторую упаковку, содержащую буферный раствор. В одном варианте осуществления изобретения буферный раствор является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая молекулу-модулятор, дополнительно содержит носитель, который в некоторых вариантах осуществления изобретения является фармацевтически приемлемым. В
25 одном варианте осуществления изобретения набор дополнительно содержит инструкции по введению композиции (например, молекулы-модулятора) субъекту.
30

В одном из аспектов изобретение связано со способом диагностики болезни, включающим в себя определение уровня HGFA в испытуемом образце клеток ткани посредством взаимодействия образца с антителом согласно изобретению, и в результате HGFA, связанный с антителом, указывает на присутствие и/или
35 количество HGFA в образце. В другом аспекте изобретение связано со способом определения того, находится ли индивид под угрозой болезни, включающим в себя определение уровня HGFA в испытуемом образце клеток ткани посредством взаимодействия образца с антителом согласно изобретению, и, таким образом,
40 определение количества HGFA, присутствующего в образце, где более высокий уровень HGFA в испытуемом образце по сравнению с контрольным образцом, содержащим нормальную ткань из клеток того же происхождения, что и испытуемый образец, является симптомом того, что индивид находится под угрозой болезни. В одном варианте способов согласно изобретению уровень HGFA определяют на основе
45 количества полипептида HGFA, указанного при помощи количества HGFA, связанного антителом в испытуемом образце. Антитело, используемое в способе, может необязательно быть помечено для его обнаружения, прикреплено к твердофазному носителю и пр.

50 В одном из аспектов изобретение связано со способом связывания антитела согласно изобретению и HGFA, присутствующего в физиологических жидкостях, например в крови.

В еще одном аспекте изобретение направлено на способ связывания антитела

согласно изобретению с клеткой, которая экспрессирует HGFA и/или отвечает на HGFA, где способ включает в себя контактирование указанной клетки с указанным антителом в условиях, которые подходят для связывания антитела и HGFA и допускают связывание между ними. В одном варианте осуществления изобретения связывание указанного антитела и HGFA на клетке ингибирует биологическую функцию HGFA. В одном варианте осуществления изобретения указанное антитело не ингибирует взаимодействие HGFA с молекулой его субстрата. В одном варианте осуществления изобретения указанное антитело связывается с молекулой HGFA на клетке и ингибирует связывание другой молекулы (такой как pro-HGF) с молекулой HGFA.

В одном аспекте изобретение связано со способом нацеливания терапевтического агента на HGFA-ассоциированную ткань, включающим в себя введение хозяину указанного терапевтического агента в связанном с антителом согласно изобретению виде, посредством чего агент нацеливается на HGFA-ассоциированную ткань в организме хозяина. В одном варианте осуществления изобретения антитело, которое связывается с HGFA, способно специфически связываться с HGFA на клетке (или *in vitro*, или *in vivo*), например, когда HGFA присутствует на поверхности клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг.1 (А) Последовательности CDR-петель тяжелых цепей анти-HGFA-антител. Фигура отображает CDR-последовательности тяжелых цепей, H1, H2 и H3.

Последовательностью легкой цепи является последовательность гуманизированного 4D5-антитела (см. Lee et al., выше). Нумерация последовательностей является следующей: клон 33 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:3; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:4; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:5); клон 35 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:6; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:7; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:8); клон 37 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:9; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:10; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:11); клон 39 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:12; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:13; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:14); клон 42 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:15; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:16; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:17); клон 49 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:18; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:19; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:20); клон 58 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:21; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:22; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:23); клон 61 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:24; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:25; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:26); клон 74 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:27; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:28; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:29); клон 75 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:30; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:31; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:32); клон 86 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:33; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:34; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:35); клон 90 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:36; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:37; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:38); клон 91 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:39; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:40; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:41); клон 95 (CDRH1 соответствует SEQ ID NO:42; CDRH2 соответствует SEQ ID NO:43; CDRH3 соответствует SEQ ID NO:44). Положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat, как описано ниже. Значения IC50 также указаны в последней (справа) колонке.

(B), (C) и (D) Последовательности CDR-петель тяжелых цепей анти-HGFA-антител.

(E) и (F) Примерные последовательности каркасных участков. (E)

Последовательности каркасного участка huMAb4D5-8. (F) Последовательности каркасного участка huMAb4D5-8, содержащие модификации.

Фиг.2. Ингибирование HGFA-опосредованной активации proHGF посредством анти-HGFA-антителами. HGFA инкубировали с меченным ^{125}I proHGF и анти-HGFA-антителами 4 часа при 37°C. Концентрации в реакционной смеси равнялись 50 мкг/мл proHGF, 2 нМ HGFA и 0,1 мг/мл (0,67 мкМ) антител. Аликвоты анализировали с помощью ДСН-ПААГ в восстановительных условиях. Растворимый HAI-1B (sHAI-1B) использовали в качестве контроля ингибитора в конечной концентрации 1 мкМ. А. Дорожка 1: (t=0) соответствует аликвоте, отобранной в начале реакции, дорожка 2: в отсутствие ингибитора, дорожка 3: в присутствии sHAI-1B (1 мкМ), дорожка 4: клон №33, дорожка 5: №35, дорожка 6: №39, дорожка 7: №49, дорожка 8: №74, дорожка 9: №61. В. дорожка 1: №42, дорожка 2: №91, дорожка 3: 58, дорожка 4: №37, дорожка 5: №75, дорожка 6: №90, дорожка 7: №86, дорожка 8: №95.

Фиг.3. Сильное ингибирование HGFA-опосредованного преобразования proHGF с помощью антитела №58. Три различных концентрации антитела №58 и неблокирующего антитела №49 были использованы в экспериментах по преобразованию меченного ^{125}I proHGF, проведенных, как описано на фиг. 1. Дорожка 1: (t=0) соответствует аликвоте, отобранной в начале реакции, дорожка 2: в отсутствие ингибитора, дорожка 3: в присутствии sHAI-1B (1 мкМ), дорожка 4: в присутствии АТ №49 с концентрацией 0,67 мкМ, дорожка 5: 0,13 мкМ АТ №49, дорожка 6: 0,03 мкМ АТ №49, дорожка 7: 0,67 мкМ АТ №58, дорожка 8: 0,13 мкМ АТ №58, дорожка 9: 0,03 мкМ АТ №58.

Фиг.4. Концентрационнозависимое ингибирование амидолитической активности HGFA анти-HGFA-антителами 58 и 75. Различные концентрации антител инкубировали с HGFA (конечная концентрация 5 нМ) в буфере HBSA в течение 20 мин при комнатной температуре. После добавления Spectrozyme®fVIIa (конечная концентрация 200 мкМ, $K_m=200\text{мкМ}$) линейные скорости активации субстрата измеряли на кинетическом устройстве для считывания микропланшетов. Ингибирование ферментативной активности выражено как фракционная активность (v_i/v_o) от неингибируемой активности.

Фиг.5. Ингибирование амидолитической активности HGFA посредством IV-49C и низкомолекулярного связующего вещества/ингибитора. Различные концентрации ингибиторов инкубировали с HGFA (2,5 нМ для IV-49C и 5 нМ для низкомолекулярного ингибитора соответственно) в HBSA-буфере в течение 20 мин при комнатной температуре. Ингибирование активации под действием Spectrozyme®fVIIa измеряли, как описано на фиг.4. А. Ингибирование с помощью домена Кунитца ингибитора IV-49C (закрашенные круги) по сравнению со специфическим ингибитором фактора XIIa трипсиновым ингибитором из кукурузы (незакрашенные круги). В. Ингибирование с помощью низкомолекулярного ингибитора (закрашенные треугольники).

Фиг. 6. Измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса связывания HGFA анти-HGFA-антителами №58 и №75. Анти-HGFA-антитела (полноразмерные IgG1) были иммобилизованы на чипах BIAcore, и результаты связывания были собраны для различных концентраций HGFA. Для изучения конкурентного связывания HGFA (70 нМ) инкубировали с различными концентрациями sHAI-1B, IV-49C или низкомолекулярного вещества, связывающего активный участок. А-D: Связывание HGFA с антителом №58 (А) в отсутствие ингибитора или в присутствии (В) sHAI-1B, (С) IV-49C и (D) низкомолекулярного

вещества, связывающего активный участок. Е-Н: Связывание HGFA с антителом №75 (Е) в отсутствие ингибитора или в присутствии (F) sHAI-1B, (G) IV-49C и (H) низкомолекулярного вещества, связывающего активный участок.

Фиг. 7. Последовательности человеческой (верхняя строка; SEQ ID NO:1) и мышьиной (нижняя строка; SEQ ID NO:2) белковых последовательностей HGFA.

Фиг. 8. Таблица, в которой приведены данные, относящиеся к ингибированию ферментативной активности HGFA различными анти-HGFA-антителами.

Фиг. 9. Таблица, в которой приведены данные, относящиеся к связыванию HGFA различными анти-HGFA-антителами.

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение предоставляет способы, композиции, наборы и изделия, содержащие модуляторы действия активатора фактора роста гепатоцитов, включая способы применения таких модуляторов.

Подробные данные этих способов, композиций, наборов и изделий предоставлены здесь.

Общие методики.

При практическом осуществлении настоящего изобретения будут использованы, если не указано особо, обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные технологии), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые входят в компетенцию специалистов в данной области. Такие методики исчерпывающе описаны в литературе, например, “Molecular Cloning: A Laboratory manual”, second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M.J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R.I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F.M. Ausubel et al., eds., 1987 and periodic updates); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994), “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988); “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001).

Определения

Используемый здесь термин “активатор фактора роста гепатоцитов”, или “HGFA”, охватывает последовательности нативных полипептидов, полипептидных вариантов и фрагменты последовательностей нативных полипептидов, полипептидных вариантов (которые в дальнейшем определены здесь), которые способны к расщеплению proHGF способом, подобным действию HGFA дикого типа. Описанными здесь полипептидами HGFA могут быть полипептиды, выделенные из ряда источников, таких как различные человеческие ткани, или из другого источника, или получены с помощью синтеза или рекомбинантных методов. Здесь термины «HGFA», «полипептид HGFA», «HGFA фермент» и «HGFA белок» также включают в себя варианты полипептида HGFA.

«Последовательность нативных полипептидов HGFA» содержит полипептид, имеющий такую же аминокислотную последовательность, как соответствующий полипептид HGFA, полученный из природных источников (например, последовательности, показанные на фиг.7). В одном варианте осуществления изобретения последовательность нативного полипептида HGFA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 (см. фиг.7; верхнюю последовательность). Такие последовательности нативных полипептидов HGFA могут быть выделены из природных источников или получены синтетическими или рекомбинантными средствами. Термин «последовательность нативного полипептида HGFA» охватывает, в частности, встречающиеся в природе укороченные

или секретируемые формы конкретного полипептида HGFA (например, последовательности внеклеточного домена), встречающиеся в природе вариации (например, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга) и встречающиеся в природе аллельные варианты полипептида.

«Вариант полипептида HGFA» или его вариации означают полипептид HGFA, в общем, активный полипептид HGFA, как определено здесь, имеющий идентичность по аминокислотной последовательности по меньшей мере около 80% с любой нативной последовательностью полипептида HGFA, как раскрыто здесь. Такие варианты полипептидов HGFA включают, например, полипептиды HGFA, где один или несколько аминокислотных остатков добавлены или удалены с N- или C-конца нативной аминокислотной последовательности. Обычно полипептидный вариант HGFA будет иметь, по меньшей мере, примерно, 80% идентичности по аминокислотной последовательности, в качестве альтернативы, по меньшей мере, примерно, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по аминокислотной последовательности по отношению к последовательности нативной последовательности полипептида HGFA, как раскрыто здесь. Обычно варианты полипептидов HGFA имеют протяженность по меньшей мере 10 аминокислот в длину, в качестве альтернативы, по меньшей мере, примерно, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 аминокислот в длину или больше. Необязательно варианты полипептидов HGFA будут иметь не более чем одну замену консервативной аминокислоты по сравнению с последовательностью нативного полипептида HGFA, в качестве альтернативы не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 взамен консервативных аминокислот по сравнению с последовательностью нативного полипептида HGFA.

«Процент (%) идентичности по аминокислотной последовательности» по отношению к пептидной или полипептидной последовательности определяется как процентное соотношение аминокислотных остатков в последовательности кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после сравнительного анализа последовательностей и добавления промежутков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и не принимая во внимание любые консервативные замены как часть идентичности последовательностей. Сравнительный анализ с целью определения процента идентичности по аминокислотной последовательности может быть выполнен различными путями, которые входят в компетенцию специалистов в данной области, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для проведения сравнительного анализа, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для целей данного изобретения, однако, значения процентов идентичности по аминокислотной последовательности получены с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2, где полный источник кода для программы ALIGN-2 представлен в Таблице А ниже. Автором компьютерной программы ALIGN-2 для сравнения последовательностей являлась компания Genentech, Inc., и источник кода, приведенный в Таблице А ниже, внесен в

реестр пользовательской документации в Бюро регистрации авторских прав США, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером авторского права США TXU510087. Программа ALIGN-2 общедоступна через

компанию Genentech Inc., South San Francisco, California или может быть
скомпилирована из источника кода, предоставленного на фиг.8 ниже.
Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для использования с
операционной системой UNIX, предпочтительно, с цифровой UNIX V4.0D. Все
параметры сравнения последовательностей установлены программой ALIGN-2 и не
меняются.

В случаях когда ALIGN-2 используется для сравнений аминокислотных
последовательностей, % идентичности по аминокислотной последовательности
данной аминокислотной последовательности А по отношению, с или против данной
аминокислотной последовательности В (что может быть альтернативно
перефразировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет
или содержит определенный % идентичности по аминокислотной последовательности
по отношению, с или против данной аминокислотной последовательности В) и
вычисляется следующим образом:

$$X \text{ деленное на } Y, \text{ умноженное на } 100$$

где X представляет число аминокислотных остатков, рассчитанных как идентичные
совпадения программой выравнивания ALIGN-2, в выравнивании А и В этой
программой, и где Y представляет общее число аминокислотных остатков в В.
Следует понимать, что когда длина аминокислотной последовательности А не равна
длине аминокислотной последовательности В, % идентичности по аминокислотной
последовательности А к В не будет равен % идентичности по аминокислотной
последовательности В к А.

Если особо не указано по-другому, все значения % идентичности по
аминокислотной последовательности, используемые здесь, получены, как описано в
непосредственно предшествующем параграфе, с использованием компьютерной
программы ALIGN-2.

Таблица А

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
5  * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
10 #define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int    _day[26][26] = {
15  /*    A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */  { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */  {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
20 /* D */  { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */  { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */  {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */  { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
25 /* H */  {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */  {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
30 /* K */  {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */  {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */  {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},

35

40

45

50

```

```

/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
5 /* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
10 /* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
15 /* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
20 };

/*
25 */

#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

30 #define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
35 #define MX          4      /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT          3      /* value of matching bases */
#define DMIS          0      /* penalty for mismatched bases */
40 #define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1          1      /* penalty per base */
#define PINS0          8      /* penalty for a gap */
45 #define PINS1          4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
50    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */

```

```

};                                     /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
5      int      score;      /* score at last jmp */
      long      offset;     /* offset of prev block */
      short     ijmp;       /* current jmp index */
10     struct jmp jp;       /* list of jmps */
};

struct path {
15     int      spc;         /* number of leading spaces */
      short    n[JMPs];     /* size of jmp (gap) */
      int      x[JMPs];     /* loc of jmp (last elem before gap) */
20 };

char      *ofile;           /* output file name */
char      *namex[2];        /* seq names: getseqs() */
25 char      *prog;          /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2];         /* seqs: getseqs() */
int       dmax;             /* best diag: nw() */
int       dmax0;            /* final diag */
30 int       dna;            /* set if dna: main() */
int       endgaps;          /* set if penalizing end gaps */
int       gapx, gapy;       /* total gaps in seqs */
int       len0, len1;       /* seq lens */
35 int       ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
int       smax;             /* max score: nw() */
int       *xbm;             /* bitmap for matching */
40 long      offset;         /* current offset in jmp file */
struct diag dx;             /* holds diagonals */
struct path pp[2];          /* holds path for seqs */

45 char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

```

50

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
5  * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
10 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
15 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/

20 #include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
25     1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

30 static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
35     1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

40 main(ac, av)                                main
    int    ac;
    char    *av[];
{
45     prog = av[0];
    if (ac != 3) {

50

```

```

    fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
    fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
5    fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
    exit(1);
10    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
15    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

20    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";   /* output file */

    nw();                 /* fill in the matrix, get the possible jumps */
25    readjumps();         /* get the actual jumps */
    print();              /* print stats, alignment */

30    cleanup(0);          /* unlink any tmp files */
}

35

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
40 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
45 */
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
50    int      *ndely, *dely;     /* keep track of dely */

```

nw

```

int          ndelx, delx;    /* keep track of delx */
int          *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
int          mis;            /* score for each type */
5 int          ins0, ins1;     /* insertion penalties */
register      id;             /* diagonal index */
register      ij;             /* jmp index */
10 register     *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
register      xx, yy;         /* index into seqs */

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

15 ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
20 col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

25 smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
30         col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
35 }
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
40         dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
45 for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
50

```



```

    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
5         col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
10    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
15    }

...nw

20    for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
25         mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
            mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

30         /* update penalty for del in x seq;
            * favor new del over ongoing del
            * ignore MAXGAP if weighting endgaps
            */
35         if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
            if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
40                 ndely[yy] = 1;
            } else {
                dely[yy] -= ins1;
                ndely[yy]++;
45            }
        } else {
            if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
50                 dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);

```

```

ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
5      }

/* update penalty for del in y seq;
10    * favor new del over ongong del
    */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (coll[yy-1] - ins0 >= delx) {
15            delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
20            ndelx++;
        }
    } else {
25        if (coll[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
30            ndelx++;
    }

/* pick the maximum score; we're favoring
35    * mis over any del and delx over dely
    */

40

45

...nw

50    id = xx - yy + len1 - 1;

```

```

    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        coll[yy] = mis;
    else if (delx >= dely[yy]) {
5         coll[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
10         && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
15                 ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
20         }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
25         dx[id].score = delx;
    }
    else {
        coll[yy] = dely[yy];
30         ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
35             dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
40                 dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
45         dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
50     }

```

```

        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
5           if (endgaps)
                coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (coll[yy] > smax) {
10                smax = coll[yy];
                dmax = id;
            }
        }
15    }
    if (endgaps && xx < len0)
        coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (coll[yy-1] > smax) {
20        smax = coll[yy-1];
        dmax = id;
    }
25    tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
30 (void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

/*
35 *
* print() -- only routine visible outside this module
*
40 * static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
45 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() - -put a line of stars: dumpblock()
50 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname

```

```

*/

#include "nw.h"

5

#define SPC 3

#define P_LINE 256 /* maximum output line */

10 #define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];

int olen; /* set output line length */

15 FILE *fx; /* output file */

print() print
{
20
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
25
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }

    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
30
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
35
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
40
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
45
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
50
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;

```

```

        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {      /* trailing gap in y */
5        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
10    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

15

/*
20  * trace back the best path, count matches
 */

static
25 getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
30    int        nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char        outx[32];
    double      pct;
    register     n0, n1;
35    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
40    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
45    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
50

```

```

while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
5         n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
10         p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
20         if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
25         p0++;
        p1++;
    }
30 }

/* pct homology:
* if penalizing endgaps, base is the shorter seq
35 * else, knock off overhangs and take shorter core
*/
if (endgaps)
40     lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
45 fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
50

```

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
...getmat
if (gapx) {
5      (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
          ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
      fprintf(fx, "%s", outx);

10
      fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
      if (gapy) {
          (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
15          ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
          fprintf(fx, "%s", outx);
      }
      if (dna)
20          fprintf(fx,
          "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
          smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
      else
25          fprintf(fx,
          "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
          smax, PINS0, PINS1);
      if (endgaps)
30          fprintf(fx,
          "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
          firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
35          lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
      else
          fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
40 }

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;        /* lengths of stripped file names */
45 static ij[2];     /* jmp index for a path */
static nc[2];       /* number at start of current line */

50

```



```

static      ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];        /* ptr to current element */
5 static char  *po[2];        /* ptr to next output char slot */
static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */

10
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
15 static
pr_align()                                pr_align
{
    int      nn;      /* char count */
20    int      more;
    register      i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
25        nn = stripname(nameex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

30
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
35        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];      }

40    for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                                ...pr_align
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {
            /*
            * do we have more of this sequence?
45            */
            if (!*ps[i])
                continue;
50

```

```

more++;

    if (pp[i].spc) { /* leading space */
5         *po[i]++ = ' ';
        pp[i].spc--;
    }

10    else if (siz[i]) { /* in a gap */
        *po[i]++ = '-';
        siz[i]--;
    }

15    else { /* we're putting a seq element
        */

        *po[i] = *ps[i];
        if (islower(*ps[i]))
20             *ps[i] = toupper(*ps[i]);
        po[i]++;
        ps[i]++;

25

        /*
        * are we at next gap for this seq?
        */

30        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
            * we need to merge all gaps
            * at this location
            */

35            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
40                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }

45    }

    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();

50

```

```

    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
5      nn = 0;
    }
  }
}

10
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
15 static
dumpblock()                                dumpblock
{
    register      i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

25

...dumpblock

(void) putc('\n', fx);
30 for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
35         if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
40         if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
45     }
    }
}
}

50

```

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
5 static
  nums(ix)                                nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
10
    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

15
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
20
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
25
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
30
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
35
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
40
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
45
}

```

50

```

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
5  static
  putline(ix)                                putline

      int      ix;                          {

10

...putline

      int      i;

15  register char  *px;

      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void) putc(*px, fx);
20  for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putc(' ', fx);

25  /* these count from 1:
   * ni[] is current element (from 1)
   * nc[] is number at start of current line
   */
30  for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putc(*px&0x7F, fx);
      (void) putc('\n', fx);

35  }

/*
40  * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
   */
  static
  stars()                                    stars
45  {

      int      i;

      register char  *p0, *p1, cx, *px;

50

```

```

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
5   px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

10   for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

15             if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A']) {
                    cx = '*';
                    nm++;
            }
20             else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                    cx = '.';
            else
25                 cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
30     *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
35 }

40

45  /*
    * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
    */
50  static

```

stripname(pn)

stripname

```

    char *pn; /* file name (may be path) */
{
5     register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
10         if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
15         (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));

}

20

/*
25  * cleanup() -- cleanup any tmp file
  * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
  * g_calloc() -- calloc() with error checkin
  * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
  * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
30  */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

35

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

40

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

45

/*
  * remove any tmp file if we blow
  */
cleanup(i)
50

```

cleanup

```

    int    i;

{
    if (fj)
5         (void) unlink(jname);
        exit(i);
}

10
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
15 * seq in upper or lower case
 */
char      *
20 getseq(file, len)                                getseq
    char      *file; /* file name */
    int       *len; /* seq len */
{
25     char      line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int         natgc, tlen;
    FILE        *fp;
30
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
35         exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
40         if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
45                 tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
50         fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);

```



```

        exit(1);
    }
5    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

10
...getseq

    py = pseq + 4;
    *len = tlen;
15    rewind(fp);

    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
20            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
25            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
30                natgc++;
        }
    }
    *py++ = '\0';
35    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
40    return(pseq+4);
}

char *
45 g_calloc(msg, nx, sz)
                                g_calloc
    char *msg;                /* program, calling routine */
    int nx, sz;                /* number and size of elements */
{
50    char *px, *calloc();

```

```

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
5          sz);
            exit(1);
        }
    }
10    return(px);
}

15  /*
    * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
    */
    readjumps()
20    {
        int          fd = -1;
        int          siz, i0, i1;
        register     i, j, xx;
25
        if (fj) {
            (void) fclose(fj);
            if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
30                fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
        }
35    }

    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
40                ;

            ...readjumps

            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
45                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        }
    }
50

```

```

        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
5      else
        break;
    }
10     if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
15     if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
20         if (siz < 0) {           /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
25             */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
30         /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
35         }
        else if (siz > 0) {       /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
40             gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
45             i0++;
        }
    }
}
50

```

```

        else
            break;
    }

5
    /* reverse the order of jmps
    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
10
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
15
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
20
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
25
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }
30

    /*
    * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
35
    */
    writejumps(ix)
        int    ix;
40
    {
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
45
            if (mktemp(jname) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
50

```

writejumps

```

        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
5           exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
10    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);

```

Здесь термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к переносу другой нуклеиновой кислоты, с которой он соединен. Одним типом векторов является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные фрагменты ДНК. Другим типом векторов является фаговый вектор. Еще одним типом векторов являются вирусные векторы, где дополнительные фрагменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они встроены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть встроены в геном клетки-хозяина после переноса в клетку-хозяина и таким образом могут реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются здесь как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «рекомбинантные векторы»). В общем, экспрессирующие векторы, применимые в технологии рекомбинантных ДНК, существуют часто в виде плазмид. В настоящем описании термины «плазмида» или «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемым образом, так как плазмида является наиболее общеиспользуемым типом вектора.

Термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», взаимозаменяемо используемые здесь, относятся к нуклеотидным полимерам любой длины и включают в себя ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами, или любым субстратом, который может быть включен в полимер ДНК или РНК полимеразой или посредством синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. При наличии модификация нуклеотидной структуры может быть осуществлена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидным компонентом. Полинуклеотид может быть в дальнейшем модифицирован после синтеза, например, посредством присоединения метки. Другие типы модификаций включают, например, кэпирование, замещение одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, модификации внутри нуклеотидов, такие как, например, те, что имеют незаряженные связи (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.п.) и заряженные связи (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.п.), те, что содержат боковые части, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.п.), те, что содержат интеркаляты

(например, акридин, псорален и т.п.), те, что содержат хелатирующие агенты (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.п.), те, что содержат алкилирующие агенты, те, что имеют модифицированные связи (например альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.п.), так же как

5 немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Более того, любая гидроксильная группа, обычно присутствующая в сахаре, может быть заменена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными группами, или активирована для получения дополнительных связей с

10 дополнительными нуклеотидами, или может быть пришта на твердую или полутвердую подложку. 5' и 3' концевые ОН-группы могут быть фосфорилированы или замещены аминами или органическими кэпирующими частями длиной от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут образовывать производные со стандартными защитными группами. Полинуклеотиды могут также содержать

15 аналоги сахаров рибозы и дезоксирибозы, которые в общем известны, включающие, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, аналоги циклических сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические

20 аналоги и нуклеозидные аналоги, лишенные азотистых оснований, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связующими группами. Эти альтернативные связующие группы включают, без ограничения, варианты осуществления изобретения, где фосфат заменен на P(O)S(«тиоат»), P(S)S(«дитиоат»), «(O)NR₂(«амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO

25 или CH₂ («формацеталь»), в которых каждый заместитель R или R' является независимо H или замещенным или незамещенным алкилом (1-20 C), необязательно содержащим простую эфирную (-O-) связь, арилом, алкенилом, циклоалкилом, циклоалкенилом или аралдилом. Не все связи в полинуклеотиде должны быть

30 одинаковыми. Предшествующее описание применимо ко всем полинуклеотидам, упоминаемым здесь, включая РНК и ДНК.

Здесь термин «олигонуклеотид» обычно относится к коротким, обычно одноцепочечным, обычно синтетическим полинуклеотидам, которые имеют длину обычно, но не обязательно менее 200 нуклеотидов. Термины «олигонуклеотид» и

35 «полинуклеотид» не являются взаимоисключающими. Описание, изложенное выше, для полинуклеотидов равно и полностью применимо к олигонуклеотидам.

«Выделенное» антитело является тем, которое идентифицировано и отделено и/или очищено от компонента его природного окружения. Загрязняющие компоненты его

40 природного окружения являются веществами, которые бы препятствовали диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие растворенные вещества белковой и небелковой природы. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитело будет очищено (1) на более чем 95% по весу антитела, определенную методом Лоури, и,

45 наиболее предпочтительно, более, чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при использовании секвенатора с вращающимся сосудом (по Эдману), или (3) до гомогенного состояния по ДСН-ПААГ в восстановительных или

50 невосстановительных условиях, при использовании окрашивания красителем Coomassie Blue или, предпочтительно, серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, при условии, что по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Обычно,

однако, выделенное антитело будет получено посредством, по меньшей мере, одной стадии очистки.

Термины «нумерация остатков вариабельного домена, как в Kabat», или «нумерация положения аминокислоты, как в Kabat», и их вариации относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелых или легких цепей при компоновке антител в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Используя эту систему нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислоты, соответствуя укорачиванию или вставке в FR- или CDR-участок вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать единичную аминокислотную вставку (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c, и т.д. по Kabat) после 82 остатка FR-участка тяжелой цепи. Нумерация Kabat остатков может быть определена для данного антитела путем выравнивания по участкам гомологии последовательности антитела со «стандартной» нумерованной последовательностью Kabat. Если не указано особо, нумерация позиций всех аминокислот здесь находится в соответствии с системой нумерации Kabat.

«Консенсусный каркасный участок человека» является каркасным участком, который представляет наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в выборке последовательностей каркасных участков VL или VH регионов иммуноглобулинов человека. Обычно выборка последовательностей VL или VH производится из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Обычно, подгруппа последовательностей является подгруппой, как в Kabat et al. В одном варианте осуществления изобретения для VL подгруппой является подгруппа каппа I, как в Kabat et al. В одном варианте осуществления изобретения для VH подгруппой является подгруппа III, как в Kabat et al.

«Консенсусный каркасный участок VH подгруппы III» содержит консенсусную последовательность, полученную из аминокислотных последовательностей в подгруппе III вариабельного участка тяжелой цепи Kabat et al. В одном варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность консенсуса каркасного участка VH подгруппы III содержит по меньшей мере часть или все каждой из следующих последовательностей: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:46) - H1 - WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:47) - H2 - RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:48) - H3 - WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:49).

«Консенсусный каркасный участок VL подгруппы I» содержит консенсусную последовательность, полученную из аминокислотных последовательностей в подгруппе I вариабельного участка легкой каппа цепи Kabat et al. В одном варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность консенсуса каркасного участка VL подгруппы I содержит по меньшей мере часть или все каждой из следующих последовательностей:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:50) - L1 - WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:51) - L2 - GVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:52) - L3 - FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:53).

Термин «фактор роста гепатоцитов» или «HGF», используемый здесь, относится, если особо или в контексте не указано по-другому, к любому природному или вариантному (либо встречающемуся в природе, либо синтетическому) HGF полипептиду, который способен активировать сигнальный путь HGF/c-met в условиях,

позволяющих такому процессу произойти. Термин «HGF дикого типа» обычно относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность белка HGF, встречающегося в природе. Термин «последовательность HGF дикого типа» обычно относится к аминокислотной последовательности, найденной в HGF, встречающемся в природе.

Термины «антитело» и «иммуноглобулин» используются взаимозаменяемо в самом широком смысле и включают моноклональные антитела (например, полноразмерные или целые моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела, пока они проявляют желаемую биологическую активность) и также могут включать определенные фрагменты антител (как описано здесь более подробно). Антитело может быть человеческим, гуманизированным и/или с созревшей аффинностью.

«Фрагменты антител» содержат только часть целого антитела, где эта часть, предпочтительно, сохраняет, по меньшей мере одну, предпочтительно, большинство или все функции, в норме связанные с этой частью, когда она присутствует в интактном антителе. В одном варианте осуществления изобретения фрагмент антитела содержит участок связывания антигена целого антитела и таким образом сохраняет способность связывать антиген. В другом варианте осуществления изобретения фрагмент антитела, например, тот, что содержит Fc-участок, сохраняет, по меньшей мере, одну из биологических функций, в норме ассоциированных с Fc-участком, присутствующим в целом антителе, таких как связывание FcRn, регуляция полужизни антитела, функция ADCC (клеточная цитотоксичность, обусловленная антителом) и связывание комплемента. В одном варианте осуществления изобретения фрагмент антитела является моновалентным антителом, которое имеет *in vivo* время полужизни, практически одинаковое с целым антителом. Например, такой фрагмент антитела может содержать антигенсвязывающее плечо с последовательностью Fc-участка, способного придавать *in vivo* стабильность фрагменту.

Термин “моноклональное антитело”, используемый здесь, относится к антителу, полученному из популяции в основном гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, содержащиеся в популяции, являются идентичными за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против единственного антигена. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на антигене.

Моноклональные антитела здесь в особенности включают “химерные” антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из отдельных видов или принадлежащих отдельному классу антител или подклассу, в то время как остаток цепи(ей) является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих к другому классу антител или подклассу, так же как фрагменты этих антител, до тех пор пока они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; и Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

“Гуманизированные формы” антител других видов, кроме человека (например, мышиных), являются химерными антителами, которые содержат минимальную

последовательность, происходящую из антитела другого вида, кроме человека.

Главным образом, гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (реципиентными антителами), в которых остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены остатками из гипервариабельного участка других видов (не человека) (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или приматы за исключением человека, имеющими желаемую специфичность, 5 аффинность или антигенсвязывающую способность. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками другого вида (не человека). Более того, гуманизированные антитела могут 10 содержать остатки, которые не найдены в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Эти изменения делаются для дальнейшего улучшения свойств антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать в основном все из по меньшей мере одного или обычно двух, вариабельных доменов, в которых все или в основном все 15 гипервариабельные петли соответствуют им же в иммуноглобулине другого вида (не человека), и все или в основном все каркасные участки представляют каркасные участки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, необязательно, будет также содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc) обычно константный участок человеческого иммуноглобулина. Для дополнительной информации, см. Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol* 2:593-596 (1992). См. также следующие обзорные статьи и ссылки, приведенные в них: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998).; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

“Человеческое антитело” имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого человеком и/или получаемого любым из раскрытых здесь способов получения человеческих антител. 30 Это определение человеческого антитела специально исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки из других видов (не человека).

Антитело с “созревшей аффинностью” представляет антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких его CDR-участках, которые приводят к улучшению в аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, которое не обладает этими изменением(ями). Предпочтительные антитела с созревшей аффинностью будут иметь наномолярные или даже пикомолярные значения аффинности к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают известными способами. Авторы статьи Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывают созревание аффинности при помощи перестановки VH и VL доменов. Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркасного участка описан в 40 статьях: Barbas *et al. Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

«Блокирующее» антитело или антитело «антагонист» это антитело, которое ингибирует или уменьшает биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Предпочтительные блокирующие антитела или антитела-антагонисты существенно или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

Термин «антитело-агонист», используемый здесь, представляет собой антитело, которое имитирует по меньшей мере одну из функциональных активностей представляющего интерес антитела.

«Нарушение» является любым состоянием, которое улучшается при лечении

веществом/молекулой или способом согласно изобретению. Это включает хронические и острые нарушения или болезни, включая те патологические состояния, которые провоцируют рассматриваемое нарушение у млекопитающих. Здесь не ограничивающие примеры нарушений для лечения включают злокачественные и доброкачественные опухоли; не лейкоцитарные и лимфоидные злокачественные новообразования; нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические и другие glandулярные, макрофагальные, эпителиальные, стромальные и бластоцитарные нарушения; воспалительные, иммунологические и другие нарушения, относящиеся к ангиогенезу.

Термины «нарушение клеточной пролиферации» и «нарушение пролиферации» относятся к нарушениям, которые связаны с некоторой степенью аномальной клеточной пролиферации. В одном варианте осуществления изобретения нарушением клеточной пролиферации является рак.

Термин «опухоль», используемый здесь, относится к неопластическому росту клеток и пролиферации, злокачественным либо доброкачественным и всем прераковым и раковым клеткам и тканям. Термины «рак», «раковый», «нарушение клеточной пролиферации», «нарушение пролиферации» и «опухоль» не являются взаимоисключающими, как упомянуто здесь.

Термины «рак» и «раковый» относятся к или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым клеточным ростом/пролиферацией. Примеры рака включают, без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемию. Более подробные примеры таких раков включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, легочную аденокарциному, плоскоклеточную легочную карциному, рак брюшины, рак клеток печени, желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки, эндометриальную или маточную карциному, карциному слюнных желез, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, печеночную карциному и различные виды рака головы и шеи.

Нарушенная регуляция ангиогенеза может приводить к множеству нарушений, которые могут быть излечены посредством композиций и способов согласно изобретению. Эти нарушения включают и не-неопластические и неопластические состояния. Неоплазии включают, без ограничения, те, что описаны выше. Не-неопластические нарушения включают, без ограничения, нежелательную или аберрантную гипертрофию, артрит, ревматоидный артрит (РА), псориаз, псориазные бляшки, саркоидоз, атеросклероз, атеросклеротические бляшки, диабетические и другие пролиферативные ретинопатии, включающие ретинопатию недоношенности, фиброплазию ретролентальную, неоваскулярную глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетический отек желтого пятна, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию пересаженной роговицы, отторжение пересаженной роговицы, неоваскуляризацию сетчатки/сосудистой оболочки, неоваскуляризацию радужки (рубозис), глазное неоваскулярное заболевание, сосудистый рестеноз, артериовенозные пороки развития (AVM), менингиому, гемангиому, ангиофибром, гиперплазии щитовидной железы (включая болезнь Грейва), трансплантацию роговицы и других тканей, хроническое воспаление, воспаление легких, острое поражение легких/ARDS (синдром острой легочной недостаточности), сепсис, первичную пульмонарную гипертензию, злокачественный

легочный экссудат, церебральную эдему (например, связанную с острым инсультом/закрытым повреждением головы/травмой), синовиальное воспаление, образование паннуса при ревматоидном артрите, мышечное окостенение, гипертрофированное образование костей, остеоартрит (ОА), рефракторный асцит, поликистоз яичников, эндометриоз, болезни, связанные с движением жидкости из сосудов в интерстиций (панкреатит, синдром межфасциального пространства, ожоги, болезнь кишечника), фиброз матки, преждевременные роды, хроническое воспаление, такое как воспалительное заболевание кишечника (болезнь Крона и язвенный колит), отторжение почечного аллотрансплантата, воспалительное заболевание кишечника, нефротический синдром, нежелательный или аномальный рост тканевой массы (не раковый), гемофилический гемартроз, гипертрофические рубцы, ингибирование роста волос, синдром Ослера-Вебера, пиогенную гранулему, ретролентальную фиброплазию, склеродерму, трахому, сосудистые спайки, синовит, дерматит, презеклампсию, асциты, перикардальный выпот (такой, который связан с перикардитом) и плевральный выпот.

«Аутоиммунным заболеванием» здесь является не злокачественное заболевание или нарушение, проистекающее из и направленное против собственных тканей индивидуума. Аутоиммунные заболевания здесь специально исключают злокачественные или раковые заболевания или состояния, особенно исключая В-клеточную лимфому, острую лимфобластную лейкемию (ALL), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL), волосатоклеточный лейкоз и хроническую миелоцитарную лейкемию. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают, без ограничения, воспалительные ответы, такие как воспалительные заболевания кожи, включающие псориаз и дерматит (например атипичный дерматит); системную склеродерму и склероз; ответы, связанные с воспалительными заболеваниями желудка (такими как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный синдром (включая синдром острой респираторной недостаточности; ARDS); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма и другие состояния, которые вовлекают инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные ответы; атеросклероз; нарушение адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системная красная волчанка (SLE); сахарный диабет (например сахарный диабет первого типа или инсулинзависимый сахарный диабет); множественный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; синдром Сьергена; ювенильный диабет; и иммунные ответы, связанные с острой и отложенной гиперсенситивностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно присутствующие при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); болезни, включающие диapedез лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром поражения многочисленных органов; гемолитическую анемию (включая, без ограничения, криоглобинемию или положительную анемию Кумбса); злокачественную миастению; болезни, опосредованные комплексом антиген-антитело; негломерулярную болезнь базальной мембраны; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейва; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пемфигоид; пузырчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром ригидного человека; болезнь Бекета; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; IgA нефропатию; IgM полиневропатию; идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) или аутоиммунную

тромбоцитопению и т.п.

Используемый здесь термин «лечение» относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественную судьбу индивидуума или клетки, которые подвергаются лечению, и может быть проведен или для профилактики, или в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предохранение от случая или возврата болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или не прямых последствий болезни, предотвращение метастазирования, снижение скорости развития болезни, улучшение или временное облегчение состояния болезни и ремиссию или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела согласно изобретению применяются, чтобы задержать развитие болезни или нарушения.

Термин «эффективное количество» относится к количеству, эффективному в необходимых дозировках и за необходимый отрезок времени для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта.

«Терапевтически эффективное количество» вещества/молекулы согласно изобретению, агониста или антагониста может варьировать в соответствии с такими факторами, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, и способности вещества/молекулы согласно изобретению, агониста или антагониста вызывать желаемый ответ в индивидууме. Терапевтически эффективное количество является также тем, в котором любые токсические или вредные эффекты вещества/молекулы согласно изобретению, агониста или антагониста перевешиваются терапевтически благотворными эффектами. Термин «профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в необходимых дозировках и за необходимый отрезок времени для достижения желаемого профилактического эффекта. Обычно, но не обязательно, так как профилактическая дозировка применяется у субъектов до или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Здесь термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток.

Термин предполагает включение радиоактивных изотопов (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивных изотопов Lu), химиотерапевтических агентов, например метатрексата, адриамицина, винка-алкалоидов (винкристина, винбластин, этопозид), доксорубицина, мелфалана, митомицина С, хлорамбуцила, даунорубицина и других интеркалирующих агентов, ферментов и их фрагментов, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментно-активные токсины бактериальной, грибной, растительной или животной природы, включающие их фрагменты и/или вариации, и различных противоопухолевых или противораковых средств, раскрытых ниже. Другие цитотоксичные агенты описаны ниже. Агенты, убивающие опухолевые клетки, вызывают разрушение опухолевых клеток.

«Химиотерапевтический агент» является химическим соединением, применимым для лечения рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбокон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включающие алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин, буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол;

колхицины; бетулиновая кислота; камптотecin (включая синтетический аналог
 топотекан (HUSAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотecin,
 скополектин и 9-аминокамптотecin); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его
 синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин;
 5 подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (в особенности, криптофицин 1 и
 криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и
 CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые
 иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин,
 10 ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан,
 новембихин, феностерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины,
 такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин;
 антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, особенно
 калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, *Chem Intl. Ed.*
 15 *Engl.*, 33:183-186 (1994)); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; так же как
 неокарциностатиновый хромофор и родственные хромобелковые энединовые
 антибиотики хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин,
 блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины,
 20 дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин,
 доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-
 доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, доксорубицин HCl в виде липосомного
 препарата (DOXIL®) и деоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин,
 марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота,
 25 ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуromoцин, куэламицин,
 родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин,
 зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®),
 тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU);
 30 аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин,
 триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флюдарабин, 6-меркаптопурин,
 тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-
 азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин,
 флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат,
 35 эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции
 надпочечников, такие как аминоклотетимид, митотан, трилостан; компенсатор
 фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамид
 гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен;
 40 эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазикон; элфорнитин; эллиптиниум ацетат;
 этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды,
 такие как майтанзин и анзамицины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол;
 нитразрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид;
 прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (компании JHS Natural Products, Eugene,
 45 OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота;
 триазикон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно Т-2 токсин,
 верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®);
 дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин;
 50 арабинозид ("Ара-С"); тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®),
 паклитаксел в форме наночастиц, связанных с альбумином, (ABRAXANE®),
 доксетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат;
 платиновые аналоги, такие как цисплатина и карбоплатина; винбластин (VELBAN®);

платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатина; лейкововин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; фармацевтические приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных соединений; также как сочетания двух или нескольких вышеперечисленных соединений, такие как CHOP, аббревиатура для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном и FOLFOX, аббревиатура для схемы лечения оксалиплатиной (ELOXATIN®), совмещенной с 5-FU и лейкововином.

Также в это определение включены антигормональные агенты, которые действуют, регулируя, уменьшая, блокируя или ингибируя эффекты гормонов, которые могут способствовать развитию рака и часто имеют форму лечения системного или общего действия. Они сами по себе могут являться гормонами. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включающие, например, тамоксифен (включая тамоксифен под торговым названием NOLVADEX®), ралоксифен (EVISTA®), дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); антипрогестероны; вещества, снижающие уровень эстрогенового рецептора (ERD); антагонисты эстрогенового рецептора, такие как фулвестрант (FASLODEX®); вещества, которые действуют, подавляя или выключая функции яичников, например, агонисты гормона лютинизирующего релизинг-фактора (LHRH), такие как лейпролид ацетат (LUPRON® и ELIGARD®), гозерелин ацетат, бузерелин ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флютамид, нилутамид и бикалутамид; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрол ацетат (MEGASE®), экземестан (AROMASIN®), форместан, фадрозол, ворозол (RIVIZOR®), летрозол (FEMARA®) и анастрозол (ARIMIDEX®). В дополнение такое определение химиотерапевтических агентов включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); так же как троксацидабин (1,3-диоксолан нуклеозид цитозинный аналог); антисмысловые олигонуклеотиды, в особенности те, которые ингибируют экспрессию генов сигнальных путей, вовлеченных в aberrantную пролиферацию клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор фактора роста эпидермиса (EGF-R); вакцины, такие как THERATOPE® вакцина и геннотерапевтические вакцины, например, ALLOVECTIN® вакцина, LEUVECTIN® вакцина и VAXID® вакцина; ингибитор топоизомеразы I (например, LURTOTECAN®); gmRH (например, ABARELIX®); лапатиниба дитозилат (низкомолекулярный ингибитор ErbB-2 и EGFR, известный также как GW572016); COX-2 ингибиторы, такие как целекоксиб (CELEBREX®); 4-(5-(4-метилфенил)-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил)-бензолсульфонамид; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных соединений.

Термин “агент, ингибирующий рост”, когда используется здесь, относится к соединению или композиции, которое ингибирует рост клетки, чей рост зависит от активации HGF/c-met или *in vitro*, или *in vivo*. Таким образом, агентом, ингибирующим

рост, может быть агент, который существенно уменьшает процентное соотношение HGF/c-met-зависимых клеток в S-фазе. Примеры агентов, ингибирующих рост, включают в себя агенты, которые блокируют развитие клеточного цикла (в фазе, отличной от S-фазы), такие как агенты, которые индуцируют арест в фазах

5 клеточного цикла G1 и M. Классические вещества, вызывающие арест клеточного цикла в M-фазе, включают винка-алкалоиды (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Те агенты, которые вызывают арест в фазе G1, также

10 распространяют свой эффект на арест в S-фазе, например, ДНК алкилирующие вещества, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатина, метотрексат, 5-фторурацил и ара-С. Дальнейшую информацию можно найти в книге The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia,

15 1995), особенно на стр. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми препаратами, производимыми из тиса. Доцетаксел (препарат TAXOTERE®, производства Rhone-Poulenc Rorer), производное из европейского тиса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела

20 (препарат TAXOL®, производства Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел способствуют сборке микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки посредством предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

«Доксорубин» является антрациклиновым антибиотиком. Полное химическое

25 название доксорубина (8S-цис)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-лихсо-гексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион.

Векторы, клетки-хозяева и рекомбинатные методы

30 Для получения рекомбинантного антитела согласно изобретению нуклеиновую кислоту, кодирующую его, выделяют и встраивают в реплицирующийся вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, легко выделить и секвенировать с использованием стандартных методик (например, посредством олигонуклеотидных проб, которые

35 способны специфично связывать гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антитела). Сейчас доступно множество векторов. Выбор вектора частично зависит от клетки-хозяина, в которой он будет использован. Обычно предпочтительные клетки-хозяева являются или прокариотическими, или эукариотическими (обычно, клетками

40 млекопитающих).

Выработка антител в прокариотических клетках-хозяевах:

Конструирование вектора

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные составляющие антитела согласно изобретению, могут быть получены с

45 использованием стандартных рекомбинантных методов. Желаемые полинуклеотидные последовательности могут быть выделены и секвенированы из клеток, производящих антитело, таких как гибридомы. В качестве альтернативы полинуклеотиды могут быть синтезированы с использованием нуклеотидного

50 синтезатора или ПЦР методик. Единоразово полученные последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерогенных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Множество доступных и известных векторов могут быть использованы для

целей настоящего изобретения. Выбор подходящего вектора будет зависеть, в основном, от размера нуклеиновых кислот, встраиваемых в вектор, и определенной клетки-хозяина, трансформируемой вектором. Каждый вектор содержит различные составляющие в зависимости от его функций (амплификация или экспрессия

5 гетерологичного полинуклеотида, или обеих функций) и его совместимости с определенной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно включают, без ограничения: точку начала репликации, ген-маркер для отбора, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку

10 гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

В основном в организмах таких хозяев применяют плазмидные векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Вектор обычно несет сайт репликации, так

15 же как и маркерные последовательности, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E.coli* обычно трансформирована с использованием pBR322, плазмиды, полученной из вида *E.coli*. pBR322 содержит гены, кодирующие резистентность к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet) и, таким образом, обеспечивает легкость идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные

20 плазмиды или бактериофаги могут также содержать или быть модифицированными, чтобы содержать промоторы, которые могут быть использованы микроорганизмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, пригодных для экспрессии определенных антител, описаны в деталях в патенте США № 5648237, авторов Carter et al.

В дополнение фаговые векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, могут быть

30 использованы как трансформирующие векторы в этих хозяевах. Например, бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-11, может быть применен в создании рекомбинантного вектора, который может быть использован для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E.coli* LE392.

Экспрессирующий вектор согласно изобретению может содержать две или

35 несколько промотор-цистронных пар, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, находящуюся в 5'-области цистрона, и модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно принадлежат к двум классам:

40 индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор - это промотор, который инициирует увеличенный уровень транскрипции цистрона под его контролем в ответ на изменения в культуральной среде, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Хорошо известно большое число промоторов, узнаваемых рядом потенциальных

45 клеток-хозяев. Выбранный промотор может быть функционально связан с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, посредством удаления промотора из источника ДНК с помощью расщепления ферментами рестрикции и встраивания выделенной промоторной последовательности в вектор согласно изобретению. И

50 нативная промоторная последовательность, и множество гетерологичных промоторов могут быть применены для прямой амплификации и/или экспрессии целевых генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются гетерологичные промоторы, так как они в общем позволяют более высокий уровень

транскрипции и более высокие выходы экспрессированного целевого гена по сравнению с нативными промоторами целевых полипептидов.

Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают PhoA-промотор, β -галактамазную и лактозную промоторные системы, триптофановую (*trp*) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как *tac*- или *trc*-промоторы. Однако другие промоторы, которые функционируют в бактериях (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы), также являются подходящими. Их нуклеотидные последовательности опубликованы, таким образом давая возможность опытному специалисту функционально лигировать их с цистронами, кодирующими целевые легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) Cell 20:269), применяя линкеры или адапторы, чтобы снабдить любыми рестрикционными сайтами.

В одном аспекте изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит секреторную сигнальную последовательность, которая направляет транслокацию экспрессированных полипептидов через мембрану. В общем, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, или она может быть частью ДНК целевого полипептида, которая встроена в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для цели этого изобретения, должна быть узнаваемой и процессируемой (то есть расщепляемой сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не узнают и не процессируют нативные сигнальные последовательности гетерологичных полипептидов, сигнальная последовательность заменяется выбранной прокариотической сигнальной последовательностью, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или лидерных последовательностей теплоустойчивого энтеротоксина II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PelB*, *OmpA* и *MBP*. В одном варианте осуществления изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах системы экспрессии, являются STII сигнальными последовательностями или их вариантами.

В другом аспекте изобретения получение иммуноглобулинов согласно изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, таким образом, не требует присутствия секреторных сигнальных последовательностей внутри каждого цистрона. В этом случае легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов экспрессируются, сворачиваются и собираются, формируя функциональные иммуноглобулины внутри цитоплазмы. Определенные штаммы клеток-хозяев (например, штамм *trxB⁻* *E.coli*) обеспечивают условия в цитоплазме, которые способствуют образованию дисульфидных связей, таким образом давая возможность правильного сворачивания и сборки экспрессированных белковых субъединиц. Статья Proba and Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

Настоящее изобретение предоставляет систему экспрессии, в которой количественное соотношение экспрессированных полипептидных компонентов может регулироваться для того, чтобы максимизировать выход секретируемых и правильно собранных антител согласно изобретению. Такая модуляция достигается, по меньшей мере частично, путем одновременной регуляции силы трансляции для полипептидных компонентов.

Один метод для регуляции силы трансляции раскрыт в патенте США №5840523, авторами Simmons et al. Этот метод использует варианты участка инициации трансляции (TIR) внутри цистрона. Для данного TIR ряд вариантов аминокислотных или нуклеотидных последовательностей может быть создан с диапазоном сил

трансляции, таким образом обеспечивая удобное средство, посредством которого этот фактор доводится до желаемого уровня экспрессии определенной цепи. Варианты TIR могут быть созданы общеизвестными методами мутагенеза, что приводит к изменениям последовательности кодонов, которые могут поменять аминокислотную последовательность, хотя молчащие замены в нуклеотидной последовательности являются предпочтительными. Изменения в TIR могут включать, например, изменения в числе или расположении последовательностей Шайн-Дальгарно вместе с изменениями в сигнальной последовательности. Один метод создания мутантных сигнальных последовательностей представляет создание «банка кодонов» в начале кодирующей последовательности, что не меняет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (то есть замены являются молчащими). Это может быть достигнуто путем замены третьего нуклеотида в каждом кодоне; дополнительно некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют различные нуклеотиды в первом и втором положениях, что добавляет сложности в создание банка. Этот метод мутагенеза описан в деталях в статье Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

Предпочтительно, чтобы набор векторов создавался с диапазоном сил TIR для каждого цистрона в нем. Этот ограниченный набор предоставляет сравнение уровней экспрессии каждой цепи, так же как и выход желаемых антител при различных комбинациях сил TIR. Силы TIR могут быть определены путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как описано в деталях в патенте США № 5840523, авторов Simmons et al. На основании сравнения сил трансляции желаемые индивидуальные TIR выбираются для соединения в экспрессирующих векторных конструкциях согласно изобретению.

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител согласно изобретению, включают Archaeobacteria и Eubacteria, таких как грамположительные и грамотрицательные организмы. Примеры пригодных бактерий включают Escherichia (например, E.coli), Bacilli (например, B.subtilis), Enterobacteria, вид Pseudomonas (например, P.aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla или Paracoccus. В одном варианте осуществления изобретения использовались грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления изобретения клетки E.coli использовались в качестве хозяев для изобретения. Примеры штаммов E.coli включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; депозит в ATCC № 27325) и его производные, включающие штамм 33D3, имеющий генотип W3110 ΔhfuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-ferE) degP41 kan^R (патент США № 5639635). Другие штаммы и их производные, такие как E.coli 294 (депозит в ATCC № 31446), E.coli B, E.coli_λ 1776 (депозит в ATCC № 31537) и E.coli RV308 (депозит в ATCC № 31608), также подходят. Эти примеры являются больше иллюстративными, чем ограничивающими. Методы для создания производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны и описаны, например, у Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). В общем, является необходимым выбирать подходящую бактерию, принимая во внимание способность репликона к репликации в бактериальных клетках. Например, штаммы E.coli, Serratia или Salmonella могут подходить для использования в качестве хозяев, когда хорошо известные плазмиды pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410 используются как источник репликона. Обычно клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и дополнительные

ингибиторы протеаз могут, желательно, быть включены в клеточную культуру.

Получение антител

Клетки-хозяева, трансформированные вышеописанными экспрессирующими векторами и выращенные на стандартной питательной среде, измененной
5 соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Трансформация означает встраивание ДНК в прокариотического хозяина, так, что ДНК является реплицируемой или как экстрахромосомный элемент, или как часть
10 хромосомы. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформация осуществляется с применением стандартных методик, подходящих для таких клеток. Обработка кальцием с использованием хлорида кальция обычно используется для бактериальных клеток, которые содержат прочные барьеры клеточной стенки. Другая методика трансформации использует полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одной
15 методикой является электропорация.

Прокариотические клетки, применимые для получения полипептидов согласно изобретению, выращивают в известной среде и подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящей среды включают среду Луриа-Бертрани (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах
20 осуществления изобретения среда также содержит вещество для селекции, выбранное на основании конструкции вектора экспрессии для того, чтобы селективно разрешить рост прокариотических клеток, содержащих экспрессирующий вектор. Например, к среде добавляют ампициллин для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к
25 ампициллину.

Любые необходимые добавки, кроме углерода, азота и источников неорганического фосфата, могут также быть включены в соответствующих концентрациях, добавленные по одиночке или в виде смеси с другой добавкой или
30 средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно, культуральная среда может содержать один или несколько восстанавливающих агентов, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамин, тиогликолата, дитиозритритола и дитиотриэтола.

Культивируют прокариотические клетки-хозяева при соответствующих
35 температурах. Для роста *E.coli*, например, предпочтительная температура находится в границах от, примерно, 20°C до, примерно, 39°C, более предпочтительно от, примерно, 25°C до, примерно, 37°C и еще более предпочтительно, при, примерно, 30°C. pH среды может быть любым, находящимся в пределах от, примерно, 5 до,
40 примерно, 9, в основном зависящим от организма хозяина. Для *E.coli* pH предпочтительно равен от, примерно, 6,8 до, примерно, 7,4 и более предпочтительно, примерно, 7,0.

Если в экспрессирующем векторе согласно изобретению используется индуцибельный промотор, экспрессия белка индуцируется при условиях,
45 соответствующих активации промотора. В одном варианте изобретения применяются *PhoA* промоторы для контроля транскрипции полипептидов. Соответственно для индукции трансформированные клетки-хозяева культивируются в среде с ограниченным количеством фосфата. Предпочтительно, чтобы средой, лимитированной по фосфату, была C.R.A.P. среда (см., например, Simmons et al., J.
50 Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Множество других индукторов может быть использовано в соответствии с используемой векторной конструкцией, как известно в науке.

В одном варианте осуществления изобретения экспрессируемые полипептиды настоящего изобретения секретируются в и выделяются из периплазмы клеток-хозяев. Выделение белка обычно включает разрушение микроорганизма, обычно такими методами, как осмотический шок, озвучивание или лизис. После разрушения клеток, клеточный дебрис или целые клетки могут быть удалены центрифугированием или фильтрацией. Белки могут быть далее очищены, например, с помощью хроматографии на аффинной смоле. В качестве альтернативы, белок может быть транспортирован в культуральную среду и выделен из нее. Клетки можно удалить из культуры, а супернатант профильтровать и сконцентрировать для дальнейшей очистки получаемых белков. Экспрессированные полипептиды могут быть затем выделены и идентифицированы общеизвестными методами, такими как электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и Вестерн блоттингом.

В одном аспекте изобретения, получение антител проводилось в большом количестве посредством ферментационного процесса. Разнообразные крупномасштабные ферментационные процессы с подачей питательных веществ являются доступными для получения рекомбинантных белков. Крупномасштабное культивирование имеет пропускную способность по меньшей мере 1000 литров, предпочтительно, от, примерно, 1000 до 100000 литров. Эти ферментеры имеют лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительного источника углерода/энергии). Культивирование в малом масштабе относится в основном к культивированию в ферментерах, которые имеют объем не более, чем, приблизительно, 100 литров и объем культивирования может варьировать от примерно, 1 литра до, примерно, 100 литров.

В процессе ферментации индукцию экспрессии белков обычно инициируют после того, как клетки при соответствующих условиях достигнут желаемой плотности, например, значения OD_{550} , примерно, 180-220, при котором клетки находятся в ранней стационарной фазе. Могут быть использованы множество индукторов, в соответствии с используемым вектором, как известно в науке и описано выше. Клетки можно растить более короткое время до индукции. Клетки индуцируют в течение, примерно, 15-20 часов, хотя можно использовать более длинное или короткое время индукции.

Для улучшения выхода и качества полипептидов согласно изобретению различные условия ферментации могут быть модифицированы. Например, чтобы улучшить правильную сборку и сворачивание секретируемых полипептидов антитела дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как Dsb белки (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и DsbG) или FkpA (пептидил-пролил-цис-транс-изомераза, обладающая шаперонной активностью), могут быть применены для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Показано, что белки-шапероны облегчают правильное сворачивание и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; патент США № 6083715, Georgiou et al.; патент США №6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Чтобы минимизировать протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, что являются чувствительными к протеолизу), в настоящем изобретении могут быть использованы определенные штаммы-хозяева, лишенные протеолитических ферментов. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы, чтобы достичь генетической(их) мутации(ий) в генах, кодирующих

известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их сочетаниях. Некоторые штаммы E.coli, лишенные протеазной активности, являются доступными и описаны, например, у Joly et al. (1998) см. выше; патенте США № 5264365 авторов Georgiou et al.; патенте США № 5508192 авторов Georgiou et al.; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

В одном варианте осуществления изобретения штамм E.coli, лишенный протеолитических ферментов и трансформированный плазмидой, сверхэкспрессирующей один или несколько белков-шаперонов, используется в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии согласно изобретению.

Очистка антител

В одном варианте осуществления изобретения антитело, полученное здесь, далее очищают для получения препаратов, которые являются в значительной степени гомогенными для дальнейших испытаний и использования. Могут быть применены известные стандартные методы очистки белков. Следующие процедуры являются примерами подходящих методов очистки: фракционирование на иммуноаффинной или ионообменной колонке, осаждение этанолом, HPLC на обратной фазе, хроматография на силикагелевой или катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, ДСН-ПААГ, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с применением, например, Sephadex G-75.

В одном аспекте белок А, иммобилизованный на твердофазном носителе, применяется для иммуноаффинной очистки продуктов изобретения - полноразмерных антител. Белок А является белком клеточной стенки золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) с молекулярным весом 41 кДа, который связывает с высокой аффинностью Fc-регион антител. Статья Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. Твердофазный носитель, на который иммобилизуют белок А, является, предпочтительно, колонкой, с поверхностью носителя из стекла или кремнезема, более предпочтительно, колонкой со стеклянным носителем с контролируемым размером пор или с носителем из кремниевой кислоты. В некоторых применениях колонка была покрыта реагентом, таким как глицерин, в попытке предотвратить неспецифическое связывание примесей.

В качестве первого шага очистки препарат, полученный из клеточной культуры, как описано выше, наносят на белок А, иммобилизованный на твердом носителе, чтобы позволить представляющему интерес антителу связаться с белком А. Твердофазный носитель затем промывается для удаления загрязняющих примесей, неспецифически связанных с носителем. В конце представляющее интерес антитело элюируют с носителя.

Получение антител с применением эукариотических клеток-хозяев:

Векторные компоненты в общем включают в себя, без ограничения, один или несколько из следующих компонентов: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательности терминации транскрипции.

(i) Компонент сигнальная последовательность

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфичный сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида, представляющих интерес. Гетерологичная сигнальная последовательность выбирается предпочтительно из тех, что узнаются и процессируются (то есть расщепляются сигнальной пептидазой)

клеткой-хозяином. В системах экспрессии в клетках млекопитающих сигнальные последовательности млекопитающих, так же как и вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнал gD вируса простого герпеса, являются доступными.

ДНК для такого региона-предшественника лигируется с сохранением рамки считывания в ДНК, кодирующую антитело.

(ii) Точка начала репликации

В общем, компонент точка начала репликации не нужен для экспрессирующих векторов в системе экспрессии в клетках млекопитающих. Например, точка начала репликации вируса SV-40 обычно может быть использована только потому, она содержит ранний промотор.

(iii) Компонент селективного гена

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать селективный ген, также называемый селективным маркером. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) восполняют питательные вещества, не синтезируемые ауксотрофами, где это актуально, или (в) поставляют необходимые питательные вещества, недоступные в культуральной среде.

Один пример схемы селекции связан с использованием лекарственного препарата для остановки роста клеток-хозяев. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий резистентность к препарату, и, следовательно, выживают в режиме селекции. Примеры такой доминантной селекции связаны с использованием лекарственных веществ неомицина, микофеноловой кислоты и гиромидина.

Другим примером подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, дающие возможность идентифицировать клетки, способные принять нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, таких как DHFR, тимидиновая киназа, металлотионеин-I и II, предпочтительно, металлотионеиновые гены приматов, аденозин деаминаза, орнитин декарбоксилаза и т.п.

Например, клетки, трансформированные селективным геном DHFR, сначала идентифицируют посредством культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином, при применении гена DHFR дикого типа, является линия клеток яичников китайского хомячка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, депозит ATCC CRL-9096).

В качестве альтернативы клетки-хозяева (особенно клетки-хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или ко-трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, дикий тип белка DHFR и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть отобраны посредством роста клеток в среде, содержащей селекционный агент для селективного маркера, такого как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199.

(iv) Промоторный компонент

Векторы для экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который узнается организмом-хозяином и который функционально связан с нуклеиновой кислотой полипептида антитела. Промоторные последовательности для эукариот известны. В действительности все эукариотические гены имеют АТ-богатый участок,

расположенный на расстоянии в, приблизительно, 25-30 пар оснований выше участка инициации транскрипции. Другой последовательностью, найденной в 70-80 парах оснований выше участка инициации транскрипции, является CNCAAT регион, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится ААТААА последовательность, которая может быть сигналом для добавления полиахвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности соответствующим образом вставлены в эукариотические экспрессирующие векторы.

Транскрипция полипептида антитела из вектора в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такого, как аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, из промоторов белков теплового шока, если такие промоторы являются совместимыми с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в качестве рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Ранний промотор человеческого цитомегаловируса удобно получать как фрагмент рестрикции эндонуклеазой HindIII. Система для экспрессии ДНК в клетках млекопитающих с использованием вируса бычьей папилломы в качестве вектора раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также статью Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) об экспрессии кДНК человеческого β -интерферона в мышечных клетках под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. В качестве альтернативы длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса может быть использован в качестве промотора.

(v) Энхансерный компонент

Транскрипция ДНК, кодирующей полипептид антитела этого изобретения высшими эукариотами, часто увеличивается посредством встраивания энхансерной последовательности в вектор. Множество энхансерных последовательностей из генов млекопитающих известны на сегодняшний день (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Обычно, однако, используется энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают SV40-энхансер на позднем участке сайта инициации репликации (100-270 п.о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы на позднем участке сайта инициации репликации и аденовирусные энхансеры. См. Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) об энхансерных элементах для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть вставлен в вектор в 5'- или 3'-положении к последовательности, кодирующей полипептид антитела, но, предпочтительно, расположен на 5'-стороне промотора.

(vi) Компонент терминации транскрипции

Экспрессирующие векторы, используемые для эукариотической экспрессии, будут обычно также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обыкновенно доступны из 5'- и, изредка, 3'-нетранслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибирующиеся как полиаденилируемые фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Один пригодный компонент терминации транскрипции

представляет участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. патент WO094/11026 и экспрессирующие векторы, раскрытые в нем.

(vii) Трансформация и отбор клеток-хозяев

Подходящие клетки-хозяева для клонирования и экспрессии ДНК в векторах здесь включают клетки высших эукариот, описанные здесь, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культура тканей) стало рутинной процедурой. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 из печени мартышки, трансформированная SV-40 (COS-7, депозит CRL 1651 в ATCC); линия почки эмбриона человека (293 или 293 клетки, субклонированные для роста в суспензионной культуре, статья Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки сирийского хомячка (ВНК, депозит CCL 10 в ATCC); клетки яичников китайского хомячка, дефицитных по DHFR (CHO, статья Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, статья Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки мартышки (CV1, депозит CLL 70 в ATCC); клетки африканской зеленой мартышки (VERO-76, депозит CRL-1587 в ATCC); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, депозит CCL 2 в ATCC); клетки почки собаки (MDCK, депозит CCL 34 в ATCC); клетки печени серой крысы (BRL 3A, депозит CRL 1442 в ATCC); клетки легкого человека (W138, депозит CCL 75 в ATCC); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, депозит CCL 51 в ATCC); клетки TRI (статья Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982)); клетки MRC5; клетки FS4; линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными экспрессирующими векторами или векторами для клонирования для получения антител и культивируют в стандартной питательной среде, измененной соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

(viii) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, применимые для получения антитела согласно изобретению, могут быть культивированы в множестве сред. Доступные в продаже среды, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), и Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), (Sigma)), подходят для культивирования клеток-хозяев. В дополнение любая из сред, описанных у Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США Re. 30985, может быть использована как среда для культивирования клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть дополнена по необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или фактор роста эпидермиса), солями (такими как хлоридом натрия, кальцием, магнием и фосфатом), буферами (такими, как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственный препарат GENTAMICYN™), микроэлементами (определенные как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярных пределах) и глюкозой, или равноценными источниками энергии. Любые другие необходимые добавки могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые были бы известны специалистам. Условия культивирования, такие как температура, pH и аналогичные им, являются теми, что ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для технического персонала.

(xi) Очистка антител

При применении рекомбинантных технологий антитела могут быть получены внутриклеточно или прямо секретированы в среду. Если антитело получено внутриклеточно, в качестве первого шага удаляют дебрис в виде частиц или клеток-хозяев или лизированных фрагментов, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. В том случае, если антитело секретируется в среду, супернатанты таких систем экспрессии, в общем, сначала концентрируют, используя коммерчески доступные фильтры для концентрации белков, например, Amicon или Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Протеазный ингибитор, такой как PMSF, может быть включен в любой из предыдущих шагов для ингибирования протеолиза, и антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязнений.

Препарат антитела, полученный из клеток, может быть очищен с использованием, например, хроматографии на гидроксипатите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от биологического вида (к которому принадлежит антитело) и изотипа любого Fc-домена иммуноглобулина, который находится в антителе. Белок А может быть использован для очистки антител, которые основаны на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется использовать для всех изотипов мышинных антител и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Носителем, к которому пришивают аффинный лиганд, наиболее часто является агароза, но доступны другие носители. Устойчивые к механическим нагрузкам носители, такие как стекло с контролируемым размером пор или полистиролдивинилбензол, позволяют использовать более высокую скорость потока и более короткое время процесса очистки, чем те, что можно достигнуть, используя агарозу. В тех случаях, где антитело содержит C_H3-домен, для очистки пригодна смола Bakerbond ABXTMresin (производства J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Другие методики для очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, HPLC на обращенной фазе, хроматография на оксиде кремния, хроматография на гепарине, иммобилизованном на сефарозе (SEPHAROSETM), хроматография на анион- или катионообменной смоле (такой как колонка с носителем полиаспарагиновой кислоты), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от выделяемого антитела.

После любого(ых) предварительного(ых) шага(ов) очистки смесь, содержащая антитело, представляющее интерес, и примеси, может быть подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия при низком pH, используя элюирующий буфер со значением pH, находящимся между, примерно, 2,5-4,5, предпочтительно, проведенной при низких концентрациях соли (например, от, примерно, 0 до 0,25 М).

Методы определения активности

Антитела настоящего изобретения могут быть охарактеризованы по своим физико-химическим свойствам и биологическим функциям посредством различных известных методов.

Очищенные иммуноглобулины могут быть далее охарактеризованы посредством ряда методов, включающих, без ограничения, N-концевой сиквенс (определение N-концевой аминокислотной последовательности), аминокислотный анализ, неденатурирующую эксклюзионную хроматографию при высоком давлении (HPLC), масс-спектрометрию, ионообменную хроматографию и расщепление папаином.

В определенных вариантах осуществления изобретения получаемые иммуноглобулины анализируют по биологической активности. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноглобулины согласно изобретению тестируют на их способность связывать антиген. Известные методы определения антигенсвязывающей способности могут быть использованы здесь и включают без ограничения любой прямой или конкурентный метод определения антигенсвязывающей способности при помощи методов, таких как Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), «сэндвич» иммуноанализы, методы иммунопреципитации, методы флуоресцентного иммуноанализа и методы иммуноанализа с белком А. Показательные антигенсвязывающие методы предоставлены ниже в разделе Примеры.

В одном варианте осуществления изобретения настоящее изобретение рассматривает измененное антитело, которое обладает некоторыми, но не всеми, эффекторными функциями, которые делают его желаемым претендентом для многих применений, в которых период полужизни антитела *in vivo* является важным, а определенные эффекторные функции (такие как взаимодействие с системой комплемента и ADCC) являются лишними или вредными. В определенных вариантах осуществления изобретения активность Fc-домена полученного иммуноглобулина измеряется, чтобы удостовериться, что сохранены только желаемые свойства. *In vitro* и/или *in vivo* методы определения цитотоксичности могут быть проведены для подтверждения уменьшения/истощения CDC и/или ADCC активности. Например, методы связывания с Fc-рецептором (FcR) могут быть проведены, чтобы удостовериться, что антитело не обладает способностью связывать FcγR (следовательно, вероятно, не обладает ADCC активностью), но сохраняет FcRn связывающую способность. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcRI, FcRII и FcRIII. Экспрессия FcR в гематopoэтических клетках суммирована в Таблице 3 на стр.464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Пример *in vitro* анализа для оценки ADCC активности молекулы, представляющей интерес, описан в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, применимые для таких анализов, включают периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC) и естественные киллеры (NK) клетки. В качестве альтернативы или дополнительно, ADCC-активность изучаемой молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как раскрыта у Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Проверка способности связывать C1q может быть также проведена для подтверждения того, что антитело не способно связываться с C1q и, следовательно, не обладает CDC-активностью. Для оценки активации комплемента, анализ активации CDC, например, как описано у Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996), может быть проведен. Связывание FcRn и определение *in vivo* клиренса/полужизни могут также быть проведены с использованием известных методов.

Гуманизированные антитела

Настоящее изобретение охватывает гуманизированные антитела. Известны различные методы для создания гуманизированных антител на основе антител, принадлежащих другим видам (кроме человека). Например, гуманизированное антитело может иметь один или несколько аминокислотных остатков, встроенных в него из источника, который принадлежит другому виду (кроме человека). Эти аминокислотные остатки (принадлежащие к любому виду, кроме человека) часто называются «импортными» остатками, которые обычно берут из «импортируемого»

вариабельного домена. Создание гуманизированных антител может быть в целом проведено, следуя методике Уинтера и коллег (Winter and co-workers) (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Reichmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534-1536), посредством замещения последовательностей

гипервариабельного участка соответствующими последовательностями антитела человека. Соответственно такие “гуманизированные” антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), где значительно меньший участок, чем целый вариабельный домен человека, замещен соответствующей последовательностью из другого вида (кроме человека). На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые аминокислотные остатки гипервариабельного участка и, возможно, некоторые аминокислотные остатки каркасного участка замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор вариабельных доменов человека, как легких, так и тяжелых, для применения в получении гуманизированных антител является очень важным для уменьшения антигенных свойств. В соответствии с так называемым методом “максимального соответствия” последовательность вариабельного домена антитела грызуна сравнивается с полной библиотекой известных последовательностей вариабельных доменов человека. Человеческая последовательность, которая является наиболее близкой к последовательности грызуна, принимается как каркасная человеческая последовательность для гуманизированного антитела (Sims et al. (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901). В другом методе используют определенную каркасную последовательность, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител определенной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одинаковая каркасная последовательность может быть использована для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623).

Кроме того, важно, чтобы полученные гуманизированные антитела сохраняли высокую аффинность в отношении антигена, а также другие подходящие биологические свойства. Для достижения этой цели одним из методов гуманизированные антитела получают посредством анализа родительских последовательностей и различных теоретических гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются широко доступными и известны специалистам. Доступными являются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатов последовательностей иммуноглобулинов. Изучение этих отображений позволяет анализировать возможную роль этих остатков в функционировании кандидатов последовательностей иммуноглобулинов, то есть остатков, которые влияют на способность кандидата иммуноглобулина связывать его антиген. Таким путем остатки каркасного участка могут быть выбраны и объединены из реципиентных и импортируемых последовательностей так, что достигается желательное свойство антитела, такое как увеличенная аффинность в отношении антигена-мишени. Обычно остатки гипервариабельного участка напрямую и наиболее существенно влияют на связывание антигена.

Варианты антител

В одном аспекте изобретение предоставляет антитело, содержащее модификации на поверхности Fc-полипептидов, содержащих Fc-участок, где модификации облегчают

и/или способствуют гетеродимеризации. Эти модификации содержат встраивание выступа в первый Fc-полипептид и впадины во второй Fc-полипептид, где выступ подходит к впадине так, что способствуют комплексообразованию между первым и вторым Fc-полипептидами. Известны способы создания антител с такими модификациями, например, как описаны в патенте США № 5731168.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрена(ы) модификация(ии) описанных здесь аминокислотных последовательностей антител. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела получают посредством встраивания подходящих нуклеотидных замен в нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков внутри аминокислотных последовательностей антитела. Любое сочетание делеции, вставки или замены сделано, чтобы достигнуть конечной конструкции, обеспечивая то, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные замены могут быть вставлены в аминокислотную последовательность получаемого антитела во время, когда получают последовательность.

Полезный метод для идентификации определенных остатков или участков антитела, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется «аланиновый сканирующий мутагенез», как описано у Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Здесь остаток или группа целевых остатков идентифицируется (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и замещаются нейтральными или негативно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительно, аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с антигеном. Местоположение этих аминокислот, демонстрирующее функциональную чувствительность к заменам, затем уточняется посредством представления дальнейших или других вариантов на или для мест замены. Так, пока место для вставления вариации аминокислотной последовательности предопределено, природа самой мутации не нуждается в предопределении. Например, для анализа действия мутации в данном месте аланиновое сканирование или случайный мутагенез могут быть проведены для кодона-мишени или участка и экспрессированные иммуноглобулины скринируют по желательной активности.

Вставки аминокислотной последовательности включают аминокислотные и/или карбокси-концевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептида, содержащего сотню или более остатков, так же как вставки внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метиониновым остатком или антитело, соединенное с цитотоксичным полипептидом. Другие варианты вставок в молекулу антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или с полипептидом, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

Другой тип вариантов антител является вариант аминокислотных замен. Эти варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный другим остатком. Места, представляющие наибольший интерес для замен мутагенезом, включают гипервариабельные участки, но изменения в каркасных участках также предусмотрены. Консервативные замены показаны в Таблице 1 под заголовком “предпочтительные замены”. Если такие замены приводят к

изменениям в биологической активности, тогда более существенные замены, обозначенные “примерные замены” в Таблице 1, или, как далее описаны ниже в ссылке на классы аминокислот, могут быть вставлены, и продукт скринирован.

5	Таблица 1		
	Исходный остаток	Примерные замены	Предпочтительные замены
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
10	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
15	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
	Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
20	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
25	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Важные модификации биологических свойств антитела выполняются посредством выбора замен, которые существенно отличаются в своих эффектах на поддержание (а) структуры полипептидного остова в районе замещения, например, складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (с) объема боковой цепи. Аминогруппы могут быть сгруппированы в соответствии со сходством свойств их боковых цепей (A.L. Lehninger, Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) кислые: Asp (D), Glu (E)

(4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H)

В качестве альтернативы встречающиеся в природе аминокислотные остатки могут быть разделены на группы, основанные на общих свойствах боковых цепей:

(1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены будут вызывать обмен члена одного из этих классов на другой класс. Такие замещенные остатки также могут быть вставлены в сайты консервативных замен или, более предпочтительно, в остающиеся (не консервативные) сайты.

Один тип замещающего варианта включает замещение одного или нескольких остатков в гипервариабельном участке родительского антитела (например,

гуманизированного или человеческого антитела). В общем, получающий(ие)ся вариант(ы), отобранные для дальнейшей разработки, будут иметь улучшенные биологические качества относительно родительского антитела, из которого они были получены. Удобный путь для получения таких замещающих вариантов включает

5 созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Кратко, несколько мест гипервариабельного участка (например, 6-7 мест) мутируют, чтобы получить все возможные аминокислотные замены для каждого сайта. Полученные таким образом антитела представлены в филаментных фаговых частицах в виде слияний с продуктом

10 экспрессии гена III фага M13, упакованного внутри каждой частицы. Варианты, представленные в фаговом дисплее, затем подвергают скринингу на предмет обнаружения биологической активности (например, активности связывания), как раскрыто здесь. Затем, чтобы идентифицировать сайты гипервариабельного участка для модификации, может быть проведен аланиновый сканирующий мутагенез для

15 обнаружения аминокислотных остатков гипервариабельного участка, вносящих значительный вклад в связывание антигена. В качестве альтернативы или дополнительно может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для обнаружения точек соприкосновения между

20 антигеном и антителом. Такие аминокислотные остатки, участвующие в контакте, и окружающие их аминокислотные остатки являются кандидатами для замен в соответствии с используемой здесь методикой. Как только такие варианты созданы, подборка таких вариантов подвергается скринингу, как описано здесь, и антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах могут

25 быть отобраны для дальнейшей работы.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, получают посредством множества известных методов. Эти методы включают в себя, без ограничения, выделение из природного источника (в

30 случае встречающихся в природе вариантов аминокислотных последовательностей) или получение посредством олигонуклеотиднаправленного (или сайтнаправленного) мутагенеза, ПЦР мутагенеза и касетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антитела.

Может быть желательно вставить одну или несколько аминокислотных

35 модификаций в Fc-участок полипептидов иммуноглобулина согласно изобретению, таким образом получая вариант Fc-участка. Вариант Fc-участка может содержать последовательность Fc-участка человека (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 Fc-участок человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в

40 одной или нескольких аминокислотных положениях, включая и шарнирный цистеин.

В соответствии с этим описанием и научными идеями в некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрено, что антитело, используемое в способах согласно изобретению, может содержать одно или несколько изменений по сравнению с аналогичным ему антителом дикого типа, например на Fc-участке. Эти антитела тем

45 не менее сохраняли бы по сути такие же характеристики, требуемые для терапевтического применения, по сравнению с аналогичными им антителами дикого типа. Например, считается, что определенные изменения, которые могут быть сделаны в Fc-участке, могли бы привести к измененному (то есть или улучшенному, или

50 уменьшенному) связыванию с C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте WO99/51642. См. также Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc-участка.

Иммуноконъюгаты

Изобретение также принадлежит к иммуноконъюгатам или конъюгатам антитело-лекарство (ADC), содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксичным агентом, таким как химиотерапевтический агент, лекарство, ингибитор роста, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериальной, грибной, растительной или животной природы или его фрагменты) или радиоактивным изотопом (то есть радиоконъюгат).

Применение конъюгатов антитело-лекарство для местной доставки цитотоксичных или цитостатических агентов, то есть лекарств, которые убивают или ингибируют опухолевые клетки в лечении рака (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; патент США № 4975278), теоретически позволяет целевую доставку лекарственной части до опухолей и внутриклеточное накопление в них, где системное применение этих неконъюгированных лекарственных агентов может привести к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток, так же как и для опухолевых клеток, которые подлежат уничтожению (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», in *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed. s), pp. 475-506). Таким образом, идет поиск максимальной эффективности при минимальной токсичности. Сообщается, что как поликлональные, так и моноклональные антитела применимы для этих стратегий (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Лекарства, применимые в этих методиках, включают дауномицин, доксорубин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., (1986), см. выше). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) и калихеамицин (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Токсины могут проявлять свои цитотоксичные и цитостатические эффекты через механизмы, включающие связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксичные лекарства имеют тенденцию терять активность, или их активность становится меньше, если они присоединены к большим (по размеру) антителам или лигандам белковых рецепторов.

ZEVALIN® (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idec) является конъюгатом антитела и радиоактивного изотопа, состоящим из мышинового IgG1 каппа моноклонального антитела, полученного против CD20 антигена, найденного на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов, и ^{111}In или ^{90}Y радиоизотопов, связанных посредством линкера-хелатирующего агента тиомочевины (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Хотя ZEVALIN имеет активность против неходжкинской В-клеточной лимфомы, его применение приводит к тяжелой и длительной цитопении у большинства пациентов. MYLOTARG® (гемтузумаб озогамин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антитела и лекарственного вещества, состоящего из человеческого анти CD33-антитела, пришитого к калихеамицину, был одобрен в 2000 году для лечения острой миелоцитарной лейкемии посредством инъекций (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686;

патенты США №№ 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), конъюгат антитела и лекарственного вещества, состоящий из человеческого анти С242 антитела, пришитого через дисульфидный линкер SPP к лекарственной части - майтанзиноиду, DM1, заявлен на фазу II испытаний для лечения раков, которые экспрессируют CanAg (антиген), таких как рак прямой кишки, поджелудочной железы, желудка и других. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), конъюгат антитела и лекарственного вещества, состоящий из моноклонального антитела против специфического мембранного антигена простаты (PSMA), пришитого к лекарственной части - майтанзиноиду, DM1, находится в стадии разработки для потенциального лечения опухолей простаты. Пептиды ауристатина, ауристатин Е (АЕ) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетические аналоги доластатина были конъюгированы с химерными моноклональными антителами сBR96 (специфичными к антигену Lewis Y на клетках карцином) и сAC10 (специфичными к антигену CD30 на клетках злокачественных новообразований крови) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) и находятся в стадии разработки для терапии.

Химиотерапевтические агенты, применимые для создания таких иммуноконъюгатов, были описаны выше. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки лаконоса американского (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Множество радионуклидов доступно для получения конъюгатов антител и радионуклидов. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают, используя ряд бифункциональных реагентов для сшивки белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)-пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как хлорид диметилимида адипиновой кислоты), активные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), бис-дiazониевые производные (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бифункциональные фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен как описано у Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). Меченная углеродом 14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен-триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примерным хелатирующим агентом для конъюгирования радионуклида и антитела. См. патент WO94/11026.

Конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, майтанзиноиды, трихотецен и CC1065, и производные этих токсинов, которые имеют токсиную активность, также рассмотрены здесь.

Майтанзин и майтанзиноиды

В одном варианте осуществления изобретения антитело (полноразмерное или фрагменты) согласно изобретению конъюгировано с одной или несколькими молекулами майтанзиноидов.

Майтанзиноиды являются ингибиторами митоза, которые действуют путем

ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин впервые был выделен из африканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Впоследствии было обнаружено, что определенные микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и С-3-эфиры майтанзинола (патент США № 4151042).

Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги раскрыты, например, в патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533, раскрытие которых, таким образом, ясно включено посредством ссылки.

Конъюгаты майтанзиноид-антитело

В попытке улучшить терапевтический индекс майтанзин и майтанзиноиды были конъюгированы с антителами, специфично связывающимися с антигенами опухолевых клеток. Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды и их терапевтическое применение, раскрыты, например, в патентах США №№ 5208020, 5416064 и европейском патенте EP 0 425 235 B1, раскрытие которых, таким образом, включено посредством ссылки. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) описывал иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначенный DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против рака прямой и ободочной кишки. Было найдено, что конъюгат является высокоцитотоксичным в отношении культивируемых клеток рака прямой кишки и показывает противоопухолевое действие при анализе его действия на рост опухоли *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) описывает иммуноконъюгаты, в которых майтанзиноид конъюгирован через дисульфидный линкер с мышинным антителом A7, связывающимся с антигеном на линиях рака прямой кишки человека, или с другим мышинным моноклональным антителом TA.1, которое связывает онкоген HER-2/neu. Цитотоксичность TA.1-майтанзиноид конъюгата была протестирована *in vitro* на человеческой линии рака молочной железы SK-BR-3, которая экспрессирует $3 \cdot 10^5$ HER-2 поверхностных антигенов на клетку. Лекарственный препарат на основе конъюгата достигал уровня цитотоксичности, сходного со свободным препаратом майтанзиноида, который (уровень) может быть увеличен посредством увеличения количества молекул майтанзиноида на молекулу антитела. A7-майтанзиноид конъюгат показал низкую системную цитотоксичность на мышах.

Конъюгаты антитело-майтанзиноид (иммуноконъюгаты)

Конъюгаты антитело-майтанзиноид получают, химически пришивая антитело к молекуле майтанзиноида без значительного уменьшения биологической активности или антитела или молекулы майтанзиноида. В среднем 3-4 молекулы майтанзиноида, связанные с молекулой антитела, показывали эффективность в увеличении цитотоксичности в отношении клеток-мишеней, без негативного влияния на функцию или растворимость антитела, хотя, ожидалось бы, что даже одна молекула токсина на антитело увеличивала цитотоксичность относительно самого антитела.

Майтанзиноиды хорошо известны и могут быть синтезированы посредством известных методик или выделены из природных источников. Подходящие майтанзиноиды раскрыты, например, в патенте США № 5208020 и других патентах и непатентных публикациях, упомянутых выше. Предпочтительными майтанзиноидами являются майтанзинол и аналоги майтанзинола, модифицированные по ароматическому кольцу или другим положениям молекулы майтанзинола, такие как различные эфиры майтанзинола.

Существует множество известных линкерных групп для создания конъюгатов

антитело-майтаниноид, включающие, например, те, что раскрыты в патенте США № 5208020 или европейском патенте 0 425 235 B1 и Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992). Линкерные группы включают дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолabile группы, фотолabile группы, пептидазолabile группы или эстеразолabile группы, как раскрыто в вышеуказанных патентах, дисульфидные и тиоэфирные группы являются предпочтительными.

Конъюгаты антител и мйтаниноидов могут быть созданы с использованием множества бифункциональных агентов для сшивания белков, такие как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (хлорид диметилимида адипиновой кислоты), активные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), бис-диазониевые производные (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бифункциональные фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифторо-2,4-динитробензол). Особо предпочтительные связывающие агенты включают в себя N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP) для обеспечения дисульфидной связи.

Линкер может быть прикреплен к молекуле мйтаниноида в различных положениях, зависящих от типа связи. Например, эфирная связь может быть образована путем реакции с гидроксильной группой, используя стандартные методы для образования связи. Реакция может пройти в C-3-положение, имеющее гидроксильную группу, в положение C-14, модифицированное гидроксиметилом, в положение C-15, модифицированное гидроксильной группой, и в положение C-20, имеющее гидроксильную группу. В предпочтительном варианте осуществления изобретения связь образуется в положение C-3 мйтанинола или аналога мйтанинола.

Калихеамицин

Другой иммуноконъюгат, представляющий интерес, содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина.

Калихеамициновое семейство антибиотиков способно генерировать разрывы в двухцепочечной ДНК при концентрациях ниже пикомолярных. Для получения конъюгатов с представителями семейства калихеамицинов см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все принадлежат компании American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые могут быть использованы, включают, без ограничения, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ_1^I (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты, принадлежащие компании American Cyanamid). Другой противоопухолевый препарат, с которым можно конъюгировать антитело, это QFA, являющийся антифолатом. И калихеамицин и QFA имеют внутриклеточные мишени и с трудом пересекают плазматическую мембрану. Поэтому поглощение клетками этих агентов вследствие опосредованной антителами интернализации значительно увеличивает их цитотоксические эффекты.

Другие цитотоксические агенты

Другие противоопухолевые агенты, которые могут быть присоединены к антителам согласно изобретению, включают BCNU, стрептозоин, винкристин и 5-фторурацил, семейство агентов, известных под общим названием LL-E33288-комплекс,

описанный в патентах США 5053394, 5770710, так же как эсперамицины (патент США 5877296).

Токсины, обладающие ферментной активностью, и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают в себя А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки лаконоса американского (РАРІ, РАРІІ и РАР-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, патент WO93/21232, опубликованный 28 октября, 1993 года.

Настоящее изобретение далее рассматривает иммуноконъюгат, образованный между антителом и соединением, обладающим нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для селективного разрушения опухоли антитело может содержать высокорadioактивный атом. Ряд радиоактивных изотопов доступен для получения радиоаконъюгированных антител. Примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. Когда конъюгат применяется для детекции, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например, tc^{99m} , или I^{123} , или спиновую метку для ядерно-магнитной-резонансной (ЯМР) томографии (известной так же как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как иод-123 снова, иод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивная и другие метки могут быть включены в конъюгат известными методами. Например, пептид может быть получен посредством биосинтеза или химического аминокислотного синтеза с использованием соответствующих предшественников аминокислот, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как tc^{99m} или I^{123} , Re^{186} , Re^{188} и In^{111} , могут быть присоединены через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 может быть присоединен через остаток лизина. IODOGEN метод (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) может быть применен для включения иода-123. Книга "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) описывает подробно другие методы.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть приготовлены с использованием ряда бифункциональных агентов для сшивания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (диметиладипинат HCl), активированные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), бис-дiazониевые производные (такие как бис-(п-diazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бифункциональные фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен, как описано у Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен-триаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для присоединения радионуклида к антителу. См. патент WO94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного соединения в клетке. Например, кислотолabile линкер, чувствительный к действию пептидаз линкер,

фотолабильный линкер, диметильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); патент США № 5208020) могут быть использованы.

Соединения согласно изобретению точно предполагают, без ограничения, ADC (конъюгат антитело-лекарственное соединение), полученное с помощью кросс-сшивающих реагентов: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфонил)-бензоат), которые являются доступными (например, от компании Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). См. стр. 467-498, 2003-2004 каталога и методической брошюры.

Получение конъюгатов антител и лекарственных соединений

В конъюгате антитела и лекарственного соединения (ADC) согласно изобретению антитело (Ab) присоединено к одной или нескольким частям лекарственного соединения (D), например, от, примерно, 1 до, примерно, 20 частей лекарственного соединения на молекулу антитела, через линкер (L). ADC Формулы I может быть получен несколькими путями, используя реакции органической химии, условия и реагенты, известные специалистам, включающие: (1) реакцию нуклеофильной группы антитела с бивалентным линкерным реагентом с образованием соединения Ab-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с лекарственной частью D; и (2) реакция нуклеофильной группы лекарственной части с бивалентным линкерным реагентом с образованием соединения D-L через ковалентную связь, с последующей реакцией с нуклеофильной группой антитела.



I

Нуклеофильные группы антител включают в себя, без ограничения: (i) N-концевые аминокислоты, (ii) аминокислоты боковых цепей, например, лизина, (iii) тиогруппы боковых цепей, например, цистеина и (iv) гидроксилы сахаров или аминокислоты в случае, если антитело гликозилировано. Амино, тии и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны вступать в реакции с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных частях и линкерными реагентами, включающими в себя: (i) активные эфиры, такие как NHS (N-гидроксисукцинимид) эфиры, NOBt (1-гидроксibenзотриазол) эфиры, галогенформиаты и кислые галогениды; (ii) алкил и бензил галогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы. Определенные антитела имеют восстанавливаемые дисульфидные связи между цепями, то есть цистеиновые мостики. Антитела могут быть созданы реакционноспособными для конъюгирования с линкерными реагентами посредством обработки восстанавливающим агентом, таким как DTT (дифитотреитол). Каждый цистеиновый мостик таким образом будет образовывать две реакционноспособные тиольные нуклеофильные группы. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть включены в антитела через реакцию лизинов с 2-иминотиолоном (реагентом Траута), давая в результате превращение амина в тиол.

Конъюгаты антител и лекарственных соединений могут быть получены модификацией антитела для добавления электрофильных частей, которые могут вступать в реакцию с нуклеофильными заместителями линкерного реагента или лекарственного вещества. Можно подвергнуть окислению сахара гликозилированного антитела, например, периодатными окислительными реагентами

для образования альдегидных или кетонных групп, которые могут вступать в реакции с аминогруппами линкерных реагентов или частей лекарственных веществ.

Получающиеся в результате иминогруппы оснований Шиффа могут образовывать стабильную связь или их можно восстановить, например, боргидридными реагентами

5 для образования стабильных аминных связей. В одном варианте осуществления изобретения реакция углеводородной части гликозилированного антитела с или галактозооксидазой, или метапериодатом натрия может давать на выходе карбонильные (альдегидные или кетонные) группы в белке, которые могут

10 реагировать с подходящими группами лекарственного вещества (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления изобретения белки, содержащие N-концевые остатки серина или треонина, могут вступать в реакцию с метапериодатом натрия, давая в результате альдегид вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; патент США № 5362852). Такой альдегид можно ввести в реакцию с лекарственной частью или линкерной нуклеофильной группой.

Также нуклеофильные группы или лекарственная часть включают в себя, без ограничения: амин, тиол, гидроксил, гидразид, оксим, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразидные группы, способные вступать в реакции с образованием ковалентных связей с электрофильными группами, находящимися на линкерной части, и линкерные реагенты, включающие в себя (i) активные эфиры, такие как NHS (N-гидроксисукцинимид) эфиры, HOBt (1-гидроксibenзотриазол) эфиры, галогенформиаты и кислые галогениды; (ii) алкил и бензил галогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы.

В качестве альтернативы гибридный белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, может быть получен, например, с помощью рекомбинантных методик или пептидного синтеза. ДНК по своей длине может содержать 30 соответствующие участки, кодирующие две части конъюгата или примыкающие один к другому или разделенные участком, кодирующим линкерный пептид, который не разрушает желаемые свойства конъюгата.

В еще одном варианте осуществления изобретения антитело может быть присоединено к «рецептору» (такому как стрептавидин) для применения в 35 предварительном направлении на опухоль, где конъюгат антитело-рецептор вводится пациенту с последующим удалением несвязанного конъюгата из циркуляции при помощи очищающего агента и затем введения «лиганда» (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим агентом (например, радионуклидом).

40 Производные антител

Антитела согласно изобретению могут в дальнейшем быть модифицированы, чтобы содержать дополнительные небелковые части, которые известны и легко доступны. Предпочтительно, чтобы эти вещества, подходящие для получения производных антител, были водорастворимыми полимерами. Неограничивающие 45 примеры водорастворимых полимеров включают в себя, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этиленового и малеинового ангидридов, полиаминокислоты (или гомополимеры или случайные сополимеры) и декстран или поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры оксидов полипропилена и этилена, полиоксиэтилированные полиспирты (например, глицерин), поливиниловый спирт и 50

их смеси. Полиэтиленгликоль пропионовый альдегид может иметь преимущества при изготовлении из-за его стабильности в воде. Полимер может быть любого молекулярного веса и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и если присоединено больше одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. В общем, число и/или тип полимеров, используемых для получения производных, может быть определено, основываясь на соображениях, включающих, без ограничения, определенные свойства или функции улучшаемого антитела, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях и т.д.

Фармацевтические композиции

Терапевтические композиции, содержащие антитело согласно изобретению и приготовленные для хранения посредством смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, инертными наполнителями или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде водных растворов, лиофилизированные или в других сухих лекарственных формах. Приемлемые носители, инертные наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, гистидиновый или на основе других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (меньше, чем 10 аминокислотных остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Здесь композиция может также содержать более чем одно действующее соединение, по необходимости конкретного показания для лечения, предпочтительно, те, что имеют дополняющие друг друга действия, которые не влияют негативно друг на друга. Такие молекулы присутствуют надлежащим образом в соединении в эффективных количествах для намеченной цели.

Активные ингредиенты могут также быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, посредством методик коацервации или межфазной полимеризацией, например, гидроксиметилцеллюлозы или желатиновых микрокапсул и поли-(метилметакрилат)ных микрокапсул соответственно в виде коллоидных систем доставки лекарственных веществ (например, липосом, альбуминовых микросфер, микроэмульсий, наночастиц и микрокапсул) или в виде макроэмульсий. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Лекарственные формы для применения in vivo должны быть стерильны. Это легко достигается фильтрацией через стерильные фильтровальные мембраны.

Могут быть приготовлены препараты с пролонгированным действием.

Подходящие примеры препаратов с пролонгированным действием включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие иммуноглобулин согласно изобретению, которые имеют определенную форму, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц для пролонгированного действия лекарств включают в себя полиэферы, гидрогели (например, поли-(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагающийся этиленвинилацетат, разлагающиеся сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и леuproлида ацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксibuтировую кислоту. Хотя полимеры, такие как этилен-винил ацетат и сополимер молочной и гликолевой кислот, способны к высвобождению молекул на протяжении более 100 дней, отдельные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких отрезков времени. Когда иммуноглобулины, заключенные в капсулы, остаются в организме на более длительный период времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влажности при 37°C, приводящему к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Рациональные стратегии могут быть разработаны для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Для примера, если обнаружено, что агрегирование возникает за счет образования межмолекулярных S-S связей через тиодисульфидный обмен, можно достигнуть стабилизации через модификацию сульфгидрильных остатков, лиофилизирование из кислых растворов, контролирование содержания влаги с использованием подходящих добавок и разработку особых композиций полимерных матриц.

В отдельных вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат, содержащий антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, назначался пациенту. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат и/или антиген, с которым он связан, интернализуются клеткой, что приводит к возросшей терапевтической эффективности иммуноконъюгата в способности убить клетку, с которой он связывается. В одном варианте осуществления изобретения цитотоксический агент нацелен или взаимодействует с нуклеиновой кислотой в клетке-мишени. Примеры таких цитотоксических агентов включают в себя любой из химиотерапевтических агентов, упомянутых здесь (таких как майтанзиноид или калихеамицин), радиоизотоп или рибонуклеазу или ДНК эндонуклеазу.

Антитела согласно изобретению могут быть использованы или одни или в сочетании с другими композициями в терапии. Например, антитело согласно изобретению можно применить с другим антителом, химиотерапевтическим(и) агентом(ами) (включая коктейли химиотерапевтических агентов), другим(и) цитотоксическим(и) агентом(ами), ингибирующим(и) ангиогенез агентом(ами), цитокинами и/или агентом(ами), ингибирующим(и) рост клеток. В том случае, когда антитело согласно изобретению ингибирует рост опухоли, может быть особенно желательно сочетать его с одним или несколькими терапевтическим(и) агентом(ами), которые также ингибируют рост опухоли. Например, антитело согласно изобретению может быть совмещено с антителами против VEGF (фактора роста сосудистого эндотелия), блокирующими действие VEGF, и/или анти-ErbB (рецептор фактора роста эпидермиса) антителами (например, HERCEPTIN™, являющийся анти-HER-2 (рецептор фактора роста эпидермиса человека 2) антителом) при лечении метастазирующего рака молочной железы. В качестве альтернативы, или дополнительно, пациент может

получать комбинированную радиационную терапию (например, радиоактивное облучение с помощью внешнего источника радиации или терапию радиоактивно меченным веществом, таким как антитело). Отмеченная выше такая комбинированная терапия включает комбинированное применение (когда два или
 5 несколько агентов включены в одну или несколько лекарственных форм) и раздельное применение, в случае которого применение антитела согласно изобретению может быть до и/или после применения вспомогательной терапии или терапий.

Антитело согласно изобретению (или вспомогательное терапевтическое средство) вводится любыми подходящими способами, включающими парентеральный, подкожный, внутривенный, внутримышечный и интраназальный и, если
 10 желательно для местного лечения, применяется внутри пораженного участка. Парентеральные вливания включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутривенное или подкожное введение. В дополнение антитело надлежаще применяется посредством инфузии в импульсном режиме, особенно при уменьшающихся дозировках антитела. Лекарственные дозы могут быть
 15 введены любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенными или подкожными, зависящими частично является ли применение кратким или постоянным.

Композицию антитела согласно изобретению получают, разделяют на дозы и вводят, используя способы, широко используемые в медицинской практике. При этом
 25 следует учитывать такие факторы, как конкретное заболевание, подлежащее лечению, вид млекопитающего, подлежащего лечению, клиническое состояние конкретного пациента, причина заболевания, участок, в который доставляется средство, способ введения, режим введения, а также другие факторы, известные специалистам в области медицины.

Антитело не нуждается, но необязательно может иметь в композиции один или несколько агентов, использующихся на сегодняшний момент для лечения или
 30 предотвращения данного заболевания. Эффективные количества таких других агентов зависят от количества антител согласно изобретению, присутствующих в рецептуре, типа заболевания и лечения и других факторов, обсужденных выше. Они обычно
 35 применяются в таких же дозах и теми же путями, как применялись выше или, примерно, от 1 до 99% от прежде применяемых дозировок.

Для предотвращения или лечения болезни подходящая дозировка антитела согласно изобретению (при использовании в одиночку или в сочетании с другими
 40 агентами, такими как химиотерапевтические агенты) будет зависеть от типа заболевания, типа антитела, тяжести и течения болезни, применяется ли антитело с профилактической или терапевтической целями, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело и выбора лечащего терапевта. Антитело
 45 соответственно назначают пациенту одномоментно или в течение серии введений. В зависимости от типа и тяжести заболевания, примерно, от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг-10 мг/кг) антитела является начальной кандидатурной дозой для назначения пациенту, или, например, в виде одиночного или нескольких введений или
 50 путем продолжительной инфузии. Одна обычная дневная доза может варьировать в пределах от, примерно, 1 мкг/кг до 100 мг/кг или больше в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений в течение нескольких дней или более длительного времени в зависимости от состояния лечение продолжают до желаемого подавления симптомов болезни. Одна показательная дозировка антитела находилась

бы в пределах от, примерно, 0,05 мг/кг до, примерно, 10 мг/кг. Таким образом, одна или несколько дозировок из, примерно, 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любая их комбинация) может быть назначена пациенту. Такие дозировки могут быть назначены пациенту периодически, например, каждую неделю или каждые три недели (например, такие, что пациент получает от, примерно, двух до, примерно, двадцати, например, примерно, шесть доз антитела). Может быть назначена начальная более высокая дозировка с последующими одной или несколькими более низкими дозировками. Показательный режим введения лекарственного препарата содержит применение начальной дозы 4 мг/кг с последующей еженедельной поддерживающей дозой, примерно, 2 мг/кг в неделю антитела. Однако другие режимы введения могут быть полезными. Прогресс этой терапии можно легко наблюдать посредством стандартных методик и анализов.

Изделия

В другом аспекте изобретения предоставляется изделие, содержащее вещества, применимые для лечения, предотвращения и/или диагностики заболеваний, описанных выше. Изделие содержит упаковку и этикетку или вкладыш на упаковке или с упаковкой. Подходящие упаковки включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.п. Упаковки могут быть сделаны из ряда материалов, таких как стекло или пластик. Упаковка удерживает композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния и может иметь стерильное входное отверстие (например, упаковка может быть пакетом для внутривенного вливания или ампулой, имеющей пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное вещество в композиции является антителом согласно изобретению. Этикетка или вкладыш указывают, что композиция применима для лечения выбранного состояния, такого как рак. Более того, изделие может содержать (а) первую упаковку с композицией внутри, где композиция содержит антитело согласно изобретению; и (b) вторую упаковку с композицией внутри, где композиция содержит дополнительный цитотоксический агент. Изделие в этом варианте осуществления изобретения может дополнительно содержать вкладыш, указывающий, что первая и вторая композиция, содержащие антитело, могут быть применены для лечения конкретного состояния, например рака. В качестве альтернативы или дополнительно изделие может еще содержать вторую (или третью) упаковку, содержащую фармацевтически приемлемый буферный раствор, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатный буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включающие другие буферные растворы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

Нижеследующее является примерами способов и композиций согласно изобретению. Понятно, что различные другие варианты осуществления изобретения могут применяться на практике, данное общее описание предоставлено выше.

ПРИМЕРЫ

Материалы и Методы

Реагенты

Использовали трипсиновый ингибитор из кукурузы производства Haematologic Technologies (Essex Junction, VT) и хромогенный субстрат для HGFA Spectrozyme®fVIIa производства American Diagnostica (Stamford, CT). Растворимый HAI-1B (sHAI-1B) был экспрессирован в клетках яичников китайского хомячка и очищен, как описано

ранее [1]. Домен Кунитца ингибитора IV-49C был ранее описан [2] (Genentech, Inc., South San Francisco). Человеческий рекомбинантный HGFA (HGFA) был экспрессирован в бакуловирусной системе экспрессии, как описано ранее [1].

Методы анализа активации proHGF

5 Методы анализа активации proHGF и мечение proHGF с помощью реагента Iodogen были проведены, как было описано ранее (1,3). Коротко, HGFA преинкубировали с анти-HGFA-антителами или с sHAI-1B в HNC буфере (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего
 10 добавляли меченный ¹²⁵I proHGF в HNC буфере и инкубировали 4 часа при 37°C. Концентрации реагентов в конечной реакционной смеси были следующие: 2 nM HGFA, 0,05 мг/мл меченного ¹²⁵I proHGF, 0,1 мг/мл анти-HGFA-антител, 1 мкМ sHAI-1B. Через 4 часа были отобраны аликвоты и добавлены в буфер для нанесения
 15 образцов (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) с восстанавливающим агентом дитиотреитол (BIO-Rad). После кратковременного нагрева образцы (с активностью 10⁶ cpm на дорожку) были нанесены на 4-20% градиентный полиакриламидный гель (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). После электрофореза сухие гели были
 20 экспонированы с рентгеновской пленкой (X-OMAT AR, Eastman Kodak Company, Rochester, NY) в течение 10-20 мин. Пленки были проявлены (на автоматическом проявителе Kodak M35A X-OMAT Processor), отсканированы (на сканере Umax S-12, Umax Data Systems, Inc., Fremont, CA) и далее обработаны с помощью компьютерной программы Adobe V.6.0 Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

Эксперименты по измерению поверхностного плазмонного резонанса

25 Аффинности связывания анти-HGFA-антител с HGFA были определены посредством измерения поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIAcore 3000 (Biacore, Inc.). Преобразованное в полноразмерный (реклонированные с помощью ПЦР вариабельные и гипервариабельные участки из конструкций фагового
 30 дисплея в вектор для эукариотической экспрессии, содержащий константные участки) анти-HGFA-антитело IgG1 было иммобилизовано с плотностью 300 резонансных единиц (РЕд.) (1 РЕд. эквивалентна 1 пкг вещества на кв. мм поверхности сенсора) на проточных ячейках сенсорного чипа Pioneer CM5. Иммобилизация достигалась
 35 посредством случайных сшивок через аминокислотные группы с использованием протокола, предоставленного изготовителем. Сенсограммы записывались для связывания HGFA с этими поверхностями посредством впрыскивания серий растворов, варьирующих в пределах от 1 мкМ до 8 нМ, с двукратным изменением концентрации на каждом шаге. Сигнал из ячейки сравнения вычитался из наблюдаемой сенсограммы. Кинетические
 40 константы были посчитаны методом нелинейного регрессионного анализа данных в соответствии 1:1 с моделью связывания Лангмюра с использованием компьютерной программы, предоставленной производителем. В конкурентных экспериментах, HGFA (70 нМ) был преинкубирован с различными концентрациями sHAI-1B (4нМ-
 45 300нМ) или IV-49C (11нМ-300нМ) или низкомолекулярного соединения, связывающегося с активным участком HGFA (220 нМ-10 мкМ). После инкубации в течение 60 мин при комнатной температуре смесь фермента и ингибитора впрыскивали в проточные ячейки и записывали сенсограмму.

Метод анализа ингибирования ферментативной активности HGFA

50 Антитела или sHAI-1B инкубировали с HGFA (в конечной концентрации 5 нМ) в HBSA буфере (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 мг/мл BSA (БСА), 5 mM CaCl₂) в течение 20 мин при комнатной температуре. Spectrozyme®fVIIa (200 мкМ конечная концентрация, K_M=200 мкМ) добавляли и измеряли значения увеличения

светопоглощения при длине волны 405 нм, находящиеся в области линейной зависимости, на планшетном спектрофотометре (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Ингибирование ферментативной активности представляли как парциальную активность (v_i/v_0) от неингибированной активности.

Результаты и обсуждение

Идентификация анти-HGFA-антител методом фагового дисплея

Одним из методов идентификации антител является использование библиотеки антител в фагах. См., например, статью Lee et al. (4). Для идентификации антител против HGFA авторы изобретения провели четыре этапа пэннинга (поиск антител посредством пропускания смеси антител через носитель с иммобилизованным антигеном) с использованием прежде описанной человеческой синтетической фагмидной библиотеки антител ($F(ab')_2$ библиотеки). Планшеты были покрыты HGFA в концентрации 5 мкг/на лунку. Силу промывки увеличивали после каждого цикла, от 10-40 промывок. После трех циклов пэннинга наблюдали обогащение. После четырех циклов пэннинга 95 клонов были выбраны для анализа методом ELISA. После определения нуклеотидных последовательностей были найдены 67 уникальных клонов, связывающих HGFA. После проведения точечного конкурентного метода ELISA 24 клон были далее охарактеризованы, с использованием очищенных фаговых частиц для измерения значений IC_{50} , которые были определены с использованием стандартного фагового конкурентного метода ELISA. 14 уникальных клонов со значениями IC_{50} меньше 100 нМ были субклонированы в вектор PRK, содержащий последовательность человеческого IgG1. CDR-последовательности для этих клонов перечислены на Фиг.1. Тяжелые и легкие цепи (из гуманизированного антитела 4D5, как описано у Lee et al. (4)) анти-HGFA клонов были совместно трансфицированы в клетки 293 млекопитающих. После одной недели собирали супернатанты, свободные от сыворотки, и очищали антитела с использованием аффинной хроматографии на белке А.

Ингибирование ферментативной активности HGFA полноразмерными анти-HGFA-антителами

Выбранные антитела были преобразованы в полноразмерные антитела (IgG) посредством стандартных рекомбинантных методов. Эти полноразмерные антитела были протестированы методом анализа активации на макромолекулярных субстратах с использованием меченного ^{125}I proHGF. В течение 4 часов эксперимента HGFA полностью превращал proHGF в двуцепочечный HGF, и эта реакция могла быть ингибирована 1 мкМ sNAI-1B (Фиг.2А) в соответствии с предыдущими данными [1]. За исключением антитела № 49 (Фиг.1) все протестированные анти-HGFA-антитела при тестируемой концентрации 0,67 мкМ значительно ингибировали превращение proHGF (Фиг.2). Дополнительные эксперименты показали, что антитело № 58 ингибировало превращение proHGF при концентрациях таких низких, как 0,03 мкМ (Фиг.3). В соответствии с этими результатами антитело № 58 наиболее сильно ингибировало ферментативную активность HGFA в отношении низкомолекулярного синтетического субстрата Spectrozyme®fVIIa, имея IC_{50} 1,3 нМ, тогда как антитело № 49 не ингибировало при 500 нМ концентрации (Фиг.8). Более того, в соответствии с их относительно более низким ингибиторным действием в методах анализа активации proHGF, антитела № 39, № 86, № 90 и № 95 имели сравнительно более низкую активность в хромогенном субстратном анализе, имея IC_{50} больше 500 нМ (Фиг.8). 3 антитела № 42, № 61 и № 74 также показывали относительно низкое ингибирование ($IC_{50} > 500$ нМ), несмотря на то что почти полностью ингибировали

превращение ргоHGF при 0,67 мкМ (Фиг.8). Представляет интерес то, что антитело № 75 показывало необычную кинетику ингибирования в том, что ингибиторная активность достигала плато при, примерно, 70% ингибирования по сравнению с полным ингибированием антителом № 58 (Фиг.4).

Механизм ингибирования антителами № 75 и № 58

В свете полного ингибирования процессинга макромолекулярного субстрата антителом № 75 его неспособность полностью нейтрализовать ферментативную активность HGFA в отношении низкомолекулярного синтетического субстрата позволяла предположить, что антитело № 75 связывает функционально важный участок HGFA, находящийся вне или на близком расстоянии от активного сайта. В отличие от этого антитело № 58 сильно ингибировало процессинг посредством HGFA как и макромолекулярного, так и низкомолекулярного субстрата. Для достижения более подробного понимания вызываемых антителами механизмов ингибирования были проведены конкурентный анализ связывания с различными известными ингибиторами активного участка. Ранее были описаны три ингибитора активного участка HGFA: ингибитор, состоящий из двойного домена Кунитца, sHAI-1B [1], ингибитор, состоящий из одиночного домена Кунитца, IV-49C [2] и низкомолекулярное вещество, связывающее активный участок HGFA. IV-49C представляет собой домен Кунитца длиной в 62 аминокислоты, производное ингибитора предшественника β -белка болезни Альцгеймера (APP), и является специфичным ингибитором тканевого фактора/комплекса фактора VIIa [2]. Авторы изобретения нашли, что IV-49C является также сильным ингибитором ферментативной активности HGFA, имеющим IC_{50} 0,079 мкМ, тогда как низкомолекулярное вещество, связывающее активный участок HGFA, ингибировало с IC_{50} 0,8 мкМ ($K_i=0,4$ мкМ), как показано на Фиг.5.

K_D HGFA по отношению к иммобилизованному антителу №58 была 1,3 нМ (Фиг. 9), сходной с аффинностью, определенной в методах анализа амидолитической активности (Фиг.8). Данные поверхностного плазмонного резонанса показали, что sHAI-1B, IV-49C и низкомолекулярное вещество, связывающее активный участок HGFA, ингибировали связывание HGFA и антитела № 58. Это позволило предположить, что антитело № 58 или связывает непосредственно активный участок HGFA или проявляет аллостерическое влияние на активный участок.

Антитело № 75 имело более низкое связывание с HGFA (Фиг.6Е; Фиг.9), чем № 58. Более того, низкомолекулярное вещество, связывающее активный участок HGFA, не имело эффекта на связывание HGFA с антителом № 75, указывая на то, что антитело № 75 не связывает ядро активного участка. Представляет интерес то, что антитело № 75 частично ингибировало амидолитическую активность HGFA, позволяя предположить, что даже хотя эпитоп, который связывает № 75, находится вне активного участка HGFA, должна существовать молекулярная связь между этими двумя участками. Это могло бы объяснить частичный эффект sHAI-1B и IV-49C на связывание антитела № 75 (Фиг.9; Фиг. 6F,G).

Сходно с антителом № 75 два антитела № 74 и № 61 также связывают HGFA в присутствии низкомолекулярного вещества, связывающего активный участок HGFA, (Фиг.9), в то время как ингибиторы, состоящие из домена Кунитца, препятствовали их связыванию HGFA. Эти результаты позволили предположить, что эпитопы, которые связывают № 74 и № 61, лежат вне активного участка HGFA. Можно допустить, что антитела №64, № 71 и № 75 связывают внешний участок HGFA, который важен для взаимодействия с макромолекулярными субстратами, или они аллостерически влияют

на конформацию региона активного участка. В похожей по структуре сериновой протеазе факторе VIIa важный внешний участок находится между активным участком и петлей, связывающей кальций [5]. Антитела, также как и пептиды, которые связывают внешний участок фактора VIIa, являются сильными ингибиторами процессинга макромолекулярных субстратов [6,7]. Например, связывание пептидного ингибитора E76 влияет на конформационные изменения в одной из петель «активационного домена», таким образом разрушая участок взаимодействия с субстратом [7]. В дополнение эти изменения вызывают аллостерические эффекты в активном участке, что объясняет наблюдение, что пептид E76 ингибирует амидолитическую активность, несмотря на то что связывается вне региона активного участка [7].

Дополнительные эксперименты по конкурентному связыванию с биотинилированными антителами № 75 и №58 указывали на то, что №75 и №58 имеют перекрывающиеся эпитопы на HGFA (данные не показаны). Исследования кинетики ферментативной активности далее показали, что №58 является конкурентным ингибитором и что №75 является частично конкурентным ингибитором (т.е. просто перекрестным гиперболическим конкурентным ингибитором) (данные не показаны). Взяты вместе, эти результаты позволяют предположить, что оба антитела связываются вне активного участка HGFA и что они являются аллостерическими ингибиторами ферментативной активности HGFA.

Частичный список использованной литературы

1. Kirchhofer D, Peek M, Li W, Stamos J, Eigenbrot C, Kadkhodayan S, Elliott JM, Corpuz RT, Lazarus RA, Moran P. Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J. Biol. Chem.* 2003;278:36341-36349.

2. Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor•factor VIIa II. Potent and specific inhibitors by competitive phage selection. *J. Biol. Chem.* 1994;269:22137-22144.
3. Peek M, Moran P, Mendoza N, Wickramasinghe D, Kirchhofer D. Unusual proteolytic
5 activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J. Biol. Chem.* 2002;277:47804-47809.
4. Lee CV, Liang W-C, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. High-affinity human
10 antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J. Mol. Biol.* 2004;340.
5. Dickinson CD, Kelly CR, Ruf W. Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:14379-14384.
15
6. Dickinson CD, Shobe J, Ruf W. Influence of cofactor binding and active site occupancy on the conformation of the macromolecular substrate exosite of factor VIIa. *J. Mol. Biol.* 1998;277:959-971.
7. Dennis MS, Eigenbrot C, Skelton NJ, Ultsch MH, Santell L, Dwyer MA, O'Connell MP, Lazarus RA. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature.* 2000;404:465-470.
20
8. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925
25
9. Trusolino, L., and Comoglio, P. M. (2002) *Nature Rev. Cancer* 2, 289-300
10. Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M., and Birchmeier, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574-11578
30
11. Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992) *EMBO J* 11, 2503-2510
12. Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kitamura, N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119
35
13. Gak, E., Taylor, W. G., Chan, A. M.-L., and Rubin, J. S. (1992) *FEBS Lett.* 311, 17-21
14. Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028
40
15. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A., and Moran, P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 36341-36349
16. Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6370-6376
45
17. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18237-18242
50

18. Kawaguchi, T., Qin, L., Shimomura, T., Kondo, J., Matsumoto, K., Denda, K., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27558-27564
19. Marlor, C. W., Delaria, K. A., Davis, G., Muller, D. K., Greve, J. M., and Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12202-12208
20. Delaria, K. A., Muller, D. K., Marlor, C. W., Brown, J. E., Das, R. C., Rocznik, S. O., and Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12209-12214

Формула изобретения

1. Выделенное антитело, которое связывается с активатором фактора роста гепатоцитов человека (HGFA), где антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- (a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:3; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:4, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:5; или
- (b) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:6; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:8; или
- (c) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:9; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:10, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:11; или
- (d) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:12; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:13, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:14; или
- (e) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:16, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:17; или
- (f) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:18; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:19, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:20; или
- (g) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:21; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:22, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:23; или
- (h) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:24; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:25, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:26; или
- (i) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:27; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:28, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:29; или
- (j) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:30; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:31, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:32; или
- (k) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:33; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:34, последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:35; или
- (l) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:36; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:37,

последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:38; или
 (m) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:39;
 последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:40,
 последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:41; или

(n) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:42;
 последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:43,
 последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:44;
 и где антитело включает переменную область легкой цепи, содержащую
 последовательности CDR L1, L2 и L3, представленные в SEQ ID NO:45 или 54.

2. Антитело по п.1, где антитело связывается с активным сайтом HGFA.

3. Антитело по п.1, где антитело связывается с HGFA в положении, отличном от
 активного сайта HGFA.

4. Антитело по п.1, которое является блокирующим антителом.

5. Антитело по п.4, которое блокирует протеолитическую активность HGFA.

6. Антитело по п.5, которое блокирует протеолиз HGFA одноцепочечного HGF.

7. Антитело по п.1, которое ингибирует HGF/c-met-опосредуемый сигнал.

8. Антитело по п.7, которое ингибирует пролиферацию клеток.

9. Антитело по п.7, которое ингибирует ангиогенез.

10. Антитело по п.1, где антитело является аллостерическим ингибитором
 ферментативной активности HGFA.

11. Антитело по п.1, где антитело является полным или частичным конкурентным
 ингибитором ферментативной активности HGFA.

12. Антитело по п.1, которое содержит переменный домен легкой цепи,
 последовательность которого приведена в SEQ ID NO:45.

13. Антитело по п.1, которое содержит переменный домен легкой цепи,
 последовательность которого приведена в SEQ ID NO:54.

14. Антитело по любому из пп.1, 12 и 13, дополнительно включающее каркасную
 последовательность переменного домена тяжелой цепи, включающую
 последовательности SEQ ID NO:46, 47, 48 и 49 и каркасную последовательность
 переменного домена легкой цепи, включающую последовательности SEQ ID NO:50,
 51, 52 и 53.

15. Способ лечения заболевания, ассоциированного с нарушенной регуляцией HGF/c-
 met-опосредуемого сигнала, у субъекта, включающий в себя введение субъекту
 эффективного количества антитела, которое связывается с HGFA в соответствии с
 любым из предыдущих пунктов.

16. Способ по п.15, где заболевание является раком.

17. Способ по п.15, где заболевание ассоциировано с нарушенной регуляцией
 ангиогенеза.

18. Способ по п.15, где заболевание относится к иммунным заболеваниям.

Leu	Glu	Gly	Gly	Asp	Arg	Trp	Ala	Arg	Val	Arg	Gln	Gly	His	Val	215	220	225
Glu	Gln	Cys	Glu	Cys	Phe	Gly	Gly	Arg	Thr	Trp	Cys	Glu	Gly	Thr	230	235	240
Arg	His	Thr	Ala	Cys	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	245	250	255
Cys	His	Leu	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	260	265	270
Pro	Gly	Phe	Ala	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Ile	Glu	Pro	Asp	Glu	Arg	275	280	285
Cys	Phe	Leu	Gly	Asn	Gly	Thr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Val	Ala	Ser	Thr	290	295	300
Ser	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Cys	Leu	Ala	Trp	Asn	Ser	Asp	Leu	Leu	305	310	315
Tyr	Gln	Glu	Leu	His	Val	Asp	Ser	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	320	325	330
Gly	Leu	Gly	Pro	His	Ala	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	335	340	345
Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	Val	Val	Lys	Asp	Ser	Ala	Leu	Ser	Trp	Glu	350	355	360
Tyr	Cys	Arg	Leu	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Leu	Thr	Arg	Val	Gln	Leu	365	370	375
Ser	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Thr	Leu	Pro	Glu	Pro	Ala	Ser	Pro	Gly	380	385	390
Arg	Gln	Ala	Cys	Gly	Arg	Arg	His	Lys	Lys	Arg	Thr	Phe	Leu	Arg	395	400	405
Pro	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	His	Pro	410	415	420
Trp	Leu	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ile	Gly	Asp	Ser	Phe	Cys	Ala	Gly	Ser	425	430	435
Leu	Val	His	Thr	Cys	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Ser	440	445	450
His	Ser	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser	Val	Ser	Val	Val	Leu	Gly	Gln	His	455	460	465
Phe	Phe	Asn	Arg	Thr	Thr	Asp	Val	Thr	Gln	Thr	Phe	Gly	Ile	Glu	470	475	480
Lys	Tyr	Ile	Pro	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Val	Phe	Asn	Pro	Ser	Asp	485	490	495
His	Asp	Leu	Val	Leu	Ile	Arg	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Cys	500	505	510
Ala	Thr	Arg	Ser	Gln	Phe	Val	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Glu	Pro	515	520	525

Gly	Ser	Thr	Phe	Pro	Ala	Gly	His	Lys	Cys	Gln	Ile	Ala	Gly	Trp
				530					535					540
Gly	His	Leu	Asp	Glu	Asn	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Leu	Arg
				545					550					555
Glu	Ala	Leu	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Asp	His	Lys	Cys	Ser	Ser	Pro
				560					565					570
Glu	Val	Tyr	Gly	Ala	Asp	Ile	Ser	Pro	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly
				575					580					585
Tyr	Phe	Asp	Cys	Lys	Ser	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly
				590					595					600
Pro	Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Ile
				605					610					615
Ile	Ser	Trp	Gly	Asp	Gly	Cys	Gly	Arg	Leu	His	Lys	Pro	Gly	Val
				620					625					630
Tyr	Thr	Arg	Val	Ala	Asn	Tyr	Val	Asp	Trp	Ile	Asn	Asp	Arg	Ile
				635					640					645
Arg	Pro	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Ala	Pro	Ser					
				650					655					

<210> 2

<211> 653

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 2

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

155										160					165				
Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ser	Ser	Thr	His	Asp	His	Gly	Ser					
				170					175					180					
Tyr	His	Cys	Ser	Cys	Pro	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Lys	Asp	Cys	Gly					
				185					190					195					
Thr	Glu	Lys	Cys	Phe	Asp	Glu	Thr	Arg	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Glu	Val					
				200					205					210					
Gly	Asp	His	Trp	Ala	Arg	Val	Ser	Glu	Gly	His	Val	Glu	Gln	Cys					
				215					220					225					
Gly	Cys	Met	Glu	Gly	Gln	Ala	Arg	Cys	Glu	Asp	Thr	His	His	Thr					
				230					235					240					
Ala	Cys	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Leu					
				245					250					255					
Ile	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Cys	Thr	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr					
				260					265					270					
Ala	Gly	Arg	Phe	Cys	Asn	Ile	Val	Pro	Thr	Glu	His	Cys	Phe	Leu					
				275					280					285					
Gly	Asn	Gly	Thr	Glu	Tyr	Arg	Gly	Val	Ala	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser					
				290					295					300					
Gly	Leu	Ser	Cys	Leu	Ala	Trp	Asn	Ser	Asp	Leu	Leu	Tyr	Gln	Glu					
				305					310					315					
Leu	His	Val	Asp	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly					
				320					325					330					
Pro	His	Ala	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	Trp					
				335					340					345					
Cys	Tyr	Val	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Trp	Glu	Tyr	Cys	Arg					
				350					355					360					
Leu	Thr	Ala	Cys	Glu	Ser	Leu	Ala	Arg	Val	His	Ser	Gln	Thr	Pro					
				365					370					375					
Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Pro					
				380					385					390					
Thr	Cys	Gly	Lys	Arg	His	Lys	Lys	Arg	Thr	Phe	Leu	Arg	Pro	Arg					
				395					400					405					
Ile	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	His	Pro	Trp	Leu					
				410					415					420					
Ala	Ala	Ile	Tyr	Ile	Gly	Asn	Ser	Phe	Cys	Ala	Gly	Ser	Leu	Val					
				425					430					435					
His	Thr	Cys	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Ala	Asn	Ser					
				440					445					450					
Pro	Pro	Arg	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Val	Leu	Gly	Gln	His	Phe	Phe					
				455					460					465					
Asn	Arg	Thr	Thr	Asp	Val	Thr	Gln	Thr	Phe	Gly	Ile	Glu	Lys	Tyr					
				470					475					480					

Val	Pro	Tyr	Thr	Leu 485	Tyr	Ser	Val	Phe	Asn 490	Pro	Asn	Asn	His	Asp 495
Leu	Val	Leu	Ile	Arg 500	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly 505	Glu	Arg	Cys	Ala	Val 510
Arg	Ser	Gln	Phe	Val 515	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu 520	Pro	Glu	Ala	Gly	Ser 525
Ser	Phe	Pro	Thr	Gly 530	His	Lys	Cys	Gln	Ile 535	Ala	Gly	Trp	Gly	His 540
Met	Asp	Glu	Asn	Val 545	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn 550	Ser	Leu	Leu	Glu	Ala 555
Leu	Val	Pro	Leu	Val 560	Ala	Asp	His	Lys	Cys 565	Ser	Ser	Pro	Glu	Val 570
Tyr	Gly	Ala	Asp	Ile 575	Ser	Pro	Asn	Met	Leu 580	Cys	Ala	Gly	Tyr	Phe 585
Asp	Cys	Lys	Ser	Asp 590	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp 595	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu 600
Val	Cys	Glu	Lys	Asn 605	Gly	Val	Ala	Tyr	Leu 610	Tyr	Gly	Ile	Ile	Ser 615
Trp	Gly	Asp	Gly	Cys 620	Gly	Arg	Leu	Asn	Lys 625	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr 630
Arg	Val	Ala	Asn	Tyr 635	Val	Asp	Trp	Ile	Asn 640	Asp	Arg	Ile	Arg	Pro 645
Pro	Lys	Arg	Pro	Val 650	Ala	Thr	Ser							

```
<210> 3
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> Синтетический

<400> 3
Thr Ser Ser Ala

```
<210> 4
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> Синтетический

```
<400> 4
Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Asn
          5                      10
```

<210> 5
<211> 10
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 5

Ser Ser Arg Leu Ala Gly Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 6

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 6

Thr Gly Ser Ala

<210> 7

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 7

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp
5 10

<210> 8

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 8

Ser Ala Arg Ile Arg Gly Phe Asp Tyr
5

<210> 9

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 9

Asn Ser Asn Gly

<210> 10

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

```

<400> 10
  Gly Trp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
                                5                               10

<210> 11
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 11
  Trp Gly Trp Gly Phe Asp Tyr
                                5

<210> 12
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 12
  Asn Gly Thr Tyr

<210> 13
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 13
  Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr
                                5                               10

<210> 14
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 14
  Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr
                                5

<210> 15
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 15
  Asn Gly Thr Trp

```

<210> 16
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 16
 Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
 5 10

<210> 17
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 17
 Trp Arg Ala Val Pro Ser Phe Asp Tyr
 5

<210> 18
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 18
 Thr Gly Thr Tyr

<210> 19
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 19
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr
 5 10

<210> 20
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 20
 Asp Trp Phe Gly Phe Gly Glu Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 21
 <211> 4
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 21

Thr Gly Ser Ala

<210> 22

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 22

Ala Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Tyr
5 10

<210> 23

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 23

Ser Ala Arg Phe Ser Phe Asp Tyr
5

<210> 24

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 24

Ser Gly Asn Trp

<210> 25

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 25

Ala Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ser Thr Asn
5 10

<210> 26

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 26
Phe Tyr Arg Trp Ser Val Asn Ser Val Met Asp Tyr
5 10

<210> 27
<211> 4

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 27
Thr Asn Tyr Trp

<210> 28
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 28
Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
5 10

<210> 29
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 29
Tyr Ser Ile Pro Ala Phe Asp Tyr
5

<210> 30
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 30
Ser Asn Ser Gly

<210> 31
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 31

Gly Trp Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ala Thr Asp
5 10

<210> 32

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 32

Phe Trp Trp Arg Ser Phe Asp Tyr
5

<210> 33

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 33

Ser Asp Ser Ser

<210> 34

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 34

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Asn
5 10

<210> 35

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 35

Gly Leu Lys Val Pro Phe Tyr Ala Asn Ala Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 36

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 36

Ser Gly Ser Ala

<210> 37
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 37
Ala Ile Ile Asn Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Asn
5 10

<210> 38
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 38
Ser Arg Gly His Tyr Ala Met Asp Tyr
5

<210> 39
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 39
Thr Gly Asn Gly

<210> 40
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 40
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Asn
5 10

<210> 41
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 41
Gly His Arg Val Phe Asp Tyr
5

<210> 42
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 42

Asn Asn Thr Gly

<210> 43

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 43

Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp
				5					10	

<210> 44

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 44

Phe	Phe	Pro	Val	Ala	Phe	Asp	Tyr
				5			

<210> 45

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 45

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn
				20					25					30

Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys Arg Thr

<210> 46
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 47
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 47
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

<210> 48
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 48
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 49
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 49
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 50
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 50

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
					20		

<210> 51
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400>	51													
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 52
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400>	52													
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 53
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400>	53								
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				5				10	

<210> 54
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400>	54													
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1					5				10					15

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

	35		40		45									
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 55

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 55

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				20			

<210> 56

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 56

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10						15

<210> 57

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 57

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5				10						15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 58

<211> 10

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 58
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 10

<210> 59
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 60
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 60
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

<210> 61
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 61
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 62
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 62
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 63
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 63
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 64
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 64
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 65
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 65
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

<210> 66
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 66
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 10

<210> 67
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 67

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
				20					25

<210> 68

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 68

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				5					10			

<210> 69

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 69

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
1				5					10					15

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

<210> 70

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 70

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				5					10	

<210> 71

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 71

Gly	Phe	Asn	Ile	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	His
				5					10

<210> 72

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический

Gly Phe Asn Ile Thr Gly Ser Ala Ile His
5 10

<213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический

Gly Phe Asn Ile Asn Ser Asn Gly Ile His
5 10

<213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический

Gly Phe Asn Ile Asn Gly Thr Tyr Ile His
5 10

<213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический

Gly Phe Asn Ile Asn Gly Thr Trp Ile His
5 10

<213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический

Gly Phe Asn Ile Thr Gly Thr Tyr Ile His
5 10

<213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический

Стр.: 108

Gly Phe Asn Ile Thr Gly Ser Ala Ile His
5 10

<210> 78
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 78
Gly Phe Asn Ile Ser Gly Asn Trp Ile His
5 10

<210> 79
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 79
Gly Phe Asn Ile Thr Asn Tyr Trp Ile His
5 10

<210> 80
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 80
Gly Phe Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ile His
5 10

<210> 81
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 81
Gly Phe Asn Ile Ser Asp Ser Ser Ile His
5 10

<210> 82
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 82
Gly Phe Asn Ile Ser Gly Ser Ala Ile His
5 10

<210> 83

<211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 83
 Gly Phe Asn Ile Thr Gly Asn Gly Ile His
 5 10

<210> 84
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 84
 Gly Phe Asn Ile Asn Asn Thr Gly Ile His
 5 10

<210> 85
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 85
 Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 86
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 86
 Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 87
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 87
 Gly Trp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 88
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 88
 Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 89
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 89
 Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 90
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 90
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 91
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 91
 Ala Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 92
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 92
 Ala Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 93
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 93
 Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 94
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 94
 Gly Trp Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 95
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 95
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 96
 <211> 18
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 96

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

Val Lys Gly

<210> 97

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 97

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

Val Lys Gly

<210> 98

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 98

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

Val Lys Gly

<210> 99

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 99

Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr
				5					10		

<210> 100

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 100

Ala Arg Ser Ala Arg Ile Arg Gly Phe Asp Tyr
5 10

<210> 101

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 101

Ala Arg Trp Gly Trp Gly Phe Asp Tyr
5

<210> 102

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 102

Ala Arg Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr
5 10

<210> 103

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 103

Ala Arg Trp Arg Ala Val Pro Ser Phe Asp Tyr
5 10

<210> 104

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 104

Ala Arg Asp Trp Phe Gly Phe Gly Glu Phe Asp Tyr
5 10

<210> 105

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 105

Ala Arg Ser Ala Arg Phe Ser Phe Asp Tyr
5 10

<210> 106

<211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 106
 Ala Arg Phe Tyr Arg Trp Ser Val Asn Ser Val Met Asp Tyr
 5 10

<210> 107
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 107
 Ala Arg Tyr Ser Ile Pro Ala Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 108
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 108
 Ala Arg Phe Trp Trp Arg Ser Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 109
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 109
 Ala Arg Gly Leu Lys Val Pro Phe Tyr Ala Asn Ala Ala Met Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 110
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 110
 Ala Arg Ser Arg Gly His Tyr Ala Met Asp Tyr
 5 10

<210> 111

<211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 111
 Ala Arg Gly His Arg Val Phe Asp Tyr
 5

<210> 112
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический

<400> 112
 Ala Arg Phe Phe Pro Val Ala Phe Asp Tyr
 5 10

		Количество гомологических клонов																Аффинность													
Клон №		H1				H2								H3																	
		30	31	32	33	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	101	102	
33	2	T	S	S	A	G	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	N	S	S	R	L	A	G	A					M	D	Y	12 нМ
35	1	T	G	S	A	G	I	I	N	P	N	S	G	Y	T	D	S	A	R	I	R	G					F	D	Y	12 нМ	
37	1	N	S	N	G	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	W	G	W	G							F	D	Y	58 нМ	
39	1	N	G	T	Y	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	W	W	A	W	P	A					F	D	Y	6 нМ	
42	1	N	G	T	W	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	W	R	A	V	P	S					F	D	Y	30 нМ	
49	1	T	G	T	Y	G	W	I	S	P	Y	N	G	D	T	Y	D	W	F	G	F	G	E				F	D	Y	2 нМ	
58	1	T	G	S	A	A	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	Y	S	A	R	F	S						F	D	Y	1 нМ	
61	1	S	G	N	W	A	E	I	N	P	Y	N	G	S	T	N	F	Y	R	W	S	V	N	S	V		M	D	Y	20 нМ	
74	1	T	N	Y	W	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	S	I	P	A						F	D	Y	60 нМ	
75	1	S	N	S	G	G	W	I	Y	P	T	G	G	A	T	D	F	W	W	R	S						F	D	Y	6 нМ	
86	1	S	D	S	S	A	R	I	Y	P	T	S	G	N	T	N	G	L	K	V	P	F	Y	A	N	A	A	M	D	Y	19 нМ
90	1	S	G	S	A	A	I	I	N	P	T	G	G	Y	T	N	S	R	G	H	Y	A					M	D	Y	40 нМ	
91	2	T	G	N	G	A	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	N	G	H	R	V							F	D	Y	100 нМ	
95	4	N	N	T	G	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	F	F	P	V	A						F	D	Y	4 нМ	

ФИГ.1А

Клон №	H1											
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	SEQ ID NO:	
33	G	F	N	I	T	S	S	A	I	H	71	
35	G	F	N	I	T	G	S	A	I	H	72	
37	G	F	N	I	N	S	N	G	I	H	73	
39	G	F	N	I	N	G	T	Y	I	H	74	
42	G	F	N	I	N	G	T	W	I	H	75	
49	G	F	N	I	T	G	T	Y	I	H	76	
58	G	F	N	I	T	G	S	A	I	H	77	
61	G	F	N	I	S	G	N	W	I	H	78	
74	G	F	N	I	T	N	Y	W	I	H	79	
75	G	F	N	I	S	N	S	G	I	H	80	
86	G	F	N	I	S	D	S	S	I	H	81	
90	G	F	N	I	S	G	S	A	I	H	82	
91	G	F	N	I	T	G	N	G	I	H	83	
95	G	F	N	I	N	N	T	G	I	H	84	

ФИГ.1В

Клон №	H2																			
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	SEQ ID NO:	
33	G	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	85	
35	G	I	I	N	P	N	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	86	
37	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	87	
39	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	88	
42	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	89	
49	G	W	I	S	P	Y	N	G	D	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	90	
58	A	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	91	
61	A	E	I	N	P	Y	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	92	
74	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	93	
75	G	W	I	Y	P	T	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	94	
86	A	R	I	Y	P	T	S	G	N	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	95	
90	A	I	I	N	P	T	G	G	Y	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	96	
91	A	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	97	
95	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	98	

ФИГ.1С

Клон №	H3																
	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	f	101	102	SEQ ID NO:
33	A	R	S	S	R	L	A	G	A					M	D	Y	99
35	A	R	S	A	R	I	R	G						F	D	Y	100
37	A	R	W	G	W	G								F	D	Y	101
39	A	R	W	W	A	W	P	A						F	D	Y	102
42	A	R	W	R	A	V	P	S						F	D	Y	103
49	A	R	D	W	F	G	F	G	E					F	D	Y	104
58	A	R	S	A	R	F	S							F	D	Y	105
61	A	R	F	Y	R	W	S	V	N	S	V			M	D	Y	106
74	A	R	Y	S	I	P	A							F	D	Y	107
75	A	R	F	W	W	R	S							F	D	Y	108
86	A	R	G	L	K	V	P	F	Y	A	N	A	A	M	D	Y	109
90	A	R	S	R	G	H	Y	A						M	D	Y	110
91	A	R	G	H	R	V								F	D	Y	111
95	A	R	F	F	P	V	A							F	D	Y	112

ФИГ.1D

Каркасные последовательности легкой цепи (LC-FR)

- LC-FR1 ¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
²³ Thr Ile Thr Cys (SEQ ID NO: 55)
- LC-FR2 ³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr ⁴⁹ (SEQ ID NO: 56)
- LC-FR3 ⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
⁸⁸ Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 57)
- LC-FR4 ⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys ¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 58)

Каркасные последовательности тяжелой цепи (HC-FR)

- HC-FR1 ¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
²⁵ Leu Ser Cys Ala Ala Ser (SEQ ID NO: 59)
- HC-FR2 ³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (SEQ ID NO: 60)
- HC-FR3 ⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
⁸³
^{83a} ^{83b} ^{83c} Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys ⁹² (SEQ ID NO: 61)
- HC-FR4 ¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (SEQ ID NO: 62)

ФИГ.1E

Каркасные последовательности легкой цепи (LC-FR)

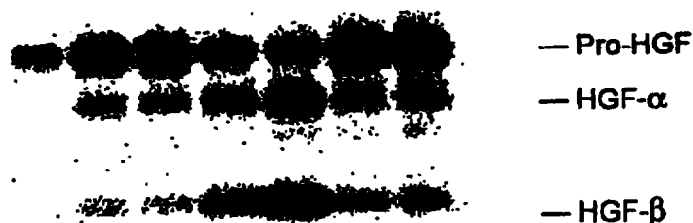
- LC-FR1 ¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
²³ Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys (SEQ ID NO: 63)
- LC-FR2 ³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (SEQ ID NO: 64)
- LC-FR3 ⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
⁸⁸ Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 65)
- LC-FR4 ⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys ¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 66)

Каркасные последовательности тяжелой цепи (HC-FR)

- HC-FR1 ¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
²⁵ Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser (SEQ ID NO: 67)
- HC-FR2 ³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (SEQ ID NO: 68)
- HC-FR3 ⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn ⁸³
^{83a 83b 83c} Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 69)
- HC-FR4 ¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (SEQ ID NO: 70)

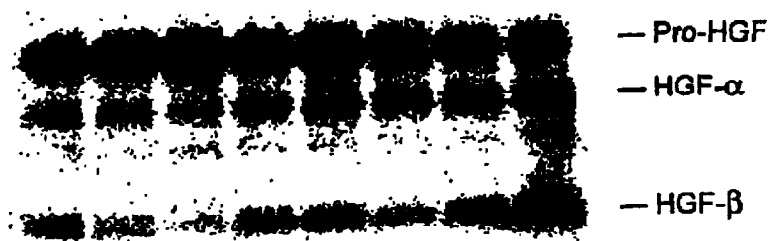
ФИГ.1F

1 2 3 4 5 6 7 8 9

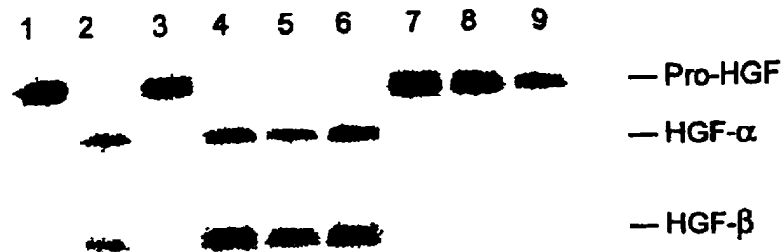


ФИГ.2A

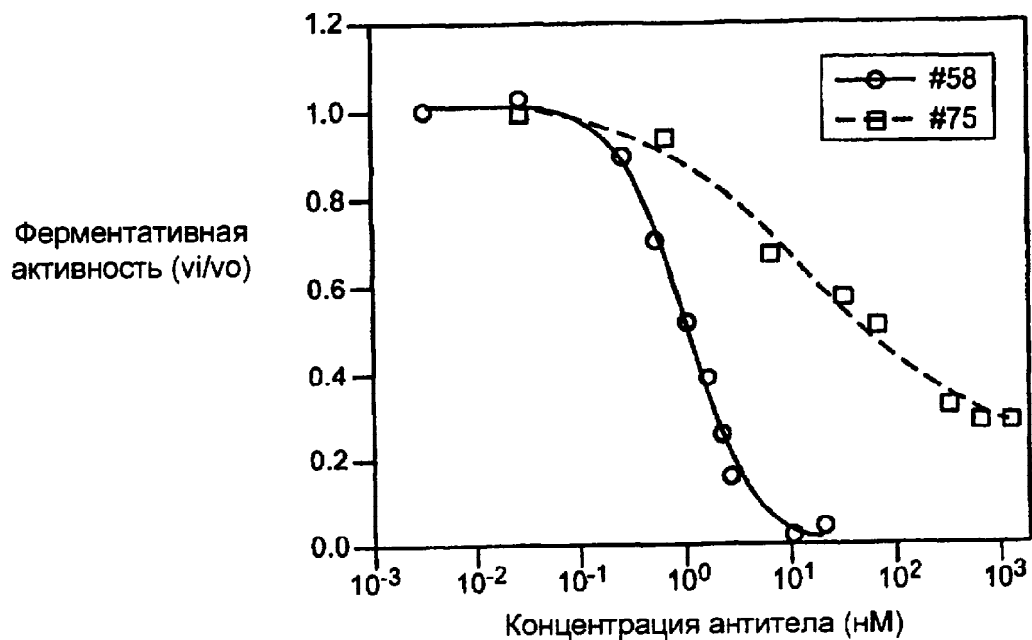
1 2 3 4 5 6 7 8



ФИГ.2B

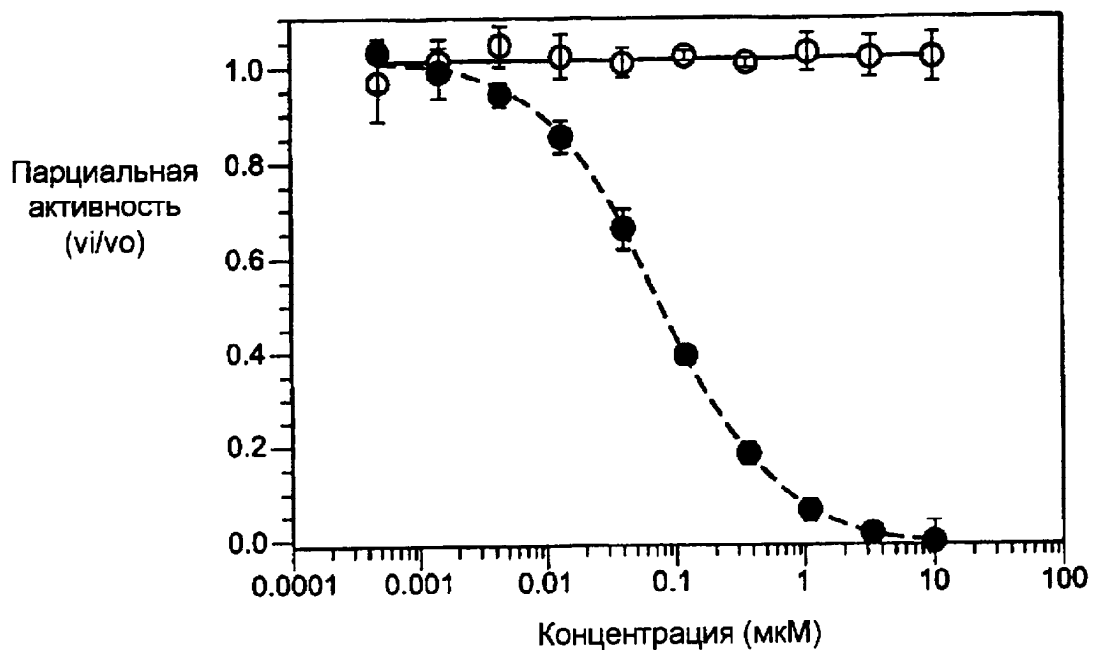


ФИГ.3

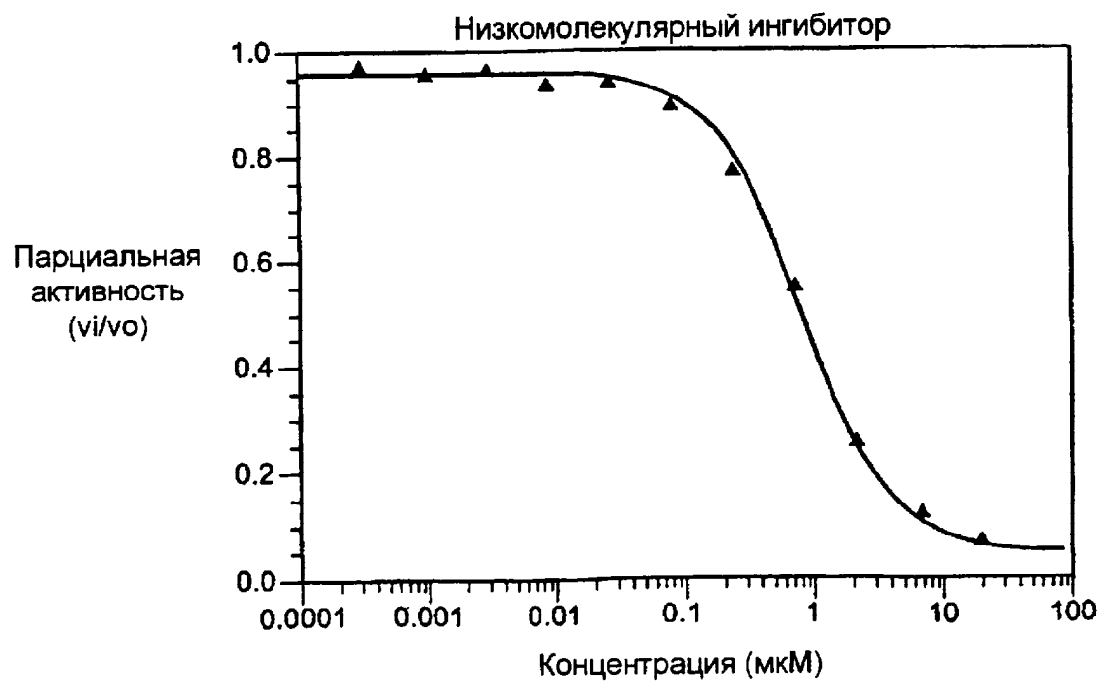


ФИГ.4

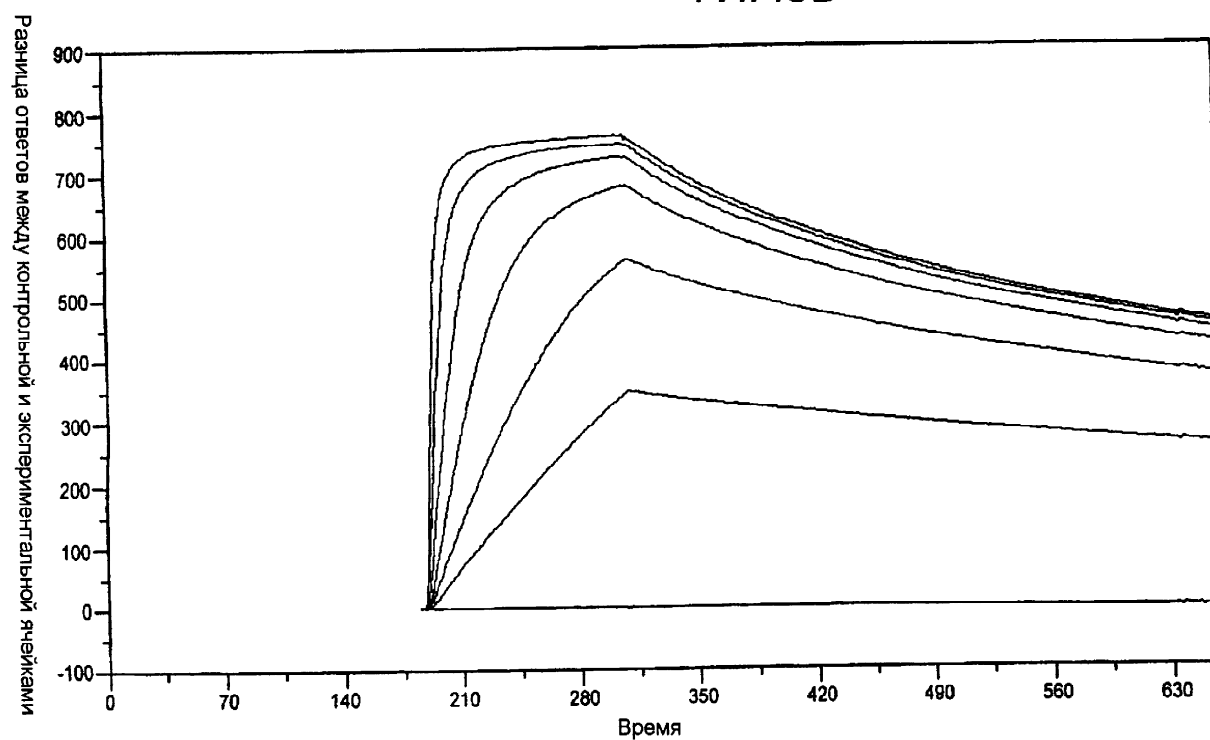
IV-49C



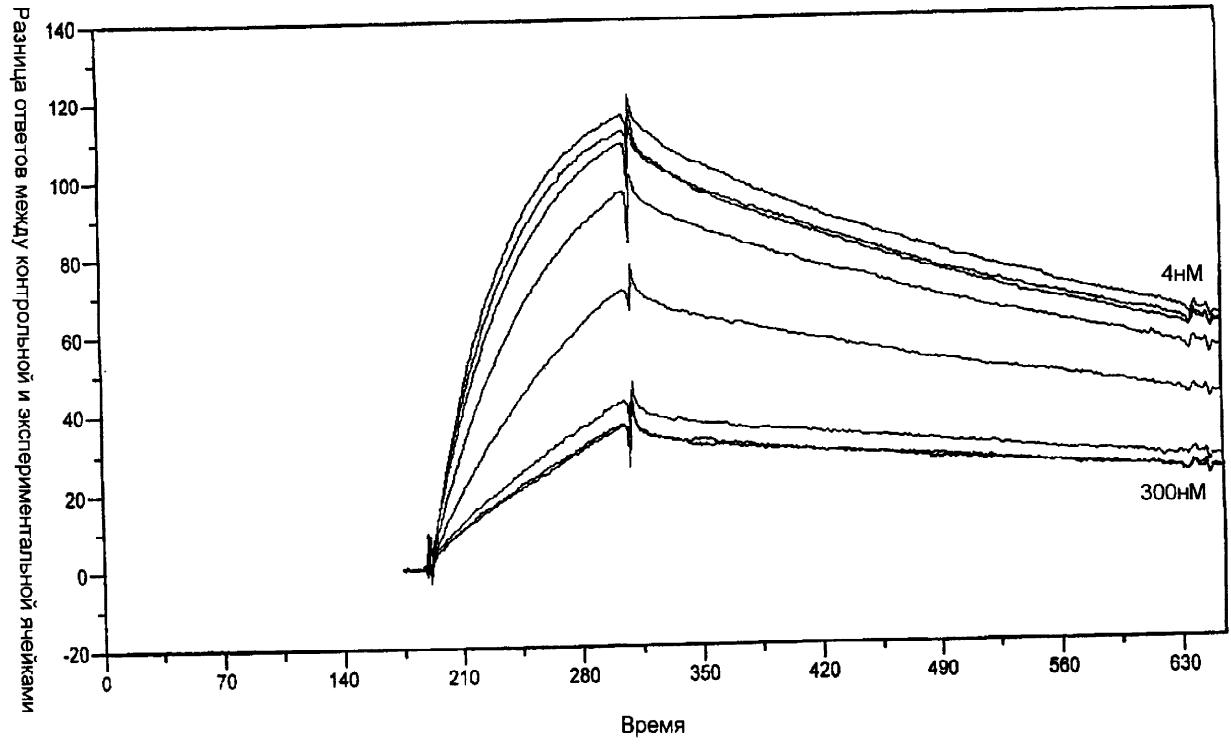
ФИГ.5А



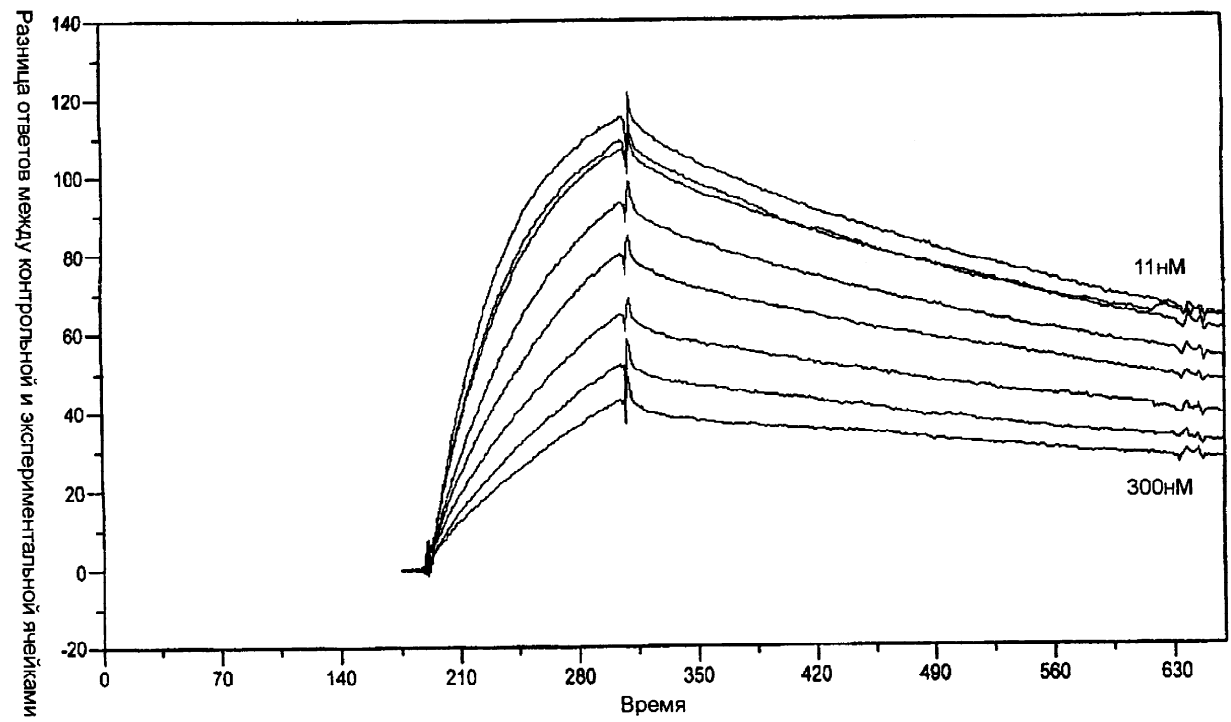
ФИГ.5В



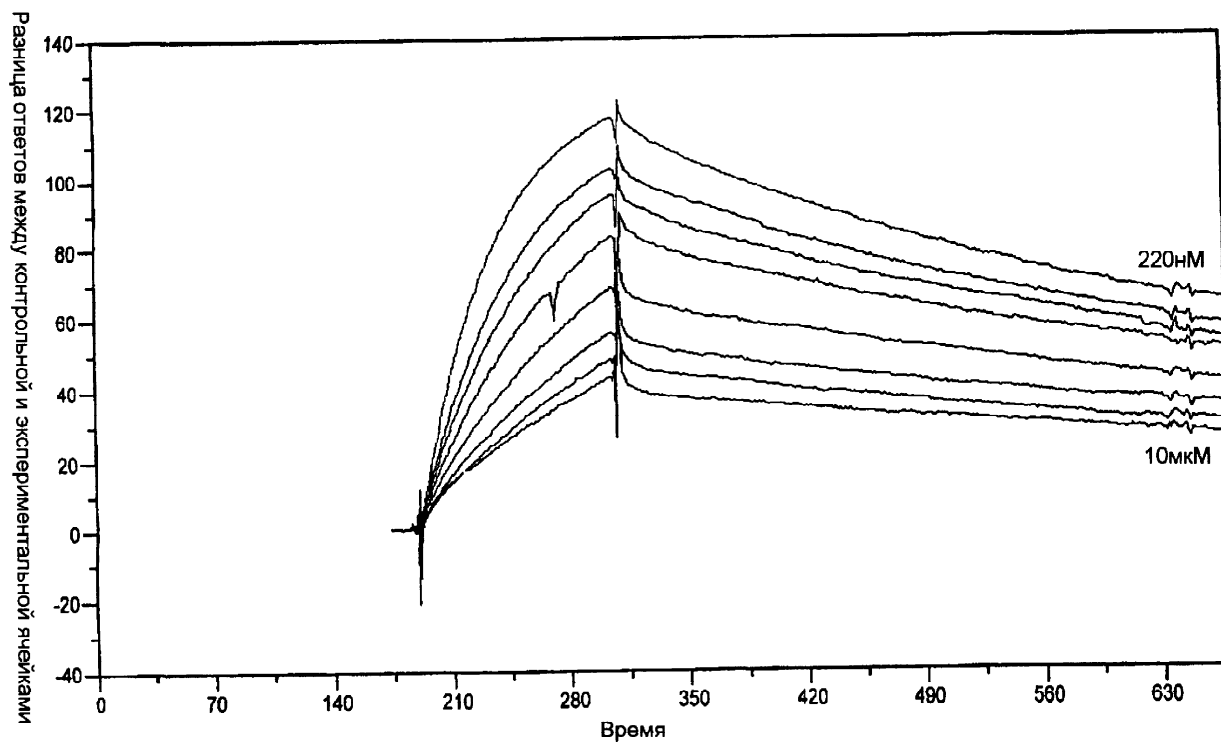
ФИГ.6А



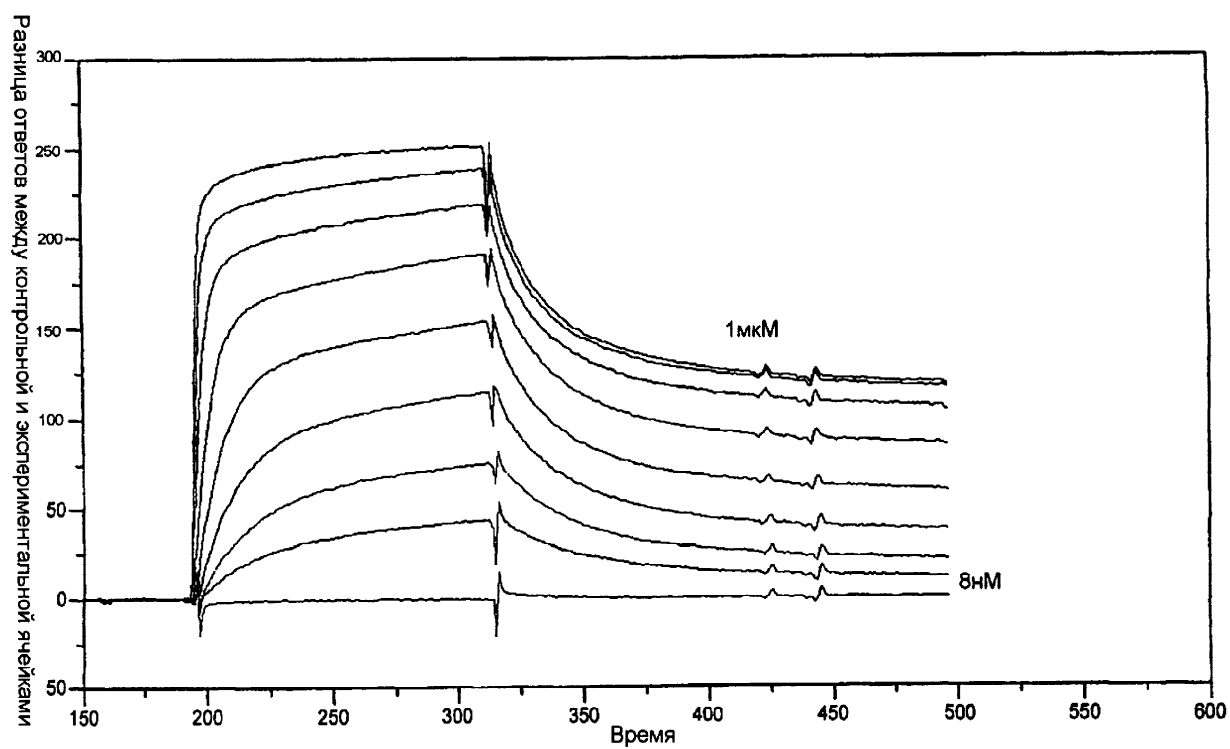
ФИГ.6В



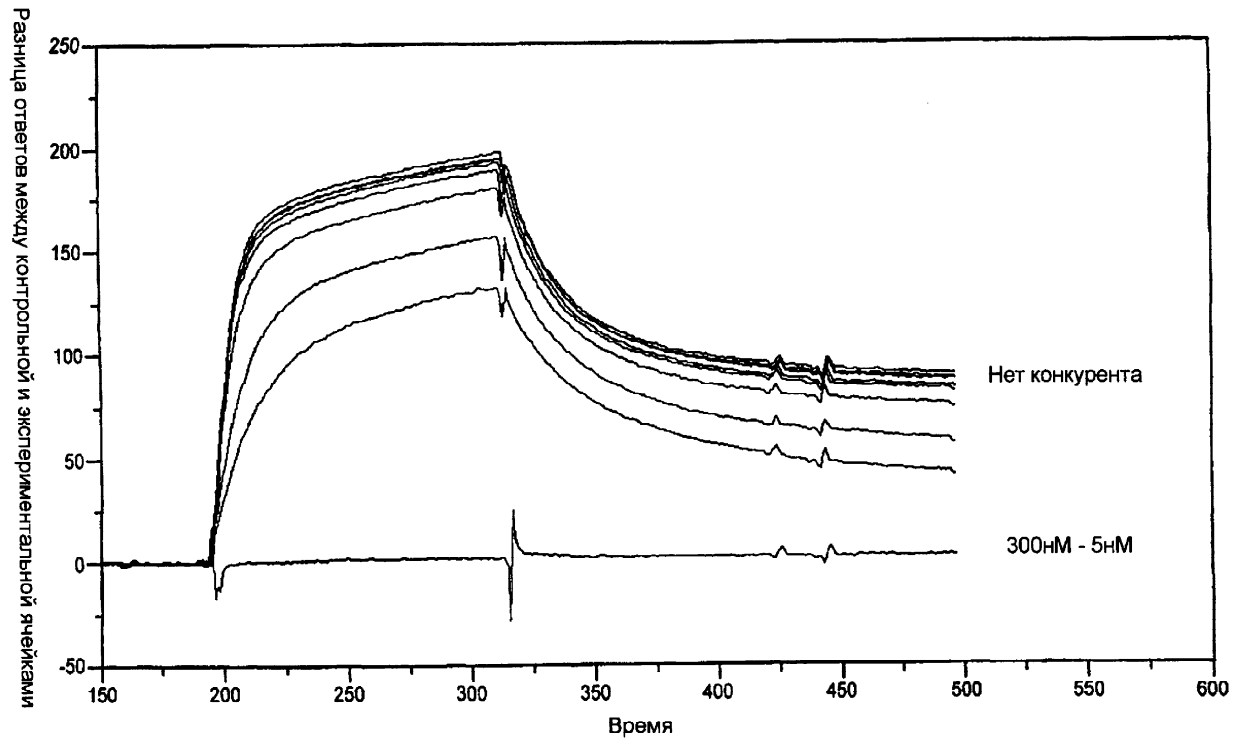
ФИГ.6С



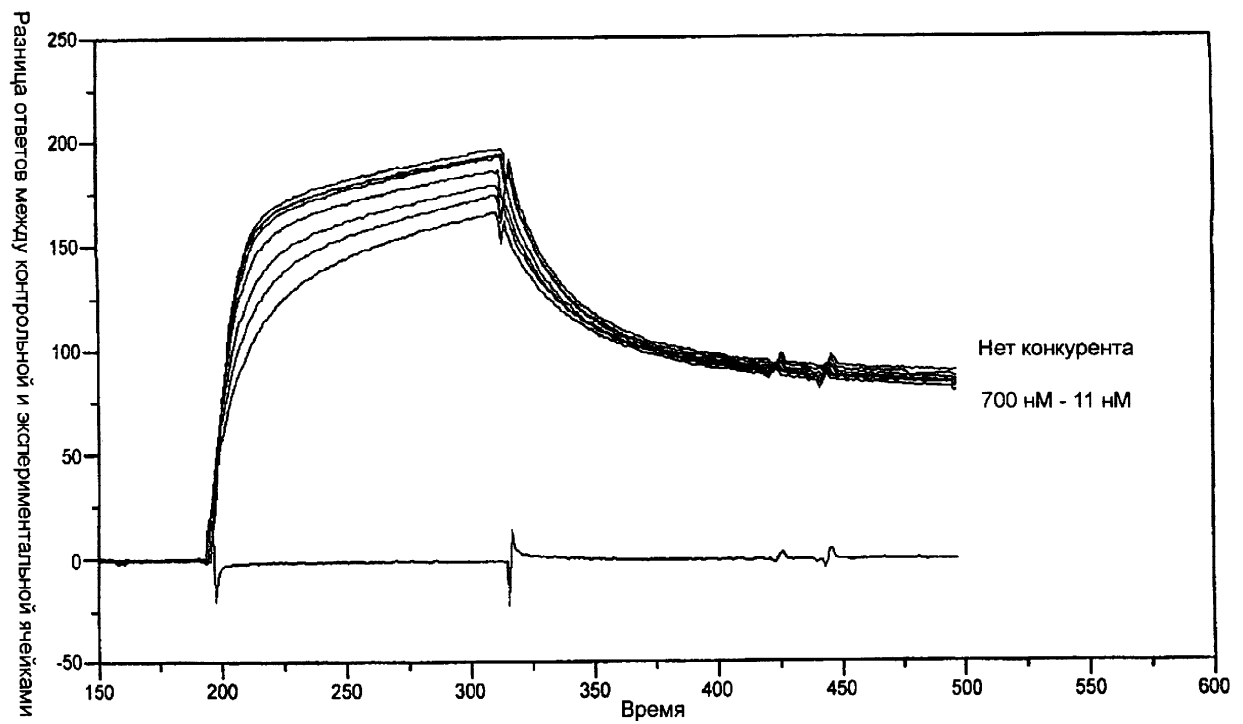
ФИГ.6D



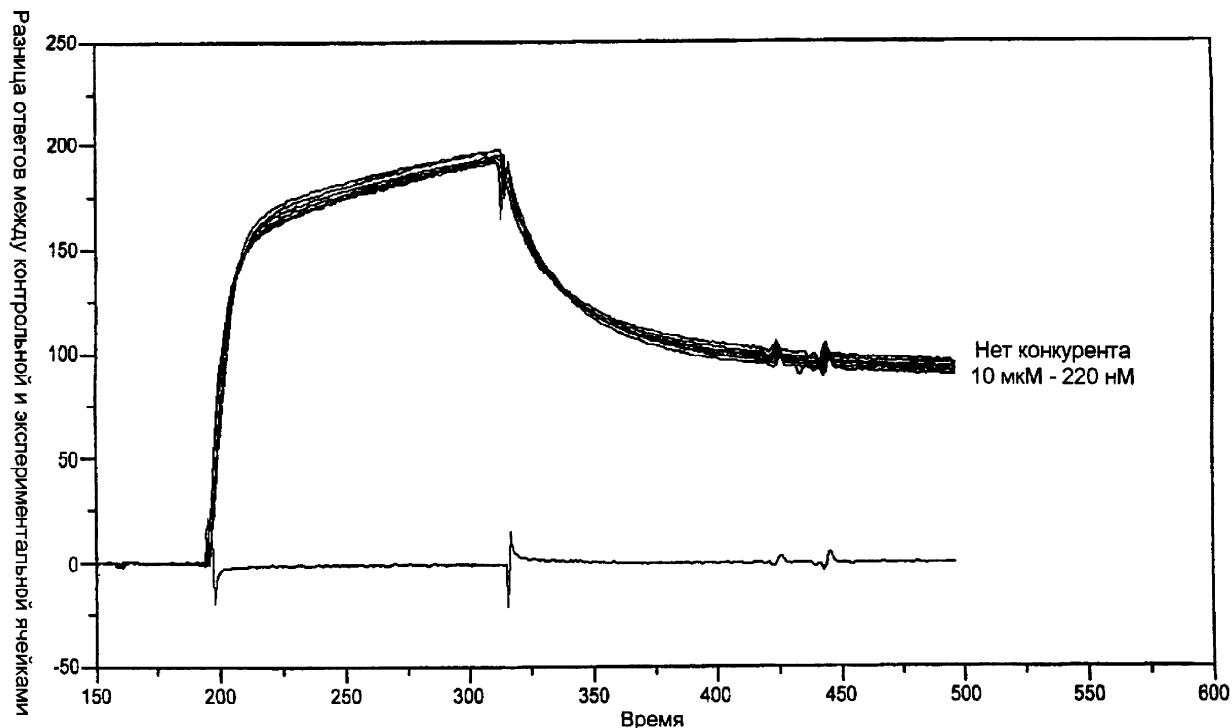
ФИГ.6E



ФИГ.6F



ФИГ.6G



ФИГ.6H

huHGFA	1	MGRWAWVPSPWP	PPGLGPF	L	LLLLLLLL	L	PRGF	Q	P	Q	P	G	N	R	T	E	S	P	E	P	N	A	T	50																												
muHGFA	1	MGRQAWISS	SLCPL	PRPCPF	-	LLLLLLLL	V	PRGA	Q	P	Q	A	G	R	N	H	T	E	P	P	G	P	N	V	49																											
huHGFA	51	ATPAIPTILV	TS--VTSE	TPATSA	PEAE	EGFQ	SGGL	PPP	P	RAVP	SSSS	S	PQA											98																												
muHGFA	50	ATPVTP	TIPVIS	SGNV	STST	TESAP	AAE	T	EGFQ	SERY	PPPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95																												
huHGFA	99	QALTE	DGR	FCRFP	FRYGG	RMLH	A	CTSE	EGSA	H	RKWC	ATTH	NYDR	DR	DRAW	G	Y	C						148																												
muHGFA	96	QVLTES	GQG	FCRFP	FRYGG	RMLH	S	CTSE	EGSA	Y	RKWC	ATTH	NYDR	DR	DRAW	G	Y	C						145																												
huHGFA	149	VEAT	FPFG	GA	ALD	PCAS	G	PCL	NGG	S	CSN	T	QD	P	Q	SYHC	SC	PR	A	FT	G	K	D	C	198																											
muHGFA	146	AEV	TLP	FVE	G	PAI	L	DPCAS	W	PCL	NGG	T	CS	S	T	H	D	P	Q	SYHC	SC	PL	A	FT	G	K	D	C	195																							
huHGFA	199	TEKCFDE	TRYEY	LE	G	GDR	WARV	R	Q	GHVE	QC	E	CF	G	GR	TW	CE	G	T	R	H	T	A	C	L	S		248																								
muHGFA	196	TEKCFDE	TRYEY	F	E	V	G	DH	WARV	S	E	GHVE	QC	G	C	M	E	G	Q	A	R	C	E	D	T	H	T	A	C	L	S	245																				
huHGFA	249	PCLNGGT	CHLIV	A	T	G	T	T	V	C	A	C	P	P	G	F	A	G	R	L	C	N	I	E	P	D	E	R	C	F	L	G	N	G	T	G	Y	R	G	V	A	298										
muHGFA	246	PCLNGGT	CHLIV	G	T	G	T	S	V	C	T	C	P	L	G	Y	A	G	R	F	C	N	I	V	P	T	E	H	C	F	L	G	N	G	T	G	Y	R	G	V	A	295										
huHGFA	299	STS	ASGLS	CLAWNS	DLLY	QELH	VDS	V	G	A	A	V	L	L	G	L	G	P	H	A	C	R	N	P	D	N	D	E	R	P	W						348															
muHGFA	296	STA	ASGLS	CLAWNS	DLLY	QELH	VDS	V	G	A	A	V	L	L	G	L	G	P	H	A	C	R	N	P	D	N	D	E	R	P	W						345															
huHGFA	349	CYVVKD	S	ALSWEY	CRL	E	ACES	L	T	R	V	Q	-	L	S	P	D	L	A	T	L	P	E	P	A	S	P	G	R	Q	A	C	G	R	R		397															
muHGFA	346	CYVVKD	N	ALSWEY	CRL	T	ACES	L	A	R	V	H	S	Q	T	P	E	I	L	A	A	L	P	E	S	A	P	A	V	R	P	T	C	G	K	R		395														
huHGFA	398	HKKRT	TFLR	PRI	I	G	G	S	S	S	L	P	G	S	H	P	W	L	A	A	I	Y	I	G	D	S	F	C	A	G	S	L	V	H	T	C	W	V	V	S	A	A	H	447								
muHGFA	396	HKKRT	TFLR	PRI	I	G	G	S	S	S	L	P	G	S	H	P	W	L	A	A	I	Y	I	G	N	S	F	C	A	G	S	L	V	H	T	C	W	V	V	S	A	A	H	445								
huHGFA	448	CF	S	H	S	P	P	R	D	S	I	V	S	V	L	G	Q	H	F	F	N	R	T	D	V	T	Q	T	F	G	I	E	K	Y	I	P	Y	T	L	Y	S	V	F	N	P	S	D	H	D	497		
muHGFA	446	CF	A	N	S	P	P	R	D	S	I	T	V	S	V	L	G	Q	H	F	F	N	R	T	D	V	T	Q	T	F	G	I	E	K	Y	I	P	Y	T	L	Y	S	V	F	N	P	S	D	H	D	495	
huHGFA	498	LVLIR	LKKKG	D	R	C	A	T	R	S	Q	F	V	Q	P	I	C	L	P	E	P	A	G	S	T	F	F	A	G	H	K	C	Q	I	A	G	W	G	H	L	D	E	N	V	547							
muHGFA	496	LVLIR	LKKKG	E	R	C	A	V	R	S	Q	F	V	Q	P	I	C	L	P	E	A	G	S	T	F	F	T	G	H	K	C	Q	I	A	G	W	G	H	M	D	E	N	V	545								
huHGFA	548	S	G	Y	S	S	S	L	R	E	A	L	V	P	L	V	A	D	H	K	C	S	S	P	E	V	Y	G	A	D	I	S	P	N	M	L	C	A	G	Y	F	D	C	K	S	D	A	C	Q	G	D	597
muHGFA	546	S	S	Y	S	N	S	L	L	E	A	L	V	P	L	V	A	D	H	K	C	S	S	P	E	V	Y	G	A	D	I	S	P	N	M	L	C	A	G	Y	F	D	C	K	S	D	A	C	Q	G	D	595
huHGFA	598	SGG	P	L	A	C	E	K	N	G	V	A	Y	L	G	I	I	S	W	G	D	G	C	G	R	L	N	K	P	G	V	Y	T	R	V	A	N	Y	V	D	W	I	N	D	R	I	R	P	647			
muHGFA	596	SGG	P	L	V	C	E	K	N	G	V	A	Y	L	G	I	I	S	W	G	D	G	C	G	R	L	N	K	P	G	V	Y	T	R	V	A	N	Y	V	D	W	I	N	D	R	I	R	P	645			
huHGFA	648	P	R	R	L	V	A	P	S																																							655				
muHGFA	646	P	K	R	P	V	A	T	S																																							653				

ФИГ.7

Ингибирование ферментативной активности HGFA анти-HGFA антителами

№ антитела	Результаты хромогенного субстратного анализа ^a IC ₅₀ (нМ)	Ингибирование макромолекулярного субстрата proHGF 670 нМ ^b
33	15.3	**
35	21.3	**
37	334	**
39	>500	*
42	>500	**
49	>500	N.I.
58	1.3	***
61	>500	**
74	>500	**
75	32.6	**
86	>500	*
90	203	**
91	169	**
95	>500	*

^a Субстратом являлся Spectrozyme(R) VIIa с концентрацией 0,2 мМ (~K_M)

^b Количественная оценка ингибирования, основанная на исчезновении полосы одноцепочечного HGF:
*, слабое ингибирование; **, сильное ингибирование; ***, очень сильное ингибирование; N.I., нет

ФИГ.8

Связывание HGFA и анти-HGFA-антител

Анти-HGFA фаговое антитело	Аффинность по фаговому ELISA методу, IC ₅₀ (нМ)	Аффинность по BIAcore-методу, K _D (нМ)	Ингибирование связывания с HGFA посредством IV49	Ингибирование связывания с HGFA посредством низкомолекулярного соединения	Ингибирование связывания с HGFA посредством sHAI-1B
58	2	1.3	++	++	++
75	6	100	+/-	-	+/-
37	56	ND ^a	+/-	+/-	ND ^a
74	60	ND ^a	+/-	-	+/-
42	30	ND ^a	+	+/-	+
61	20	ND ^a	+	-	+

++, +: ингибирование >50%

+/-: ингибирование 20-50%

-: ингибирование <20%

[HGFA]: 70 нМ

[Конкурент]: начиная с 10-кратного превышения известной K_D и уменьшая 2-кратным разведением

^aND, не определено

ФИГ.9