

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **029214**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |   |  |
|---|--|
| <b>(45)</b> Дата публикации и выдачи патента<br><b>2018.02.28</b> | <b>(51)</b> Int. Cl. <i>A61K 39/395</i> (2006.01)<br><i>A61K 47/10</i> (2006.01)<br><i>A61P 35/00</i> (2006.01)<br><i>A61P 27/02</i> (2006.01) |
| <b>(21)</b> Номер заявки<br><b>201590412</b>                      |  |
| <b>(22)</b> Дата подачи заявки<br><b>2013.09.05</b>               |  |

**(54) КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

- |  |  |
|--|--|
| <b>(31)</b> 61/697,111   | <b>(56)</b> WO-A2-2010039873   |
| <b>(32)</b> 2012.09.05   | WO-A1-2011022339   |
| <b>(33)</b> US   | WO-A1-2011041441   |
| <b>(43)</b> 2015.08.31   | WO-A2-2010032059   |
| <b>(86)</b> PCT/US2013/058265  | LOWE D. et al. Aggregation, Stability and Formulation of Human Antibody Therapeutics, ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURAL BIOLOGY, 2011, Vol. 84, pg. 41-61, pg. 54 A |
| <b>(87)</b> WO 2014/039682 2014.03.13  |  |
| <b>(71)(73)</b> Заявитель и патентовладелец:<br><b>ТРАКОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,<br/>ИНК. (US)</b>                                      |  |
| <b>(72)</b> Изобретатель:<br><b>Бенедикт Сюзан, Мэннинг Марк<br/>Корнелл, Мерфи Брайан М., Риал<br/>Шэрон, Тьюэр Чарльз (US)</b> |  |
| <b>(74)</b> Представитель:<br><b>Поликарпов А.В. (RU)</b>  |  |

- (57)** Изобретение относится к композициям антител против CD105 и к их применениям. Другой аспект относится к предварительно заполненным шприцам с композициями антител против CD105. Другой аспект относится к применению композиций для ослабления одного или более чем одного признака или симптома расстройства, связанного с ангиогенезом, такого как раковые заболевания и офтальмологические заболевания.

**B1**

**029214**

**029214**

**B1**

### Перекрестная ссылка

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 61/697111, поданной 5 сентября 2012 г., которая включена сюда посредством ссылки во всей ее полноте.

Данная заявка относится к следующим одновременно рассматриваемым патентным заявкам: публикации США № US 2010-0098692 A1 [№ патентного реестра 35882-706.201]; патенту США № 8221753 [№ патентного реестра 35882-706.202]; заявке на патент США № 13/485702 [№ патентного реестра 35882-706.301] и заявке на патент США № 13/390896 [№ патентного реестра 35882-712.201], которые включены сюда посредством ссылки во всей их полноте.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в формате ASCII посредством EFS-Web и является тем самым включенным посредством ссылки во всей его полноте. Указанная копия ASCII, созданная 4 сентября 2013 года, названа 35882-714.601\_SL.txt и имеет размер 22121 байт.

### Предшествующий уровень техники

Рак является второй после коронарной болезни ведущей причиной смерти человека. Миллионы людей умирают от рака во всем мире каждый год. В одних Соединенных Штатах каждый год рак приводит к смерти значительно более чем полумиллиона человек, причем в год диагностируются примерно 1,4 миллиона новых случаев. В то время как смерти от сердечных заболеваний значительно снижались, число смертей от рака, в общем, увеличивается. Во многих странах рак уже является ведущей причиной смерти.

Кроме того, даже для тех раковых пациентов, которые первоначально пережили их первичные раковые заболевания, обычный опыт показывает, что их жизни значительно изменяются. Многие раковые пациенты испытывают сильную тревожность, обусловленную осознанием возможности рецидива или неблагоприятного исхода лечения. Многие раковые пациенты испытывают значительное физическое истощение после лечения.

В общих чертах, фундаментальной проблемой в лечении самых смертельных раковых заболеваний является отсутствие эффективных и нетоксичных системных терапий. Рак представляет собой комплексное заболевание, характеризуемое генетическими мутациями, которые приводят к неконтролируемому росту клеток. Раковые клетки присутствуют во всех организмах, и при нормальных условиях их избыточный рост четко регулируется различными физиологическими факторами.

Ангиогенез представляет собой физиологический процесс, посредством которого новые кровеносные сосуды развиваются из предсуществующих сосудов. Предполагается, что ангиогенез играет роль как в нормальных, так и в патологических процессах. Например, ангиогенные процессы участвуют в развитии сосудистых систем органов и тканей животных.

При определенных патологических состояниях ангиогенез стимулируется как средство обеспечения адекватного снабжения клеток в пораженной ткани кровью и питательными веществами. Во многих из этих патологических состояний участвуют нарушенная пролиферация клеток и/или регуляция. Солидные раковые заболевания и эксудативная дегенерация желтого пятна зависят от организации новой поставки крови для длительного роста, а также метастазирования.

### Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, содержащая от примерно 1 до примерно 100 мг/мл антитела против CD105, вплоть до примерно 100 мМ буферизующего агента, вплоть до примерно 1М полиола, и имеющая pH от примерно 4,0 до примерно 5,5.

В одном воплощении композиции по изобретению указанный буферизующий агент представляет собой гистидин.

В еще одном воплощении композиции по изобретению буферизующий агент представляет собой ацетат и pH составляет примерно 4.

В еще одном воплощении композиции по изобретению буферизующий агент представляет собой гистидин и pH составляет примерно 5,5.

В одном воплощении композиции по изобретению указанное антитело против CD105 содержит варибельную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, константную область легкой цепи ( $C_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, варибельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 3, и константную область ( $Fc$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4.

В еще одном воплощении композиции по изобретению указанное антитело против CD105 содержит CDR1 (определяющая комплементарность область 1)  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 5, CDR2  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 6, CDR3  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 7, CDR1  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 8, CDR2  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ

ID NO: 9, и CDR3  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 10.

В одном воплощении композиция по изобретению содержит примерно 25 мг/мл, примерно 50 мг/мл или примерно 100 мг/мл антитела против CD105.

В одном воплощении композиция по изобретению содержит забуферивающий агент, представляющий собой гистидин или ацетат.

В предпочтительном воплощении композиция по изобретению содержит примерно 20 мМ гистидин или ацетат.

В одном воплощении изобретения композиция изготовлена для интравитреального или внутривенного введения.

В еще одном воплощении композиция дополнительно содержит приемлемый носитель или эксципиент.

В предпочтительном воплощении композиция по изобретению содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В одном воплощении изобретения композиция является изотоничной или гипертоничной.

В одном воплощении изобретения количество полиола в композиции по изобретению составляет меньше чем 300 мМ и данная композиция сделана изотоничной с использованием соли.

В конкретном воплощении композиции полиол представляет собой сахар.

В более конкретном воплощении указанный сахар представляет собой невосстанавливающий сахар.

В еще более конкретном воплощении невосстанавливающий сахар представляет собой трегалозу или сахарозу.

В еще одном конкретном воплощении сахар представляет собой сорбит.

В еще одном воплощении композиция по изобретению дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

В предпочтительном воплощении поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 80 или Pluronic® F68.

В еще одном воплощении композиция по изобретению предназначена для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом и представляющего собой рак, в том числе метастазирующий.

В конкретном воплощении изобретения рак представляет собой солидную опухоль.

В еще одном конкретном воплощении изобретения рак имеет эпителиальное происхождение.

В еще одном конкретном воплощении изобретения рак представляет собой рак легкого, меланому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак матки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, саркому, миелому, рак мозга или лимфому.

В еще одном воплощении композиция по изобретению предназначена для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом и представляющего собой офтальмологическое состояние.

В конкретном воплощении изобретения офтальмологическое состояние представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию или хориоидальную неоваскуляризацию.

В более конкретном воплощении изобретения указанная возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) представляет собой влажную AMD или сухую AMD.

В еще одном аспекте изобретения предложен предварительно заполненный шприц, подходящий для внутривенного введения, содержащий композицию по изобретению.

В еще одном аспекте изобретения предложен предварительно заполненный шприц, подходящий для внутривенного введения, содержащий композицию по изобретению, где композиция содержит примерно 25 мг/мл или примерно 50 мг/мл анти-CD105 антитела.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение композиции по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом.

В конкретном воплощении изобретения композицию применяют для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом и представляющего собой рак, в том числе метастазирующий.

В конкретном воплощении изобретения композицию применяют для лечения солидной опухоли.

В еще одном конкретном воплощении изобретения композицию применяют для лечения рака эпителиального происхождения.

В еще одном конкретном воплощении изобретения композицию применяют для лечения рака представляющего собой рак легкого, меланому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак матки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, саркому, миелому, рак мозга или лимфому.

В одном конкретном воплощении изобретения композицию применяют для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом и представляющего собой офтальмологическое состояние.

В еще одном конкретном воплощении изобретения композицию применяют для лечения офтальмологического состояния представляющего собой возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию или хориоидальную неоваскуляризацию.

В еще одном конкретном воплощении изобретения указанная возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) представляет собой влажную AMD или сухую AMD.

### Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании изобретения, включены сюда посредством ссылки в той же самой степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

### Краткое описание графических материалов

Новые характеристики воплощений подробно изложены в приложенной формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящих воплощений можно получить посредством ссылки на следующее подробное описание, которое излагает иллюстративные воплощения, в которых используются принципы воплощений, и на сопровождающие графические материалы, в которых

на фиг. 1А-Й приведены типичные аминокислотные последовательности описанного здесь антитела против CD105 (TRC105). Фиг. 1А представляет репрезентативную переменную область легкой цепи (VL) антитела против CD105 (SEQ ID NO: 1); фиг. 1Б представляет репрезентативную константную область легкой цепи (CL) антитела против CD105 (SEQ ID NO: 2); фиг. 1В представляет репрезентативную переменную область тяжелой цепи (VH) антитела против CD105 (SEQ ID NO: 3), и фиг. 1Г представляет репрезентативную константную область гамма-1 тяжелой цепи антитела против CD105 (SEQ ID NO: 4). Фиг. 1Д-Ж представляют CDR 1, 2 и 3 VL соответственно. Фиг. 1З-Й представляют CDR 1, 2 и 3 VH соответственно;

на фиг. 2 - диаграмма сигнального пути TGF- $\beta$ /ALK5. Путь TGF- $\beta$ /ALK5 (А) приводит к ингибированию пролиферации клеток. Путь TGF- $\beta$ /ALK1 (Б) индуцирует пролиферацию эндотелиальных клеток и требует CD105 (эндоглин) для сигнализации ALK1. Пунктирные линии указывают неактивные или заблокированные пути. Жирная стрелка указывает стимуляцию сигнального пути.

### Подробное описание изобретения

Следует понимать, что использованная здесь терминология служит лишь для описания конкретных воплощений и не предназначена для того, чтобы быть ограничивающей. Кроме того, понятно, что в воплощении настоящих изобретений на практике можно использовать целый ряд способов и материалов, аналогичных или эквивалентных описанным здесь способам и материалам.

Согласно настоящей заявке можно использовать традиционные методики клеточной биологии, молекулярной биологии, микробиологии и геной инженерии, как подробно описано в данной области.

Формы в единственном числе в том виде, в котором они используются в данном описании изобретения и приложенной формуле изобретения, включают ссылки во множественном числе, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылки на "способ" включают один или более чем один способ и/или стадию описанного здесь типа, и/или которые станут очевидными специалистам в данной области при прочтении данного описания.

Антитела против CD105 можно использовать для лечения или предупреждения разных форм растройства, связанных с ангиогенезом. Здесь описаны способы лечения разных форм рака, солидных опухолей и метастазов, и тому подобного посредством введения описанных здесь композиций.

Терминология, относящаяся к антителам.

Термин "антитело" в том виде, как он здесь используется, относится к иммуноглобулину (Ig), независимо от того, является ли он природным или частично, или полностью синтетически продуцированным. Данный термин также охватывает любой полипептид или белок, имеющий связывающий домен, который представляет собой антигенсвязывающий домен или гомологичен антигенсвязывающему домену. Данный термин также включает "антигенсвязывающие фрагменты" и другие взаимозаменяемые термины для аналогичных связывающих фрагментов, таких как описанные ниже.

Нативные антитела и нативные иммуноглобулины обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь типично связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как число дисульфидных связей среди тяжелых цепей иммуноглобулинов разных изоформ варьирует. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет внутрицепочечные дисульфидные мостики на регулярном расстоянии друг от друга. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен ("V<sub>H</sub>" или "VH"), с последующим рядом константных доменов ("C<sub>H</sub>" или "CH"). Каждая легкая цепь имеет на одном конце переменный домен ("V<sub>L</sub>" или "VL") и константный домен ("C<sub>L</sub>" или "CL") на ее другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Считается, что поверхность соприкосновения между переменными доменами легкой и тяжелой цепи формируют конкретные аминокислотные остатки.

Термины "синтетический полинуклеотид", "синтетический ген" или "синтетический полипептид" в том виде, как они здесь используются, означают то, что соответствующая полинуклеотидная последовательность или ее часть, или аминокислотная последовательность или ее часть происходят из последовательности, которая была сконструирована или синтезирована de novo, или модифицирована по сравнению с эквивалентной последовательностью, встречающейся в природе.

Синтетические полинуклеотиды (антитела или антигенсвязывающие фрагменты) или синтетические гены могут быть получены известными в данной области способами, включая химический синтез нуклеиновокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, но не ограничиваясь ими. Синтетические гены типично отличаются от встречающихся в природе генов либо на аминокислотном, либо на полинуклеотидном уровне (либо на обоих) и типично локализируются в контексте синтетических последовательностей контроля экспрессии. Полинуклеотидные последовательности синтетических генов не обязательно могут кодировать белки с другими аминокислотами по сравнению с природным геном; например, они также могут охватывать синтетические полинуклеотидные последовательности, которые включают другие кодоны, но которые кодируют ту же самую аминокислоту (т.е. нуклеотидные замены представляют молчащие мутации на аминокислотном уровне).

В том, что касается антител, термин "вариабельный домен" относится к вариабельным доменам антител, которые используются при связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность не распределена по всем вариабельным доменам антител равномерно. Наоборот, она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями (также известными как CDR), в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части вариабельных доменов называют "каркасными областями" или "FR". Каждый из вариабельных доменов немодифицированных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4), принимающих, главным образом,  $\beta$ -складчатую конформацию, перемежающихся с тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие и, в некоторых случаях, являющиеся частью  $\beta$ -складчатой структуры. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости посредством FR и, с CDR из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), страницы 647-669).

Термины "гипервариабельная область" и "CDR", при использовании здесь, относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. CDR содержат аминокислотные остатки из трех областей последовательности, которые комплементарно связываются с антигеном и известны как CDR1, CDR2 и CDR3 для каждой из цепей  $V_H$  и  $V_L$ . В вариабельном домене легкой цепи CDR типично соответствуют приблизительно остаткам 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) и 89-97 (CDRL3), и в вариабельном домене тяжелой цепи CDR типично соответствуют приблизительно остаткам 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) и 95-102 (CDRH3) согласно Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Понятно, что CDR разных антител могут содержать вставки, таким образом, нумерация аминокислот может отличаться. Система нумерации Kabat учитывает такие вставки, представляя собой схему нумерации, в которой используются буквы, связанные с конкретными остатками (например, 27A, 27B, 27C, 27D, 27E и 27F CDRL1 в легкой цепи) для того, чтобы отражать любые вставки в нумерациях при сравнении разных антител. В качестве альтернативы, в вариабельном домене легкой цепи CDR типично соответствуют приблизительно остаткам 26-32 (CDRL1), 50-52 (CDRL2) и 91-96 (CDRL3), и в вариабельном домене тяжелой цепи CDR типично соответствуют приблизительно остаткам 26-32 (CDRH1), 53-55 (CDRH2) и 96-101 (CDRH3) согласно Chothia, Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987).

Термин "каркасная область" или "FR" в том виде, как он здесь используется, относится к аминокислотным остаткам каркасной области, которые образуют часть антигенсвязывающего кармана или бороздки. В некоторых воплощениях каркасные остатки образуют петлю, которая представляет собой часть антигенсвязывающего кармана или бороздки, и аминокислотные остатки в данной петле могут контактировать или могут не контактировать с антигеном. Каркасные области обычно содержат области между CDR. В вариабельном домене легкой цепи FR типично соответствуют приблизительно остаткам 0-23 (FRL1), 35-49 (FRL2), 57-88 (FRL3) и 98-109, и в вариабельном домене тяжелой цепи FR типично соответствуют приблизительно остаткам 0-30 (FRH1), 36-49 (FRH2), 66-94 (FRH3) и 103-133 согласно Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Как обсуждалось выше в отношении нумерации легкой цепи по Kabat, в тяжелой цепи вставки также учитываются аналогичным образом (например, 35A, 35B CDRH1 в тяжелой цепи). В качестве альтернативы, в вариабельном домене легкой цепи FR типично соответствуют приблизительно остаткам 0-25 (FRL1), 33-49 (FRL2), 53-90 (FRL3) и 97-109 (FRL4), и в вариабельном домене тяжелой цепи FR типично соответствуют приблизительно остаткам 0-25 (FRH1), 33-52 (FRH2), 56-95 (FRH3) и 102-113 (FRH4) согласно Chothia, Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987).

Константные домены (Fc) антител не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но, скорее, демонстрируют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности посредством взаимодействий с, например, рецепторами Fc (FcR). Домены Fc также могут увеличивать биодоступность антитела в системе кровообращения после введения пациенту. Замена мышинового домена Fc человеческим доменом Fc также может уменьшать побочные реакции НАМА (человеческих противомышиных антител).

Иммуноглобулины можно приписывать к разным классам в зависимости от аминокислотной после-

довательности константного домена их тяжелых цепей. Существует пять главных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделять на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи (Fc), которые соответствуют разным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

"Легкие цепи" антител из любого вида позвоночных могут быть приписаны к одному из двух явно отличающихся типов, именуемых каппа или ("к") и лямбда или ("л"), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающий домен", "фрагмент антитела" или "функциональный фрагмент антитела" используются здесь взаимозаменяемо для отнесения к одному или более чем одному фрагменту антитела, который сохраняет способность специфично связываться с антигеном. Неограничивающие примеры фрагментов антитела, включенных в такие термины, включают (1) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ; (2) фрагмент  $F(ab')_2$ , двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; (4) фрагмент Fv, содержащий домены  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела; (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который содержит домен  $V_H$ ; и (6) выделенная CDR, но не ограничиваются ими. Дополнительно включенными в данное определение являются "половинные" антитела, содержащие одну тяжелую цепь и одну легкую цепь. Здесь также охвачены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела.

Группировки  $F(ab')_2$  и "Fab" можно получать путем обработки Ig протеазой, такой как пепсин и папаин, и они включают фрагменты антител, полученные посредством расщепления иммуноглобулина около дисульфидных связей, существующих между шарнирными областями, в каждой из двух тяжелых цепей. Например, папаин расщепляет IgG выше от дисульфидных связей, существующих между шарнирными областями, в каждой из двух тяжелых цепей, с получением двух гомологичных фрагментов антитела, в которых легкая цепь, состоящая из  $V_L$  и  $C_L$  (константная область легкой цепи), и фрагмент тяжелой цепи, состоящий из  $V_H$  и области  $C_{H1}$  ( $\gamma 1$ ) в константной области тяжелой цепи, соединены на их С-концевых областях дисульфидной связью. Каждый из двух данных гомологичных фрагментов антител называется Fab'. Пепсин также расщепляет IgG ниже от дисульфидных связей, существующих между шарнирными областями, в каждой из двух тяжелых цепей с получением фрагмента антитела, немного большего, чем фрагмент, описанный выше, в котором два вышеупомянутых Fab' соединены в шарнирной области. Данный фрагмент антитела называется  $F(ab')_2$ .

Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен ( $C_{H1}$ ) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена  $C_{H1}$  тяжелой цепи, включающих один или более чем один цистеин из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой здесь обозначение Fab', в котором остаток(ки) цистеина константного домена несёт(ут) свободную тиольную группу. Фрагменты  $F(ab')_2$  антитела исходно получали в виде пар фрагментов Fab', которые имеют между ними цистеины шарнирной области. Также известны другие химические сочетания фрагментов антитела.

"Fv" относится к фрагменту антитела, который содержит полный сайт распознавания антигена и связывания антигена. Данная область состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в тесной нековалентной или ковалентной ассоциации (Fv, связанные дисульфидной связью, были описаны в данной области, Reiter et al. (1996) Nature Biotechnology 14:1239-1245). Именно в этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют с определением антигенсвязывающего сайта на поверхности димера  $V_H$ - $V_L$ . Совместно комбинация одной или более чем одной CDR из каждой цепи  $V_H$  и  $V_L$  придает антителу специфичность связывания антигена. Например, было бы понятным, что, например, CDRH3 и CDRL3 могли бы быть достаточными для придания антителу специфичности связывания антигена при переносе на цепи  $V_H$  и  $V_L$  антителареципиента или его антигенсвязывающего фрагмента, и данную комбинацию CDR можно тестировать на связывание, аффинность и т.д. с использованием любой из описанных здесь методик. Даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных в отношении антигена) имеет способность распознавать и связывать антиген, хотя, вероятно, и с меньшей аффинностью, чем при объединении со вторым переменным доменом. Кроме того, несмотря на то что два домена фрагмента Fv ( $V_L$  и  $V_H$ ) кодируются отдельными генами, их можно соединить с использованием рекомбинантных способов посредством синтетического линкера, который позволяет сделать их в виде одной белковой цепи, в которой области  $V_L$  и  $V_H$  формируют пару с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 и Osbourn et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16:778). Также подразумевается, что такие scFv охвачены термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Любые последовательности  $V_H$  и  $V_L$  специфичного scFv могут быть связаны с кДНК (комплементарная ДНК) или геномными последовательностями области Fc для того, чтобы получать экспрессионные векторы, кодирующие молекулы

полных Ig (например IgG) или других изотипов.  $V_H$  и  $V_L$  также можно использовать в получении Fab, Fv или других фрагментов Ig с использованием либо белковой химии, либо методик рекомбинантных ДНК.

Фрагменты антитела "одноцепочечный Fv" или "sFv" содержат домены  $V_H$  и  $V_L$  антитела, где данные домены присутствуют в одной полипептидной цепи. В некоторых воплощениях полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами  $V_H$  и  $V_L$ , который позволяет sFv формировать желаемую структуру для связывания антигена. Относительно обзора sFv, см., например, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термин "AVDVIER™" относится к классу терапевтических белков человеческого происхождения, которые не являются родственными антителам или фрагментам антител и состоят из нескольких модульных и пригодных для многократного использования связывающих доменов, именуемых А-доменами (также именуемых модуль класса А, повтор типа комплемента или домен рецептора LDL (липопротеин низкой плотности) класса А). Их разработали из доменов внеклеточных человеческих рецепторов путем перетасовки экзонов *in vitro* и фагового дисплея (Silverman et al., 2005, *Nat. Biotechnol.* 23:1493-1494; Silverman et al., 2006, *Nat. Biotechnol.* 24:220). Образующиеся белки могут содержать множество независимых связывающих доменов, которые могут демонстрировать улучшенную аффинность (в некоторых случаях субнанолярную) и специфичность по сравнению с белками, связывающими один эпитоп. См., например, публикации заявок на патент США № 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0053973 и 2005/0089932, 2005/0048512 и 2004/0175756, каждая из которых включена сюда посредством ссылки во всей ее полноте.

Каждый из известных 217 человеческих А-доменов содержит приблизительно 35 аминокислот (приблизительно 4 кДа); и данные домены разделены линкерами, которые имеют в среднем пять аминокислот в длину. Нативные А-домены быстро и эффективно сворачиваются в однородную, стабильную структуру, опосредованную, в первую очередь, связыванием кальция и формированием дисульфидных связей. Для этой общей структуры требуется консервативный каркасный мотив лишь из 12 аминокислот. Конечным результатом является одна белковая цепь, содержащая множество доменов, каждый из которых представляет отдельную функцию. Каждый домен данных белков связывается независимо, и энергетические вклады каждого домена являются аддитивными. Данные белки были названы "AVIMER™" от авидных мультимеров.

Термин "диатела" относится к маленьким фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи в той же самой полипептидной цепи ( $V_H$ - $V_L$ ). Посредством применения линкера, который является слишком коротким для того, чтобы обеспечивать образование пары между двумя доменами на той же самой цепи, заставляют домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

Антигенсвязывающие полипептиды также включают димеры тяжелой цепи, такие как, например, антитела от представителей семейства представителей семейства Верблюдовых и акул. Антитела представителей семейства Верблюдовых и акул содержат гомодимерную пару двух цепей из V-подобных и C-подобных доменов (ни одно не имеет легкой цепи). Поскольку область  $V_H$  димера тяжелых цепей IgG у представителей семейства Верблюдовых не должна образовывать гидрофобных взаимодействий с легкой цепью, область в тяжелой цепи, которая обычно контактирует с легкой цепью, заменена у представителей семейства Верблюдовых гидрофильными аминокислотными остатками. Домены  $V_H$  димера тяжелых цепей IgG называют доменами  $V_{HH}$ . Ig-NAR акул содержат гомодимер из одного вариабельного домена (именуемого V-NAR домен) и пяти C-подобных константных доменов (C-NAR домены). У представителей семейства Верблюдовых разнообразие репертуара антител определяется CDR 1, 2 и 3 в областях  $V_H$  или  $V_{HH}$ . CDR3 в области  $V_{HH}$  верблюда характеризуется ее относительно большой длиной, составляющей в среднем 16 аминокислот (Muyltermans et al., 1994, *Protein Engineering* 7(9): 1129). Это представляет собой отличие от областей CDR3 антител многих других видов. Например, CDR3  $V_H$  мыши имеет в среднем 9 аминокислот. Библиотеки вариабельных областей антител, происходящих из представителей семейства Верблюдовых, которые сохраняют *in vivo* разнообразие вариабельных областей представителей семейства Верблюдовых, можно получать, например, способами, раскрытыми в заявке на патент США с серийным № 20050037421.

"Химерные" формы антител, не являющихся человеческими (например, мышинных), включают химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из Ig, не являющегося человеческим. Главным образом, химерные антитела представляют собой мышинные антитела, в которые вставлена по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, типично по меньшей мере часть константной области человеческого иммуноглобулина, вместо мышинной Fc. Относительно подробностей, см. Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) и Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Термин "моноклональное антитело" в том виде, как он здесь используется, относится к антителу,

полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных происходящих естественным образом мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от традиционных препаратов (поликлональных) антител, которые могут включать разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Модификатор "моноклональный" указывает характер антитела, как полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требование получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature 256:495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). В определенных воплощениях моноклональные антитела можно выделять из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных, например, в Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

Антитела можно выделять и очищать из вышеупомянутых супернатанта культуры или асцитов посредством осаждения насыщенным сульфатом аммония, способом осаждения с эуглобулином, способом с капроновой кислотой, способом с каприловой кислотой, ионообменной хроматографией (на DEAE или DE52) или аффинной хроматографией с использованием колонки против Ig или колонки с белком A, G или L, такой как описанная более подробно ниже.

При конструировании молекулы иммуноглобулина переменные области или их части можно сливать, соединять или иным образом связывать с одной или более чем одной константной областью или ее частью с получением любого из описанных здесь антител. Это можно осуществлять целым рядом способов, известных в данной области, включая методики молекулярного клонирования или прямого синтеза нуклеиновых кислот, кодирующих данные молекулы, но не ограничиваясь ими.

Термин "иммунореактивный" в том виде, как он здесь используется, относится к связывающим агентам, антителам или их фрагментам, которые являются специфичными к последовательности аминокислотных остатков ("сайт связывания" или "эпитоп"), тем не менее, при перекрестной реактивности с другими пептидами/белками, они не являются токсичными в концентрациях, в которых их готовят для введения для применения у человека. Термин "связывание" относится к прямой ассоциации между двумя молекулами, обусловленной, например, ковалентными, электростатическими, гидрофобными и ионными и/или опосредованными водородными связями взаимодействиями при физиологических условиях и включая такие взаимодействия, как солевые мостики и водные мостики, и любые другие традиционные способы связывания. Термин "предпочтительно связывается" означает то, что связывающийся агент связывается с сайтом связывания с большей аффинностью, чем он связывается с неродственными аминокислотными последовательностями. Аффинность может быть по меньшей мере в 1 раз большей, по меньшей мере в 2 раза большей, по меньшей мере в 3 раза большей, по меньшей мере в 4 раза большей, по меньшей мере в 5 раз большей, по меньшей мере в 6 раз большей, по меньшей мере в 7 раз большей, по меньшей мере в 8 раз большей, по меньшей мере в 9 раз большей, в 10 раз большей, по меньшей мере в 20 раз большей, по меньшей мере в 30 раз большей, по меньшей мере в 40 раз большей, по меньшей мере в 50 раз большей, по меньшей мере в 60 раз большей, по меньшей мере в 70 раз большей, по меньшей мере в 80 раз большей, по меньшей мере в 90 раз большей, по меньшей мере в 100 раз большей или по меньшей мере в 1000 раз большей, чем аффинность связывающего агента в отношении неродственных аминокислотных последовательностей. Термины "иммунореактивный" и "предпочтительно связывается" используются здесь взаимозаменяемо.

Термин "аффинность" в том виде, как он здесь используется, относится к константе равновесия для обратимого связывания двух агентов, и она выражается в виде  $K_d$ . Аффинность связывающего белка с лигандом, как, например, аффинность антитела в отношении эпитопа, может быть, например, от примерно 100 наномолярной (нМ) до примерно 0,1 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1 пикомолярной (пМ) или от примерно 100 нМ до примерно 1 фемтомолярной (фМ). Термин "авидность" в том виде, как он здесь используется, относится к устойчивости комплекса из двух или более чем двух агентов к диссоциации после разведения. Кажущиеся аффинности можно определять такими способами, как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или любая другая методика, знакомая специалисту в данной области. Авидности можно определять такими способами, как анализ по Скэтчарду или любая другая методика, знакомая специалисту в данной области.

Термин "эпитоп" относится к той части антигена или другой макромолекулы, которая способна формировать связывающее взаимодействие со связывающим карманом переменной области антитела. Такие связывающие взаимодействия могут проявляться в виде межмолекулярного контакта с одним или более чем одним аминокислотным остатком одной или более чем одной CDR. Связывание антигена может включать, например, CDR3 или пару CDR3, или, в некоторых случаях, взаимодействия вплоть до всех шести CDR цепей  $V_H$  и  $V_L$ . Эпитоп может представлять собой линейную пептидную последовательность (т.е. быть "непрерывным") или может состоять из несмежных аминокислотных последовательностей (т.е. быть "конформационным" или "прерывистым"). Антитело может распознавать одну или более

чем одну аминокислотную последовательность; следовательно, эпитоп может определять более чем одну отдельную аминокислотную последовательность. Эпитопы, распознаваемые антителами, можно определять методиками пептидного картирования и анализа последовательностей, хорошо известными специалистам в данной области. Связывающие взаимодействия проявляются в виде межмолекулярных контактов с одним или более чем одним аминокислотным остатком CDR. TRC105 представляет собой мышинное антитело, которое имеет такую же аминокислотную последовательность, что и мышинное антитело, описанное как Y4-2F1 или SN6j в патентах США номер 5928641, 6200566, 6190660 и 7097836. Эпитопы, распознаваемые Y4-2F1 и SN6j, и, таким образом, TRC105, были идентифицированы ранее.

Термин "специфичный" относится к ситуации, в которой антитело не будет демонстрировать какого-либо значимого связывания с молекулами, отличными от антигена, содержащего эпитоп, распознаваемый данным антителом. Данный термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен является специфичным в отношении конкретного эпитопа, который несут многие антигены, в данном случае антитело сможет связываться с различными антигенами, несущими данный эпитоп. Термины "предпочтительно связывается" или "специфично связывается" означают, что антитела связываются с эпитопом с большей аффинностью, чем они связываются с неродственными аминокислотными последовательностями, и, при перекрестной реактивности с другими полипептидами, содержащими данный эпитоп, не являются токсичными в концентрациях, в которых их готовят для введения для применения у человека. В одном аспекте такая аффинность по меньшей мере в 1 раз больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, в 10 раз больше, по меньшей мере в 20 раз больше, по меньшей мере в 30 раз больше, по меньшей мере в 40 раз больше, по меньшей мере в 50 раз больше, по меньшей мере в 60 раз больше, по меньшей мере в 70 раз больше, по меньшей мере в 80 раз больше, по меньшей мере в 90 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем аффинность антитела в отношении неродственных аминокислотных последовательностей. Термины "иммунореактивный", "связывается", "предпочтительно связывается" и "специфично связывается" используются здесь взаимозаменяемо. Термин "связывание" относится к прямой ассоциации между двумя молекулами, обусловленной, например, ковалентными, электростатическими, гидрофобными и ионными и/или опосредованными водородными связями взаимодействиями при физиологических условиях, и включая такие взаимодействия, как солевые мостики и водные мостики, а также любые другие традиционные способы связывания.

Термин "выделенный" (используется взаимозаменяемо с "по существу, чистый"), при применении к полипептидам, означает полипептид или его часть, который, благодаря его происхождению или манипуляции: (1) присутствует в клетке-хозяине в виде продукта экспрессии части экспрессионного вектора; или (2) связан с белком или другой химической группировкой, отличной от тех, с которыми он связан в природе; или (3) не встречается в природе, например, белок, который подвергся химической манипуляции путем присоединения или добавления к белку по меньшей мере одной гидрофобной группировки так, что данный белок находится в форме, не встречающейся в природе. Под "выделенным", кроме того, подразумевается то, что белок: (1) синтезирован химически; или (2) экспрессирован в клетке-хозяине и очищен от ассоциированных и загрязняющих белков. Данный термин, в общем, означает полипептид, который был отделен от других белков и нуклеиновых кислот, с которыми он встречается в природе. Типично данный полипептид также отделен от таких веществ, как антитела или гелевые матрицы (полиакриламид), которые используются для его очистки.

Терминология, связанная с ангиогенезом.

Термины "ингибиторный в отношении ангиогенеза", "ингибирующий ангиогенез" или "антиангиогенный" в том виде, как они здесь используются, включают ингибирование васкулогенеза, и подразумевается, что они означают осуществление уменьшения степени, количества или скорости образования новых сосудов. Осуществление уменьшения степени, количества или скорости пролиферации или миграции эндотелиальных клеток в ткани является конкретным примером ингибирования ангиогенеза.

Термин "композиция, ингибирующая ангиогенез" относится к композиции, которая ингибирует процессы, опосредованные ангиогенезом, такие как миграция эндотелиальных клеток, пролиферация, формирование трубки, и впоследствии приводит к ингибированию образования новых кровеносных сосудов из существующих сосудов, и, следовательно, влияет на состояния, зависящие от ангиогенеза.

Подразумевается, что термин "состояние, зависимое от ангиогенеза" в том виде, как он здесь используется, означает состояние, где процесс ангиогенеза или васкулогенеза поддерживает или усиливает патологическое состояние или оказывает полезное влияние на нормальные физиологические процессы. Следовательно, лечение состояния, зависимого от ангиогенеза, при котором ангиогенез поддерживает патологическое состояние, могло бы приводить к ослаблению заболевания, тогда как лечение состояния, зависимого от ангиогенеза, при котором ангиогенез оказывает полезное влияние на нормальные физиологические процессы, могло бы приводить, например, к усилению нормального процесса.

Ангиогенез представляет собой образование новых кровеносных сосудов из предсуществующих капилляров или посткапиллярных венул. Васкулогенез происходит в результате образования новых кро-

веносных сосудов, возникающих из ангиобластов, которые являются предшественниками эндотелиальных клеток. Оба процесса приводят к образованию новых кровеносных сосудов и включены в значение термина "состояния, зависящие от ангиогенеза". Подразумевается, что термин "ангиогенез" в том виде, как он здесь используется, включает образование сосудов *de novo*, такое как происходящее в результате васкулогенеза, а также сосудов, возникающих в результате ветвления и отрастания существующих сосудов, капилляров и венул. Ангиогенез также может включать индукцию сигнализации ALK1 и связанного с ней фосфорилирования Smad 1/5/8, и/или сигнализации. Также известно, что CD105 участвует в пути сигнализации ALK1, и, таким образом, он также включен в значение ангиогенеза.

Популяции клеток CD105<sup>+</sup>, инициирующие опухоль, были обнаружены в человеческих почечных карциномах. Клетки CD105<sup>+</sup> имели характеристики опухолевых стволовых клеток, описанных ранее для раковых стволовых клеток, присутствующих в других типах опухолей. Наблюдаемые клетки CD105<sup>+</sup> были клоногенными, экспрессировали маркеры стволовых клеток и не имели маркеров дифференциации, могли дифференцироваться *in vitro* в типы эпителиальных и эндотелиальных клеток и могли генерировать *in vivo* серийно трансплантируемые опухоли. Данные опухоли, несмотря на происхождение из клонов, экспрессирующих мезенхимные маркеры, представляют собой эпителиальные карциномы по происхождению опухоли и характеризуются поддержанием опухолеговой популяции CD105<sup>+</sup> и присутствием популяции неопухолеговых дифференцированных CD105<sup>-</sup>.

Фраза "индуцирование иммунного ответа у хозяина" означает то, что пациент испытывает облегчение или уменьшение признаков или симптомов заболевания и конкретно включает, без ограничения, продление выживания.

Термины "пролиферативное расстройство" и "пролиферативное состояние" в том виде, как они здесь используются, означают любое патологическое или непатологическое физиологическое состояние, характеризующееся нарушенной или нежелательной пролиферацией. Термины "клеточное пролиферативное расстройство" и "клеточное пролиферативное состояние" означают любое патологическое или непатологическое физиологическое состояние, характеризующееся нарушенной или нежелательной пролиферацией клеток, а также включающее состояния, характеризующиеся нежелательной или неблагоприятной пролиферацией клеток или выживанием клеток (например, из-за недостаточного апоптоза), состояния, характеризующиеся недостаточным или нарушенным апоптозом, а также состояния, характеризующиеся нарушенным или нежелательным, или неблагоприятным выживанием клеток. Термин "расстройство дифференциации" означает любое патологическое или непатологическое физиологическое состояние, характеризующееся нарушенной или недостаточной дифференциацией.

Расстройства пролиферации или дифференциации, поддающиеся лечению, включают заболевания и состояния, доброкачественные и неопластические, характеризующиеся ненормальным или нежелательным числом клеток, ростом клеток или выживанием клеток. Такие расстройства или состояния могут, следовательно, составлять болезненное состояние и включают все типы ракового роста или онкогенных процессов, метастатические ткани или злокачественно трансформированные клетки, ткани или органы.

Клетки, участвующие в пролиферативном расстройстве или расстройстве дифференциации могут быть агрегированными в клеточную массу или диспергированными. Термин "несолидная опухоль" относится к неоплазиям гемопозитической системы, таким как лимфомы, миеломы и лейкозы, или к неоплазиям, которые являются диффузными по природе, поскольку они типично не образуют плотную массу. Конкретные примеры лейкозов включают, например, острую и хроническую лимфобластную, миелобластную и множественную миелому.

Термин "солидная опухоль" относится к неоплазиям или метастазам, которые типично агрегируют вместе и образуют массу. Такие расстройства включают новообразования или раковые заболевания, которые могут поражать фактически любой тип клеток или тканей, например карциному, саркому, меланому, метастатические расстройства или гемопозитические неопластические расстройства. Метастатическая опухоль может возникать из множества типов первичных опухолей, включая опухоли молочной железы, легкого, щитовидной железы, головы и шеи, мозга, лимфатической системы, желудочно-кишечного (рот, пищевод, желудок, тонкая кишка, толстая кишка, прямая кишка), мочеполового тракта (матка, яичник, шейка матки, мочевой пузырь, яичко, пенис, предстательная железа), почки, поджелудочной железы, печени, кости, мышцы, кожи и т.д., но не ограничиваясь ими.

Карциномами называют злокачественные заболевания эпителиальной или эндокринной ткани, и они включают карциномы дыхательной системы, карциномы желудочно-кишечной системы, карциномы мочеполовой системы, карциномы яичка, карциномы молочной железы, карциномы предстательной железы, карциномы эндокринной системы и меланомы. Типичные карциномы включают карциномы, образующиеся из шейки матки, легкого, предстательной железы, молочной железы, головы и шеи, толстой кишки, печени и яичника. Данный термин также включает карциносаркомы, например, которые включают злокачественные опухоли, состоящие из карциноматозных и саркоматозных тканей. Аденокарцинома включает карциному железистой ткани, или при которой опухоль образует железисто-подобную структуру.

Раковой тканью, подлежащей лечению, является, например, эндотелиальная ткань или трансформированная клетка, экспрессирующая ненормальный уровень CD105. Термин "трансформированные клет-

ки" в том виде, как он здесь используется, относится к клеткам, которые спонтанно перешли в состояние неограниченного роста, т.е. они приобрели способность расти в культуре посредством неопределенного числа делений. Трансформированные клетки могут быть охарактеризованы такими терминами, как неопластические, анапластические и/или гиперпластические, в том, что касается потери ими контроля роста. Для задач данного изобретения подразумевается, что термины "трансформированный фенотип злокачественных клеток млекопитающих" и "трансформированный фенотип" охватывают любой из следующих фенотипических признаков, ассоциированных с клеточной трансформацией клеток млекопитающих: иммортализация, морфологическая или ростовая трансформация и опухоленность при выявлении посредством длительного роста в культуре клеток, роста в полутвердых средах или опухоленности роста в иммунонекомпетентных или сингенных животных, но не ограничиваются ими.

Термин "антиген опухолевой клетки" определяется здесь как антиген, который присутствует в больших количествах на опухолевой клетке или в жидкостях организма, чем в неродственных опухолевых клетках, нормальных клетках или в нормальной жидкости организма. Присутствие антигена можно тестировать посредством любого числа анализов, известных специалистам в данной области, и они включают, без ограничения, негативный и/или позитивный отбор с использованием антител, как, например, анализ ELISA, радиоиммуноанализ или вестерн-блоттинг.

Термины "апоптоз" или "программируемая гибель клеток" относятся к физиологическому процессу, посредством которого нежелательные или бесполезные клетки устраняются во время развития и других нормальных биологических процессов. Апоптоз представляет собой способ гибели клеток, который происходит при нормальных физиологических условиях, и клетка является активным участником в ее собственной смерти ("клеточное самоубийство"). Он чаще всего встречается во время нормального обмена клеток и тканевого гомеостаза, эмбриогенеза, индукции и поддержания иммунотолерантности, развития нервной системы и атрофии ткани, зависимой от эндокринной системы. Клетки, подвергающиеся апоптозу, демонстрируют характерные морфологические и биохимические характеристики. Данные характеристики включают агрегацию хроматина, конденсацию ядра и цитоплазмы, разделение цитоплазмы и ядра на везикулы, связанные мембраной (апоптозные тельца), которые содержат рибосомы, морфологически интактные митохондрии и ядерный материал. *In vivo* данные апоптозные тельца быстро распознаются и фагоцитируются макрофагами, дендритными клетками или смежными эпителиальными клетками. Из-за этого эффективного механизма удаления апоптозных клеток *in vivo* не индуцируется воспалительный ответ. *In vitro* апоптозные тельца, а также остающиеся фрагменты клеток, в конечном счете, разрушаются и, наконец, лизируются. Эту конечную фазу гибели клетки *in vitro* называли "вторичным некрозом". Апоптоз можно измерять способами, известными специалистам в данной области, такими как определение фрагментации ДНК, экспонирования аннексина V, активации каспаз, высвобождения цитохрома с и т.д. Клетка, которая была индуцирована к гибели, называется здесь "апоптозная клетка".

Здесь определено, что "агент, индуцирующий апоптоз", индуцирует апоптоз/программируемую гибель клетки, и они включают, например, антитела против CD105, антитела против VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), излучение, химиотерапевтические агенты или агенты, лигирующие рецептор, где клетки, например опухолевые клетки или эндотелиальные клетки, индуцируются к тому, чтобы подвергаться клеточной гибели. Типичные агенты, индуцирующие апоптоз, более подробно описаны ниже.

Апоптоз можно тестировать с использованием стандартного анализа апоптоза с аннексином V: клетки NIH:OVCAR-3 выращивают в 6-луночных планшетах (NUNC) и облучают или обрабатывают антагонистом (или в комбинации с другим противораковым лекарственным средством) в течение 4-48 ч, промывают и окрашивают аннексином V-FITC (флуоресцеинизотиоцианат) (BD-Pharmingen) в течение 1 ч. Клетки анализируют проточной цитометрией (Becton-Dickinson, CellQuest), контрастно окрашивают йодидом пропидия и вновь анализируют в проточном цитометре.

Способы получения и экспрессирования антител.

Химерные иммуноглобулины конструировали способами генной инженерии. Большинство химерных иммуноглобулинов, которые были описаны ранее, содержали VH и VL из мышинового моноклонального антитела и CL и Fc человеческого антитела. Можно использовать области Fc из любого из описанных здесь изотипов. Как здесь описано, химерный иммуноглобулин также может включать критерии, посредством которых ограниченное число аминокислот в каркасе варибельной области легкой цепи и/или варибельной области тяжелой цепи модифицируют для повышения аффинности антитела.

Химерные антитела обычно имеют несколько потенциальных преимуществ над мышинными антителами для применения в терапии человека. Поскольку эффекторная часть антитела является человеческой, считается, что она лучше взаимодействует с другими частями человеческой иммунной системы (например, более эффективно разрушает клетки-мишени посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)). Кроме того, человеческая иммунная система не должна распознавать константную область химерного антитела как чужеродную и, следовательно, антительный ответ против такого инъекционного антитела типично должен быть меньшим, чем против полностью чужеродного мышинового антитела. Наконец, известно, что мышинные антитела имеют период полувыведения в человеческой системе кровообращения, который значительно короче, чем период полувыведения человеческих антител. Предположительно химерные антитела могут иметь

более сходный период полувыведения со встречающимися в природе человеческими антителами, позволяя давать меньшие и менее частые дозы.

Когда желательна повышенная аффинность антитела, остатки в пределах CDR антитела можно дополнительно заменять другими аминокислотами. Типично заменяют не более четырех аминокислотных остатков в CDR, и наиболее типично будут заменены не более двух остатков в CDR, за исключением CDR2 тяжелой цепи, где можно заменять вплоть до 10 остатков. Изменения аффинности можно измерять традиционными способами, такими как описанные здесь способы (например, *Viacore*).

Антитела можно конструировать и получать с использованием традиционных методик, известных в данной области. Кроме того, полученные рекомбинантно антитела часто можно продуцировать в больших количествах, в частности, при использовании векторов с высоким уровнем экспрессии.

Для ветеринарных применений можно синтезировать антитело для введения животному, не являющемуся человеком (например примату, корове, лошади, свинье и т.д.), с использованием Fc, не являющейся человеческой.

Для модифицирования нуклеотидов, кодирующих аминокислотные последовательности, с применением методик генной инженерии в сайтах эндонуклеаз рестрикции, можно использовать известные в данной области методики, такие как методики, приведенные и включенные в описание изобретения.

В том, что касается экспрессии, экспрессионной системой является экспрессионная система, в которой применяется система GS (*Lonza*) с использованием гена глутаминсинтетазы в качестве селективируемого маркера. Вкратце, трансфекцию проводят в клетках CHO (яичники китайского хомяка) посредством электропорации (250 В) с применением системы GS (*Lonza*), используя ген глутаминсинтетазы в качестве селективируемого маркера. Клетки CHO дикого типа выращивают в DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко) (*Sigma*), содержащей 10% диализированной фетальной телячьей сыворотки (FCS) с 2 мМ глутамином.  $6 \times 10^7$  клеток CHO трансфицируют 300 мкг линейаризованной ДНК посредством электропорации. После электропорации клетки ресуспендируют в DMEM с глутамином и переносят на  $36 \times 96$ -луночных планшетов (50 мкл/лунку) и инкубируют при 37°C в 5%-ном CO<sub>2</sub>. На следующие сутки добавляют 150 мкл/лунку селективной среды (DMEM без глутаминина). Приблизительно через 3 недели колонии подвергают скринингу посредством ELISA (см. ниже) с использованием иррелевантного антитела в качестве негативного контроля. Все колонии, продуцирующие более 20 мкг/мл, размножают в 24-луночных планшетах и затем в колбах T25 в двойной повторности.

Для продуцирования на высоком уровне широко используемой экспрессионной системой млекопитающих является экспрессионная система, в которой используется процедура амплификации генов, обеспечиваемая дефицитными по дегидрофолатредуктазе ("dhfr-") клетками яичника китайского хомяка. Данная система основана на гене дегидрофолатредуктазы "dhfr", который кодирует фермент DHFR, который катализирует превращение дегидрофолата в тетрагидрофолат. Для достижения высокой продукции клетки CHO dhfr- трансфицируют экспрессионным вектором, содержащим функциональный ген DHFR вместе с геном, который кодирует желательный белок. В данном случае желательным белком является рекомбинантная тяжелая цепь и/или легкая цепь антитела.

Посредством увеличения количества конкурентного ингибитора DHFR-метотрексата (MTX) у рекомбинантных клеток развивается устойчивость посредством амплификации гена dhfr. В стандартных случаях используемая амплификационная единица значительно больше, чем размер гена dhfr, и в результате соамплифицируется тяжелая цепь антитела.

Когда желательна крупномасштабная продукция белка, такого как цепь антитела, принимаются во внимание как уровень экспрессии, так и стабильность используемых клеток. В долговременной культуре популяции рекомбинантных клеток CHO теряют гомогенность в отношении их удельной продуктивности антител во время амплификации, даже несмотря на то что они происходят из одного родительского клона.

Согласно настоящей заявке предложен выделенный полинуклеотид (нуклеиновая кислота), кодирующий антитело или его часть, как здесь описано, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева и экспрессионные системы для осуществления транскрипции и трансляции таких полинуклеотидов в полипептиды.

Согласно настоящей заявке также предложены конструкции в форме плазмид, векторов, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, как описано выше.

Согласно настоящей заявке также предложена рекомбинантная клетка-хозяин, которая содержит одну или более чем одну конструкцию, как описано выше. Нуклеиновая кислота, кодирующая любое описанное здесь антитело, образует один аспект настоящей заявки, как и способ получения антитела, который включает экспрессию от кодирующей его нуклеиновой кислоты. Экспрессии можно с удобством добиваться путем культивирования рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих данную нуклеиновую кислоту, при подходящих условиях. После продуцирования путем экспрессии антитело или его часть можно выделять и/или очищать с использованием любой подходящей методики, а затем использовать подходящим образом.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие специфичные антитела (или их части), и векторы, содержащие данные молекулы нуклеиновых кислот, можно получать выделенными и/или очищенными, например, из их природного окружения в, по существу, чистой или гомогенной форме. В случае нуклеиновой кислоты - не содержащей или, по существу, не содержащей нуклеиновую кислоту или гены, которые имеют происхождение, отличное от последовательности, кодирующей полипептид с требующейся функцией. Нуклеиновокислотные последовательности могут содержать ДНК или РНК и могут быть полностью или частично синтетическими. Способы очистки хорошо известны в данной области.

Хорошо известны системы для клонирования и экспрессии полипептида в ряде разных клеток-хозяев. Подходящие клетки-хозяева включают бактерии, клетки млекопитающих, дрожжи и бакуловирусные системы. Линии клеток млекопитающих, доступные в данной области для экспрессии гетерологичного полипептида, включают клетки яичника китайского хомяка, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка, клетки миеломы мыши NS0 и многие другие, но не ограничиваются ими.

Также полезным в экспрессии последовательностей ДНК является широкий спектр одноклеточных клеток-хозяев. Данные хозяева включают хорошо известных эукариотических и прокариотических хозяев, таких как штаммы *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, грибы, такие как дрожжи, и клетки животных, такие как клетки CHO (яичника китайского хомяка), YB/20, NS0, SP2/0, R1.1, B-W и L-M, клетки почки африканской зеленой мартышки (например, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 и BMT10), клетки насекомых (e.g., Sf9), человеческие клетки и растительные клетки в культуре ткани.

В данной области хорошо известна экспрессия антител или их частей в прокариотических клетках, таких как *E. coli*. Относительно обзора см., например, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991).

В качестве опции для продуцирования описанных здесь антител специалистам в данной области также доступна экспрессия в эукариотических клетках в культуре, относительно недавних обзоров см., например, Raff M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560, каждая из которых включена сюда посредством ссылки во всей ее полноте.

Можно выбрать или сконструировать подходящие векторы, содержащие подходящие регуляторные последовательности, включающие промоторные последовательности, терминаторные последовательности, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности, сообразно обстоятельствам. Векторы могут представлять собой плазмиды, вирусные векторы, например фаг или фагмиду, сообразно обстоятельствам. Относительно дальнейших подробностей, см., например, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Многие известные методики и протоколы для манипуляции с нуклеиновой кислотой, например, при получении нуклеиновокислотных конструкций, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов, и для анализа белков подробно описаны в *Short Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Описания способов Sambrook et al. и Ausubel et al. включены сюда посредством ссылки во всей их полноте и являются хорошо известными в данной области.

Таким образом, согласно другому аспекту предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, как здесь описано. Согласно еще одному аспекту предложен способ, включающий введение такой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Для введения можно использовать любую доступную методику. Для эукариотических клеток подходящие методики могут включать, например, трансфекцию с фосфатом кальция, DEAE декстраном (диэтиламиноэтилдекстран), электропорацию, трансфекцию, опосредованную липосомами, и трансдукцию с использованием ретровируса или другого вируса, например вируса коровьей оспы или, в случае клеток насекомых, бакуловируса. Для бактериальных клеток подходящие методики могут включать, например, трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофага.

После введения может следовать вызывание или обеспечение экспрессии от нуклеиновой кислоты, например, путем культивирования клеток-хозяев при условиях для экспрессии гена.

В одном воплощении нуклеиновая кислота интегрируется в геном (например в хромосому) клетки-хозяина. Интеграция может стимулироваться включением последовательностей, которые стимулируют рекомбинацию с геномом, согласно стандартным методикам. Может быть инициировано Ig-усиление, по мере необходимости для максимизации экспрессии.

Согласно настоящей заявке также предложен способ, который включает применение конструкции, как изложено выше, в экспрессионной системе для того, чтобы осуществлять экспрессию антител (или их частей), как описано выше.

Настоящая заявка также относится к выделенным нуклеиновым кислотам, таким как молекулы рекомбинантной ДНК или клонированные гены, или их вырожденные варианты, мутанты, аналоги или фрагменты, которые кодируют антитело, которое связывается с CD105.

В другом воплощении всю последовательность ДНК рекомбинантной молекулы ДНК или клонированного гена описанных здесь антитела или его части можно связывать функциональным образом с последовательностью контроля экспрессии, которую можно вводить подходящему хозяину. Данная заявка, соответственно, распространяется на одноклеточных хозяев, трансформированных клонированным геном или молекулой рекомбинантной ДНК, содержащей последовательность ДНК, кодирующую  $V_H$ ,  $V_L$ ,

$C_L$  и/или  $F_c$  антитела.

Другим признаком является экспрессия раскрытых здесь последовательностей ДНК. Как хорошо известно в данной области, последовательности ДНК можно экспрессировать путем их связывания функциональным образом с последовательностью контроля экспрессии в подходящем экспрессионном векторе и использования данного экспрессионного вектора для трансформации подходящего одноклеточного хозяина.

Такое связывание функциональным образом последовательности ДНК с последовательностью контроля экспрессии, естественно, включает предоставление иницирующего кодона, ATG, если он еще не является частью последовательности ДНК, в правильной рамке считывания перед последовательностью ДНК.

Полинуклеотиды и векторы могут быть предоставлены в выделенной и/или очищенной форме (например, не содержащими или, по существу, не содержащими полинуклеотидов другого происхождения, чем полинуклеотид, кодирующий полипептид с требующейся функцией). Термины "по существу, чистый" и "по существу, не содержащий" в том виде, как они здесь используются, относятся к раствору или суспензии, содержащим меньше, чем, например, примерно 20% или менее постороннего вещества, примерно 10% или менее постороннего вещества, примерно 5% или менее постороннего вещества, примерно 4% или менее постороннего вещества, примерно 3% или менее постороннего вещества, примерно 2% или менее постороннего вещества или примерно 1% или менее постороннего вещества.

При осуществлении экспрессии последовательностей ДНК по настоящему изобретению можно использовать широкий спектр комбинаций хозяев/экспрессионных векторов. Полезные экспрессионные векторы, например, могут состоять из отрезков последовательностей хромосомной, нехромосомной и синтетической ДНК. Подходящие векторы включают производные SV40 и известные бактериальные плазмиды, например плазмиды *E.coli* col E1, Pcr1, Pbr322, Pmb9 и их производные, такие плазмиды, как RP4; фаговые ДНК, например многочисленные производные фага  $\lambda$ , например NM989, и ДНК других фагов, например M13 и одноцепочечную ДНК нитчатого фага; дрожжевые плазмиды, такие как плазида 2 $\mu$  или ее производные; полезные в эукариотических клетках векторы, такие как векторы, полезные в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, происходящие из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, таких как плазмиды, которые были модифицированы для применения фаговой ДНК, но неограничиваются ими, или другие последовательности контроля экспрессии и тому подобное.

Здесь также предложена рекомбинантная клетка-хозяин, которая содержит одну или более чем одну полинуклеотидную конструкцию. Полинуклеотид, кодирующий антитело, как здесь предложено, образует один аспект настоящей заявки, как и способ получения антитела, который включает экспрессию от одного или более чем одного полинуклеотида. Экспрессия может достигаться, например, путем культивирования рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих полинуклеотид, при подходящих условиях. Антитело можно затем выделять и/или очищать с использованием любой подходящей методики и использовать подходящим образом.

Для экспрессии последовательностей ДНК в данных векторах можно использовать любую из широкого спектра последовательностей контроля экспрессии - последовательностей, которые контролируют экспрессию последовательности ДНК, связанной с ними функциональным образом. Такие полезные последовательности контроля экспрессии включают, например, ранние или поздние промоторы SV40, CMV (цитомегаловирус), вируса коровьей оспы, полиомы или аденовируса, систему lac, систему trp, систему TAC, систему TRC, систему LTR, области главного оператора и промотора фага  $\lambda$ , контрольные области белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы (например, Pho5), промоторы дрожжевых факторов спаривания альфа и другие последовательности, для которых известно, что они контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и их различные комбинации.

Будет понятно, что не все векторы, последовательности контроля экспрессии и хозяева будут одинаково хорошо функционировать для экспрессии последовательностей ДНК. Все хозяева также не будут функционировать одинаково хорошо при использовании той же самой системы экспрессии. Однако специалист в данной области без чрезмерного экспериментирования сможет выбрать подходящие векторы, последовательности контроля экспрессии и хозяева для осуществления желаемой экспрессии без отступления от объема данной заявки. Например, при выборе вектора должен рассматриваться хозяин, так как вектор должен функционировать в нем. Также будут рассматриваться число копий вектора, способность контролировать данное число копий и экспрессия любых других белков, кодируемых вектором, таких как маркеры антибиотиков. Обычный специалист в данной области может выбирать подходящие векторы, последовательности контроля экспрессии и хозяева для осуществления желаемой экспрессии без отступления от объема данной заявки. Например, при выборе вектора рассматривается хозяин, так как вектор функционирует в нем. Также могут рассматриваться число копий вектора, способность контролировать данное число копий и экспрессия любых других белков, кодируемых вектором, таких как маркеры антибиотиков.

Согласно настоящей заявке также предложены конструкции в форме плазмид, векторов, транс-

крипционных или экспрессионных кассет, как описано здесь в других местах, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, как описано выше. Можно выбрать или сконструировать подходящие векторы, содержащие подходящие регуляторные последовательности, включающие промоторные последовательности, терминаторные последовательности, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, селективируемые маркеры и другие последовательности, сообразно обстоятельствам. Векторы могут представлять собой плазмиды, вирусные, например фаг, фагмида и т.д., сообразно обстоятельствам. Относительно дальнейших подробностей, см., например, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Многие известные методики и протоколы для манипуляции с нуклеиновой кислотой, например при получении нуклеиновокислотных конструкций, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов, и для анализа белков подробно описаны в *Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition*, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Способы и описания Sambrook et al. и Ausubel et al. включены сюда посредством ссылки.

При выборе последовательности контроля экспрессии обычно будет рассматриваться множество факторов. Они включают, например, относительную силу системы, ее контролируемость и ее совместимость с конкретной последовательностью ДНК или геном, подлежащим экспрессии, особенно в том, что касается потенциальных вторичных структур. Подходящие одноклеточные хозяева будут выбраны при рассмотрении, например, их совместимости с выбранным вектором, их характеристик секреции, их способности правильно сворачивать белки и требований для их ферментации, а также токсичности для хозяина продукта, кодируемого последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, и легкости очистки продуктов экспрессии.

Согласно другому аспекту предложена клетка-хозяин, содержащая один или более чем один полинуклеотид, как здесь описано. Согласно еще одному аспекту предложен способ введения такого одного или более чем одного полинуклеотида в клетку-хозяина посредством любой доступной методики. Для эукариотических клеток подходящие методики могут включать, например, трансфекцию с фосфатом кальция, DEAE декстраном, электропорацию, трансфекцию, опосредованную липосомами, и трансдукцию с использованием ретровируса или другого вируса (например, вируса коровьей оспы) или, в случае клеток насекомых, бакуловируса. Для бактериальных клеток подходящие методики могут включать, например, трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофагов.

После введения может следовать вызывание или обеспечение экспрессии от одного или более чем одного полинуклеотида, например, путем культивирования клеток-хозяев при условиях для экспрессии одного или более чем одного полипептида от одного или более чем одного полинуклеотида. Можно использовать индуцибельные системы, и экспрессия индуцируется добавлением активатора.

В одном воплощении полинуклеотиды могут интегрироваться в геном (например, в хромосому) клетки-хозяина. Интеграция может стимулироваться включением последовательностей, которые стимулируют рекомбинацию с геномом, согласно стандартным методикам. В другом воплощении нуклеиновая кислота сохраняется на эписомном векторе в клетке-хозяине.

Здесь предложены способы, которые включают применение конструкции, как изложено выше, в экспрессионной системе для того, чтобы осуществлять экспрессию конкретного полипептида.

Принимая во внимание эти и другие факторы, специалист в данной области сможет сконструировать множество комбинаций вектор/последовательность контроля экспрессии/хозяин, которые будут экспрессировать последовательности ДНК при ферментации или в крупномасштабной животной культуре.

Полинуклеотид, кодирующий антитело или его часть, можно получать рекомбинантно/синтетически в дополнение к клонированию или вместо клонирования. Можно конструировать полинуклеотид с подходящими кодонами. В общем, при использовании последовательности для экспрессии будут выбраны предпочтительные кодоны для намеченного хозяина. Полный полинуклеотид может быть собран из перекрывающихся олигонуклеотидов, полученных стандартными способами и собранных в полную кодирующую последовательность. См., например, Edge, *Nature*, 292:756 (1981); Nambair et al., *Science*, 223:1299 (1984); Jay et al., *J. Biol. Chem.*, 259:6311 (1984).

Одновременное включение нуклеиновых кислот, кодирующих антитело (или его часть), и замены аминокислот в выбранных положениях можно осуществлять рядом способов, известных специалистам в данной области, включающих, например, рекомбинантные способы и химический синтез.

Антитела против CD105.

Эндоглин (CD105) экспрессируется на поверхности клетки в виде 180 кДа гомодимерного трансмембранного белка. Наружный домен с высокой аффинностью (50 нМ) связывается с изоформами 1 и 3 TGF- $\beta$  (бета-трансформирующий фактор роста), и трансмембранный и внутриклеточный домены CD105 имеют 71%-ное сходство последовательности с бета-гликаном. Человеческий ген CD105 локализован на хромосоме 9q34 при идентификации флуоресцентной гибридизацией *in situ*, и кодирующая область содержит 14 экзонов, и были охарактеризованы две разные изоформы (L и S) CD105 со способностью свя-

зваться с TGF- $\beta$ . L-CD105 состоит из 633 аминокислотных остатков с 47 аминокислотными остатками в цитоплазматическом хвосте, в отличие от S-CD105, который состоит из 600 аминокислотных остатков с 14-аминокислотным цитоплазматическим хвостом. Однако L-CD105 является преобладающей формой. В эндотелиальных клетках CD105 является конститутивно фосфорилированным, главным образом, по остаткам серина и треонина, и данное фосфорилирование обусловлено конститутивно активным в клетке RII TGF- $\beta$ . Связывание TGF- $\beta$  с CD105 приводит к понижающей регуляции фосфорилирования, аналогично эффектам, наблюдаемым с ингибиторами протеинкиназы C. Аминокислотная последовательность человеческого CD105 содержит трипептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD), локализованный в экспонированной области внеклеточного домена. Пептид RGD является ключевой распознаваемой структурой, находящейся на белках ЕСМ (внеклеточный матрикс), таких как фибронектин, витронектин, фактор фон Виллебранда (vWF), коллаген типа I и фибриноген, и он распознается интегринами поверхности клетки. Интегриновую адгезию связывали с гемостазом, тромбозом, ангиогенезом и воспалением - процессами, в которых критическую роль играет эндотелий. (Duff et al., FASEB J., 17:984-992 (2003)).

CD105 является членом семейства рецепторов TGF- $\beta$ , который экспрессируется пролиферирующими эндотелиальными клетками. Для пролиферации эндотелиальных клеток нужны нормальные уровни CD105. Экспрессия CD105 усиливается клеточной гипоксией через продукцию индуцируемого гипоксией фактора 1- $\alpha$  (HIF-1- $\alpha$ ) и защищает гипоксические клетки от апоптоза. Несколько функций CD105 ассоциированы с сигнализацией TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  осуществляет сигнализацию через гетеродимерные рецепторы, состоящие из сериновых киназ - рецептор I (RI) и рецептор II (RII). Связывание TGF- $\beta$  с наружными доменами рецептора демаскирует цитоплазматическую активность киназы RII, которая фосфорилирует RI TGF- $\beta$ , который может затем взаимодействовать с расположенными ниже участниками пути сигнализации, такими как белки Smad. CD105 образует часть рецепторного комплекса TGF- $\beta$ , но он может существовать на поверхности клетки независимо. Во многих клетках CD105 подавляет сигнализацию TGF- $\beta$  *in vitro*.

CD105 также связывается с другими факторами роста, такими как активин A и морфогенные белки кости (BMP) -10, -9, -7 и -2. Для связывания TGF- $\beta$  или других лигандов факторов роста с CD105 требуется присутствие, по меньшей мере, рецептора RII, и он сам по себе не может связываться с лигандами. Ассоциация CD105 с рецепторами не изменяет их аффинности в отношении самого лиганда. При ассоциации цитоплазматический домен CD105 фосфорилируется RI TGF- $\beta$  и RII TGF- $\beta$ ; затем киназа RI TGF- $\beta$ , но не RII TGF- $\beta$  диссоциирует от рецепторного комплекса.

Экспрессия CD105 ингибирует уровни фосфорилирования RII TGF- $\beta$ , но увеличивает уровни фосфорилирования RI TGF- $\beta$ , приводя к повышенному фосфорилированию Smad 2, но не Smad 3. Поскольку Smad 2 может взаимодействовать с множеством транскрипционных факторов, соактиваторов и супрессоров, фосфорилированный Smad 2 может действовать в качестве интегратора многочисленных сигналов, модулируя транскрипцию генов. Таким образом, CD105 модулирует функции TGF- $\beta$  через взаимодействие с RI TGF- $\beta$  и RII TGF- $\beta$  и модифицирует фосфорилирование работающих ниже белков Smad.

CD105 действует, модулируя сигнализацию многочисленных комплексов рецепторных киназ надсемейства TGF- $\beta$ , включая рецепторы TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ RI), киназы, подобные рецептору активина (ALK) и рецепторы активина. В отсутствие CD105 активация рецепторов TGF- $\beta$  приводит к фосфорилированию белков SMAD (SMAD 2 и 3), которые ингибируют рост эндотелиальных клеток. Однако активация CD105 посредством TGF- $\beta$  модулирует фосфорилирование белка SMAD (включая фосфорилирование SMAD 1, 5 и 8). Конечным результатом является высвобождение ингибирующих рост эффектов активации рецептора TGF- $\beta$  на эндотелиальные клетки (см. фиг. 2). Не удивительно то, что предотвращение активации CD105 посредством антитела против CD105 или антисмыслового олигонуклеотида действует синергетически с TGF- $\beta$ , предотвращая рост эндотелиальных клеток.

Промотор CD105 имеет длину 2,6 т.п.н., но не содержит ТАТА-боксы или СААТ-боксы, иницирующие транскрипцию. Однако он имеет две GC-богатые области, консенсусные мотивы для Sp1, ets, GAT A, AP-2, NGF- $\beta$  и Mad, а также элементы ответа на TGF- $\beta$ . Тем не менее, CD105 имеет относительно ограниченное распределение в клетках. Для базового уровня транскрипции, по-видимому, требуется сайт ets в положении -68 и сайты Sp1, но относительное ограничение экспрессии, например, эндотелиальными клетками, по-видимому, включает многочисленные регуляторные области, в частности, одну в положении от -1294 до -932 и другую - очень близко к сайту инициации транскрипции. CD105 подвергается повышающей регуляции посредством TGF- $\beta$ , и было показано, что для этого требуется сайт Sp1 в положении от -37 до -29, также включающий расположенные выше смежно один или более чем один сайт SBE, связывающий Smad 3 и/или 4 (которые активируются сигнализацией TGF- $\beta$ ). Гипоксия является общей характеристикой ишемических тканей и опухолей и мощным стимулятором экспрессии гена CD105 в сосудистых эндотелиальных клетках (ЕС). Такой эффект потенцируется в комбинации с TGF- $\beta$  1. Подвергающийся повышающей регуляции CD105 может иметь самозащитную роль в ЕС при гипоксическом стрессе.

Сосудистые ЕС являются главным источником CD105. Другие типы клеток, включающие гладко-

мышечные клетки сосудов, фибробласты, макрофаги, лейкозные клетки пре-B и миеломоноцитарного происхождения и эритроидные предшественники экспрессируют CD105 в меньшей степени.

CD105 участвует в ангиогенезе. Эксперименты с антисмысловыми последовательностями продемонстрировали, что подавление экспрессии CD105 в HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека) приводит к заметному ингибированию ангиогенеза *in vitro* в комбинации с TGF- $\beta$ 1, указывая на то, что CD105 является проангиогенным компонентом в эндотелиальных клетках. Другое доказательство важной роли CD105 в ангиогенезе происходит из исследований нокаутированных по CD105 мышей. "Нулевые" по CD105 мыши демонстрируют многочисленные сосудистые и сердечные дефекты, приводящие к смерти на ранней эмбриональной стадии. Тяжелые сосудистые нарушения, наблюдаемые у "нулевых" по CD105 мышей, указывают на то, что CD105 требуется для образования зрелых кровеносных сосудов в экстраэмбриональной сосудистой сети, дополнительно подтверждая прямую роль CD105 в ангиогенезе.

CD105, также известный, среди прочего, как эндоглин или edg-1, представляет собой гомодимерный мембранный гликопротеин типа I, который экспрессируется на высоком уровне в пролиферирующих эндотелиальных клетках сосудов. Таким образом, CD105, прежде всего, представляет собой ассоциированный с пролиферацией маркер эндотелиальных клеток, претерпевающих активный ангиогенез. Однако может иметь место ограниченная экспрессия CD105 эндотелием сосудов нормальных тканей. Известно, что человеческий CD105 специфично связывается с трансформирующим фактором роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), и выведенная аминокислотная последовательность CD105 имеет сильную гомологию с  $\beta$ -гликаном - типом рецептора TGF- $\beta$ .

CD105 служил в качестве мишени в способах уменьшения сосудистой сети опухоли, основанных на антителах, поскольку CD105 представляет собой ассоциированный с пролиферацией антиген на эндотелиальных и лейкозных клетках. Его экспрессия подвергается повышающей регуляции в эндотелии сосудов, ассоциированном с опухолью, и CD105 является необходимым для ангиогенеза. Ангиогенез включает образование новых капиллярных кровеносных сосудов, приводя к неоваскуляризации, а также к поддержанию существующей сосудистой сети. Он представляет собой сложный процесс, который включает серию последовательных стадий, включающих опосредованную эндотелиальными клетками деградацию базальной мембраны сосудов и интерстициальных матриц, миграцию эндотелиальных клеток, пролиферацию эндотелиальных клеток и образование эндотелиальными клетками петель капилляров.

CD105 может находиться на клетках, которые составляют и поддерживают существующую сосудистую сеть, а также на клетках, которые стимулируют рост и становятся частью новой сосудистой сети. Данные антитела могут связываться с CD105 и, посредством этого, ингибировать ангиогенез, ингибировать существующую сосудистую сеть или поддержание существующей сосудистой сети, и/или ингибировать расширение маленьких сосудов. Помимо их применения для очистки CD105, данные антитела являются полезными для очистки, выявления и диагностических целей, а также терапевтических целей. Предложенные здесь антитела можно использовать для получения лекарственных средств для лечения множества состояний и заболеваний, в способах лечения указанных состояний и заболеваний и в способах выявления или диагностики. Термин "ангиогенез" в том виде, как он здесь используется, включает рост и/или развитие новых кровеносных сосудов (также именуемое неоваскуляризацией), расширение маленьких сосудов, избыточный или продолжительный рост сосудов и поддержание существующей сосудистой сети. Ангиогенными состояниями и заболеваниями называют те заболевания и состояния, которые связаны, вызваны или ассоциированы с ангиогенезом. Неограничивающие примеры таких заболеваний включают, например, различные формы рака (первичные опухоли и метастазы). Были получены мышинные моноклональные антитела (mAb) против CD105, которые модулируют активность CD105 и, посредством этого, ингибируют ангиогенез и/или ингибируют расширение маленьких кровеносных сосудов. Данные мышинные антитела описаны в патентах США 5928641, 6200566, 6190660 и 7097836, каждый из которых включен сюда во всей их полноте. Кроме того, была продемонстрирована эффективность ряда данных антител *ex vivo* и *in vivo*; моноклональные антитела, которые связываются с CD105, представляют интерес в качестве соединений, модулирующих CD105. Терапевтическое применение мышинных антител, однако, не является возможным, поскольку введение мышинных антител имеет ряд ограничений, включая иммуногенность, например, в форме человеческих противомышиных антител (HAMA).

Описано несколько антител против CD105, в частности, моноклональные антитела ("mAb") против CD105. MAb SN6 представляет собой антитело, полученное в результате иммунизации мышей смесями гликопротеинов клеточных мембран человеческих лейкозных клеток (Haruta and Seon, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7898-7902). SN6 представляет собой мышинное mAb, которое распознает человеческий CD105. MAb 44G4 представляет собой антитело, полученное в результате иммунизации мышей цельноклеточными суспензиями человеческих пре-B лейкозных клеток (Gougos, Letarte, 1988, J. Immunol. 141:1925-1933; 1990, J. Biol. Chem. 265:8361-8364). 44G4 также представляет собой мышинное mAb, которое распознает человеческий CD105. MAb MJ7/18 представляет собой антитело, полученное в результате иммунизации крыс воспаленной кожей мышей (Ge, Butcher, 1994, выше). MJ7/18 также представляет собой mAb, которое распознает мышинный CD105. MAb Tec-11 представляет собой антитело, полученное

в результате иммунизации мышей человеческими эндотелиальными клетками пупочной вены (Burgows et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1623-1634). Тес-11 представляет собой мышинное mAb с реактивностью, ограниченной человеческим CD105. Здесь описаны химерные антитела, которые связываются с CD105, которые демонстрируют пониженную иммуногенность при сохранении и/или улучшении их специфичности. Кроме того, для решения проблем, ассоциированных с мышинными антителами, здесь описаны химерные антитела, которые связываются с CD105 и уменьшают и/или ингибируют ангиогенез, демонстрирующие пониженную иммуногенность при сохранении и/или улучшении их специфичности. Данные антитела против CD105 являются полезными для диагностики и лечения различных состояний и заболеваний, а также для очистки и выявления CD105. Антитела против CD105 представляют собой важную область для разработки терапий для лечения множества заболеваний и состояний, в которые вовлечен ангиогенез, которые подвержены влиянию или воздействию ангиогенеза.

Здесь предложены антитела, которые связываются с CD105. Также предложены антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются с CD105 и ингибируют (частично или полностью) или управляют/подвергают воздействию (частично или полностью) ангиогенез/неоваскуляризацию, расширение маленьких сосудов, ингибирование пролиферации клеток или ингибирование роста опухоли. Аналогично, ингибирование функции CD105 (например, сигнализации, связывания, активации и тому подобного) также включено в значение ингибирования или связывания CD105. В еще одном воплощении антитело ингибирует ангиогенез путем связывания с CD105. Согласно данной заявке также предложены линии клеток, которые можно использовать для продуцирования антител, способы получения данных линий клеток, способы осуществления экспрессии антител и их очистки.

Понятно, что антитела, которые специфично связываются с CD105, полученные с использованием описанных здесь способов, можно тестировать с использованием предложенных здесь или известных в данной области анализов на способность связываться с CD105, используя традиционные способы, включая, без ограничения, ELISA. Аффинность описанных здесь антител также можно определять с использованием традиционных способов, включая, без ограничения, Biacore или поверхностный плазмонный резонанс.

Здесь предложены антитела, которые связываются с CD105. Также здесь предложены антитела, которые связываются с CD105 и ингибируют ангиогенез.

Здесь предложено антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 3, и константную область (Fc) гамма 1 ( $\gamma 1$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4; и константную область (Fc), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4.

В другом неограничивающем воплощении антитело против CD105 содержит CDR1  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 5, CDR2  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 6, CDR3  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 7, CDR1  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 8, CDR2  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 9, и CDR3  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 10.

В другом неограничивающем воплощении выделенное гуманизованное, деиммунизованное антитело против CD105 может содержать вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 12. Другие неограничивающие примеры гуманизованных-деиммунизованных тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16, но не ограничиваются ими. Другие неограничивающие примеры гуманизованных-деиммунизованных легких цепей включают SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23, но не ограничиваются ими. Данные последовательности приведены ниже в примере 17.

В другом аспекте согласно настоящей заявке предложено антитело, способное конкурировать с описанным здесь антителом против CD105 при условиях, в которых по меньшей мере 5% антитела, имеющего последовательности  $V_H$  и  $V_L$  антитела, заблокировано от связывания с CD105 путем конкуренции с таким антителом в анализе ELISA.

Здесь предложены нейтрализующие антитела, которые связываются с CD105 и модулируют активность CD105. Данное нейтрализующее антитело может, например, ингибировать ангиогенез путем связывания с CD105.

Описанные здесь антитела являются полезными в применениях для выявления или диагностики, как более подробно описано ниже. Описанные здесь антитела являются полезными для связывания с CD105, что, в свою очередь, может ингибировать ангиогенез, как здесь описано.

Описанные здесь антитела могут дополнительно содержать терапевтическую группировку для использования в терапевтических применениях.

Описанные здесь антитела также можно использовать в виде иммуноконъюгатов. Термин "иммуноконъюгаты" в том виде, как он здесь используется для задач описания и формулы изобретения, относится к конъюгатам, состоящим из антител против CD105 или их фрагментов согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одной терапевтической метки. Терапевтические метки включают противоопухолевые агенты и ингибиторы ангиогенеза. Такие противоопухолевые агенты известны в данной области и включают токсины, лекарственные средства, ферменты, цитокины, радиоактивные изотопы, фотодинамические агенты и ингибиторы ангиогенеза, но не ограничиваются ими. Токсины включают цепь А рибцина, мутантные экзотоксины *Pseudomonas*, дифтерийный анатоксин, стрептонигрин, боамицин, сапорин, гелонин и антивирусный белок лаконоса, но не ограничиваются ими. Лекарственные средства включают даунорубицин, метотрексат и калихеамицины. Радиоактивные изотопы включают радиоактивные металлы. Цитокины включают трансформирующий фактор роста (TGF)- $\beta$ , интерлейкины, интерфероны и факторы некроза опухолей, но не ограничиваются ими. Фотодинамические агенты включают порфирины и их производные, но не ограничиваются ими. Дополнительные терапевтические метки будут известны в данной области и также здесь рассматриваются. Способы образования комплекса mAb против CD105 или их фрагментов с по меньшей мере одним противоопухолевым агентом хорошо известны специалистам в данной области (т.е. конъюгаты антител, обзор которых дается Ghetie et al., 1994, *Pharmacol. Ther.* 63:209-34). В таких способах можно использовать один из нескольких доступных гетеробифункциональных реактивов, используемых для соединения или связывания молекул. Здесь, кроме того, описаны дополнительные радиоактивные изотопы, наряду с дополнительными способами связывания молекул, таких как терапевтические и диагностические метки.

Антитела можно модифицировать с использованием методик, известных в данной области для различных целей, таких как, например, добавление полиэтиленгликоля (ПЭГ). Модификация посредством ПЭГ (ПЭГилирование) может приводить к одному или более чем одному из следующего: увеличенное время циркуляции, улучшенная растворимость, улучшенная устойчивость к протеолизу, пониженная антигенность и иммуногенность, улучшенная биодоступность, пониженная токсичность, улучшенная стабильность и более легкое приготовление (относительно обзора, см. Francis et al., *International Journal of Nematology* 68:1-18, 1998).

С части антител можно модифицировать для увеличения периода полувыведения в системе кровообращения при введении пациенту. Модификации можно определять с использованием традиционных в данной области способов, таких как, например, описанные в патенте США № 7217798, которые включены сюда посредством ссылки во всей их полноте.

Также известны другие способы улучшения периода полувыведения слитых белков на основе антител в системе кровообращения, такие как, например, описанные в патентах США № 7091321 и 6737056, каждый из которых включен сюда посредством ссылки. Кроме того, антитела можно получать или экспрессировать так, чтобы они не содержали фукозу на их сложных N-гликозид-связанных сахарных цепях. Известно, что удаление фукозы из сложных N-гликозид-связанных сахарных цепей увеличивает эффекторные функции антител и антигенсвязывающих фрагментов, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), но не ограничиваясь ими. Аналогично, антитела, которые могут связываться с CD105, можно присоединять их С-концом ко всей тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части, происходящим из любого изотипа антитела, например, IgG, IgA, IgE, IgD и IgM, и любого из подклассов изотипа, в частности IgG1, IgG2b, IgG2a, IgG3 и IgG4.

Кроме того, описанные здесь антитела также можно модифицировать так, чтобы они могли проходить через гематоэнцефалический барьер. Такая модификация описанных здесь антител обеспечивает лечение заболеваний мозга, таких как мультиформная глиобластома (GBM). Типичные модификации, позволяющие белкам, таким как антитела, проходить через гематоэнцефалический барьер, описаны в публикации патента США 20070082380, которая тем самым включена сюда посредством ссылки во всей ее полноте.

Было показано, что гликозилирование иммуноглобулинов имеет значительные эффекты на их эффекторные функции, структурную стабильность и скорость секреции из клеток, продуцирующих антитела (Leatherbarrow et al., *Mol. Immunol.* 22:407 (1985)). Углеводные группы, ответственные за данные свойства, обычно присоединены к константным (C) областям антител. Например, гликозилирование IgG по аспарагину 297 в домене C<sub>H2</sub> требуется для полной способности IgG активировать классический путь комплементзависимого цитолиза (Тао, Morrison, *J. Immunol.* 143:2595 (1989)). Гликозилирование IgM по аспарагину 402 в домене C<sub>H3</sub> необходимо для правильной сборки и цитолитической активности антитела (Muraoka, Shulman, *J. Immunol.* 142:695 (1989)). Удаление сайтов гликозилирования в положениях 162 и 419 доменов C<sub>H1</sub> и C<sub>H3</sub> антитела IgA приводило к внутриклеточной деградации и по меньшей мере 90%-ному ингибированию секреции (Taylor, Wall, *Mol. Cell. Biol.* 8:4197 (1988)). Кроме того, антитела могут быть продуцированы или экспрессированы так, что они не содержат фукозу на их сложных N-гликозид-связанных сахарных цепях. Известно, что удаление фукозы из сложных N-гликозид-связанных сахарных цепей увеличивает эффекторные функции антител и антигенсвязывающих фрагментов, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), но

не ограничиваясь ими. Данные "дефукозилированные" антитела можно получать посредством ряда систем с использованием методик молекулярного клонирования, известных в данной области, включая, без ограничения, трансгенных животных, трансгенные растения или линии клеток, которые были генетически сконструированы так, чтобы они больше не содержали ферменты или биохимические пути, необходимые для включения фукозы в сложные N-гликозид-связанные сахарные цепи (также известные как нокаутированные по фукозилтрансферазе животные, растения или клетки). Неограничивающие примеры клеток, которые могут быть сконструированы так, чтобы они были нокаутированными по фукозилтрансферазе клетками, включают клетки CHO, клетки SP2/0, клетки NS0 и клетки YB2/0.

Также наблюдали гликозилирование иммуноглобулинов в переменной (V) области. Sox и Hood сообщали о том, что примерно 20% человеческих антител гликозилированы в V области (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66:975 (1970)). Предполагают, что гликозилирование V домена возникает в результате случайных появлений сигнала N-связанного гликозилирования Asn-Xaa-Ser/Thr в последовательности V области и, как считается в данной области, не играет роли в функции иммуноглобулина.

Гликозилирование по каркасному остатку переменной домена может изменять взаимодействия связывания антитела с антигеном. Настоящее изобретение включает критерии, посредством которых выбирают ограниченное число аминокислот в каркасе или CDR цепи иммуноглобулина, которые подлежат мутации (например, посредством замены, делеции или присоединения остатков) для того, чтобы увеличивать аффинность антитела.

Аффинность в отношении связывания антигена обычно можно модулировать путем введения одной или более чем одной мутации в каркас области V, типично в смежные области с одной или более чем одной CDR и/или в одну или более чем одну каркасную область. Типично такие мутации включают введение консервативных аминокислотных замен, которые либо разрушают, либо создают последовательности сайта гликозилирования, но, по существу, не влияют на гидрофобные структурные свойства полипептида. Типично избегают мутаций, которые вводят остаток пролина. Гликозилирование антител, кроме того, описано в патенте США № 6350861, который включен сюда посредством ссылки в том, что касается гликозилирования.

Антитела могут быть приготовлены для кратковременной доставки или длительной (долговременной) доставки.

Антитела, которые связываются с CD105, также можно использовать для очистки CD105 и/или для выявления уровней CD105 в образце или у пациента для того, чтобы выявлять или диагностировать заболевание или расстройство, ассоциированное с CD105, как более подробно описано ниже.

Антитела, которые связываются с CD105, полученные с использованием таких способов, можно тестировать на предмет одного или более чем одного из их аффинности связывания, avidности и нейтрализующей способности. Полезные антитела можно использовать для введения пациенту для предупреждения, ингибирования, управления или лечения состояния, заболевания или расстройства, ассоциированного с ангиогенезом.

Антитела можно оценивать на предмет одного или более чем одного из аффинности связывания, скоростей ассоциации, скоростей диссоциации и avidности. В одном аспекте антитела можно оценивать на предмет их способности нейтрализовать активность CD105 или VEGF. Измерение аффинности связывания, скоростей ассоциации, скоростей диссоциации и avidности можно осуществлять с использованием известных в данной области анализов, включающих, без ограничения, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализ Скэтчарда, анализ BIACORE (поверхностный плазмонный резонанс) и т.д., а также других анализов, обычно используемых и известных обычным специалистам в данной области.

Измерение связывания антител с CD105 и/или способности антител, например, ингибировать ангиогенез можно проводить с использованием, например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), анализа конкурентного связывания, анализа ELISPOT (метод иммуноферментных пятен) или любого другого полезного анализа, известного в данной области. Данные анализы широко используются и хорошо известны обычным специалистам в данной области.

В одном неограничивающем воплощении анализ ELISA можно использовать для измерения способности к связыванию специфических антител, которые связываются с CD105.

Анализы, такие как ELISA, также можно использовать для идентификации антител, которые демонстрируют повышенную специфичность в отношении CD105 по сравнению с другими антителами. Анализы, такие как ELISA, также можно использовать для идентификации антител, которые связываются с эпитопами, находящимися на одном или более чем одном полипептиде или на одном или более чем одном типе CD105 или VEGF. Анализ специфичности можно проводить путем проведения параллельных ELISA, в которых тестируемое антитело подвергается скринингу одновременно в отдельных камерах для анализа на способность связываться с одним или более чем одним эпитопом на разных вариантах полипептида, содержащих эпитопы CD105, для идентификации антител, которые связываются с CD105. Другой методикой измерения кажущейся аффинности связывания, известной специалистам в данной области, является методика поверхностного плазмонного резонанса (анализируемого на системе BIACORE 2000) (Liljebblad et al., Glyco. J. 2000, 17:323-329). Стандартные измерения и традиционные анализы свя-

звания описаны Heeley R.P., *Endocr. Res.* 2002, 28:217-229.

Антитела, которые специфично связываются с CD105, также можно анализировать на предмет их способности лечить различные заболевания и состояния, связанные с ангиогенезом, в связи с различными формами рака (например, первичные опухоли, повторные опухоли и метастазы). Для отслеживания таких эффектов можно использовать любой подходящий анализ, известный специалисту в данной области. Здесь описано несколько таких методик. В одном примере описанные здесь антитела анализируют на предмет их способности связываться с CD105. В другом примере определяют константы аффинности для описанных здесь антител посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В еще одном примере описанные здесь антитела анализируют на предмет их эффекта на ингибирование ангиогенеза.

#### Композиции.

Предложенные здесь композиции, помимо активного ингредиента (антител против CD105), могут включать фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор, поверхностно-активное вещество или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны мешать эффективности активного(ых) ингредиента(ов). Точная природа носителя или другого вещества будет зависеть от пути введения.

Здесь предложены новые композиции антител против CD105, предварительно заполненные шприцы, содержащие данные композиции, и применение таких композиций, полезных для лечения расстройств, связанных с ангиогенезом. Согласно настоящей заявке предложены композиции, которые можно использовать для внутривенного или внутриглазного введения, например, для лечения раковых заболеваний, ассоциированных с CD105, и офтальмологических состояний. Связывание, аффинность, avidность и активность антитела с описанным здесь CD105 можно оценивать с использованием известных в данной области способов, включающих анализы, описанные выше и ниже в примерах, но не ограничиваясь ими.

В одном аспекте здесь предложена композиция, содержащая от примерно 1 до примерно 100 мг/мл антитела против CD105, вплоть до примерно 100 mM забуферивающего агента, вплоть до примерно 1M полиола и имеющая pH от примерно 4,0 до примерно 5,5.

В одном аспекте данная композиция является стабильной после получения, что можно тестировать согласно традиционным способам. Безопасное обращение и введение композиций, содержащих белки, представляют собой значительные задачи для изготовителей фармацевтических композиций. Белки обладают уникальными химическими и физическими свойствами, которые представляют проблемы стабильности: для белков существует ряд путей деградации, в которые вовлечены как химическая, так и физическая нестабильность. Химическая нестабильность включает дезаминирование, агрегацию, обрезание пептидного остова и окисление остатков метионина. Физическая нестабильность включает многие феномены, включающие, например, агрегацию.

"Стабильная" композиция представляет собой композицию, в которой находящийся в ней белок, по существу, сохраняет его физическую стабильность и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. В данной области доступны разные аналитические методики для измерения стабильности белка, и их обзор дается, например, в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерять при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Предпочтительно, композиция является стабильной при комнатной температуре (примерно 30°C) или при 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца и/или стабильной при примерно 2-8°C в течение по меньшей мере 1 года или по меньшей мере 2 лет. Кроме того, композиция может быть стабильной после замораживания (например, до -80°C) и оттаивания данной композиции.

Белок "сохраняет его физическую стабильность" в фармацевтической композиции, если он не демонстрирует признаков агрегации, выпадения в осадок и/или денатурации при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности, или при измерении светорассеяния в УФ (ультрафиолетовая область спектра) или посредством гель-хроматографии (SEC). Способы определения таких измерений известны в данной области и более подробно описаны ниже.

Белок "сохраняет его химическую стабильность" в композиции, если химическая стабильность в данное время является такой, что считается, что белок все еще сохраняет его биологическую активность, как определено ниже. Химическую стабильность можно оценивать путем выявления и количественного определения измененных форм белка. Химическое изменение может включать модификацию размера (например, усечение), которую можно оценивать с использованием, например, гель-хроматографии, SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и/или времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией методом лазерной десорбции из матрицы (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения включают изменение заряда (например, происходящее в результате дезамидирования), которое можно оценивать, например, ионообменной хроматографией или капиллярным электрофорезом-изоэлектрическим фокусированием (cIEF).

Антитело "сохраняет его биологическую активность" в композиции, если биологическая активность данного антитела в данное время находится, например, в пределах примерно 50-150% (в пределах ошибки анализа) от биологической активности, демонстрируемой во время, когда была получена данная

композиция, при определении, например, в анализе связывания антигена. Другие анализы "биологической активности" антител разработаны ниже.

В том что касается стабильности композиции во времени, по меньшей мере 95% антитела против CD105 может присутствовать в виде мономера после хранения при примерно 2-8°C в течение по меньшей мере примерно 12 месяцев при измерении геле-хроматографией (SEC). Здесь также рассматриваются другие известные в данной области способы оценки стабильности, включающие способы, описанные в примерах, но не ограничивающиеся ими.

Кроме того, антитело против CD105 может демонстрировать примерно 50-150% связывания, определенного анализом связывания CD105 посредством ELISA, после хранения при примерно 2-8°C в течение по меньшей мере примерно 12 месяцев.

Средняя изоэлектрическая точка (pI) антитела против CD105 может составлять от примерно 8,8 до примерно 9,2 после хранения при 2-8°C в течение по меньшей мере примерно 12 месяцев при измерении, например, капиллярным электрофорезом-изоэлектрическим фокусированием.

Было бы понятно, что антитело против CD105 может быть стабильным в течение по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно 18 месяцев, по меньшей мере примерно 24 месяцев, по меньшей мере примерно 30 месяцев, по меньшей мере примерно 36 месяцев или более.

Композиция может содержать по меньшей мере 95% антитела против CD105, присутствующего в виде мономера, при измерении посредством SEC после циклов замораживания и оттаивания композиции. В качестве альтернативы или кроме того, композиция может содержать по меньшей мере 95% антитела против CD105, присутствующего в виде мономера, при измерении посредством SEC при воздействии стресса в виде встряхивания.

Антитело против CD105 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать любую последовательность тех CDR, которые способны связываться с CD105. В одном неограничивающем воплощении антитело против CD105 представляет собой TRC105, которое содержит переменную область легкой цепи (VL), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, константную область легкой цепи (CL), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 3, и константную область (Fc), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4.

В другом неограничивающем воплощении антитело против CD105 содержит CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 5, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 6, CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 7, CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 8, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 9 и CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 10.

Композиция может содержать от примерно 1 до примерно 100 мг/мл антитела против CD105, или любое значение между ними, включающее, без ограничения, примерно 2 мг/мл, примерно 5 мг/мл, примерно 7,5 мг/мл, примерно 10 мг/мл, примерно 20 мг/мл, примерно 25 мг/мл, примерно 30 мг/мл, примерно 35 мг/мл, примерно 40 мг/мл, примерно 45 мг/мл, примерно 50 мг/мл, примерно 55 мг/мл, примерно 60 мг/мл, примерно 65 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 75 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 85 мг/мл, примерно 90 мг/мл, примерно 95 мг/мл, примерно 100 мг/мл или любое целое число между ними. Термин "примерно" в том виде, как он здесь используется, относительно концентраций антител означает плюс/минус 2% от указанного значения.

В одном воплощении композиция содержит примерно 25 мг/мл антитела против CD105. В другом воплощении композиция содержит примерно 50 мг/мл антитела против CD105. В еще одном воплощении композиция содержит примерно 100 мг/мл антитела против CD105.

Композиции, как здесь описано, могут содержать буферизующий агент, такой как, например, гистидин, ацетат, цитрат или фосфат. Буферизующие агенты могут быть включены в количестве от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ. В одном воплощении композиция содержит примерно 5 мМ, примерно 7,5 мМ, примерно 10 мМ, примерно 12,5 мМ, примерно 15 мМ, примерно 17,5 мМ, 20 мМ, примерно 22,5 мМ, примерно 25 мМ, примерно 30 мМ, примерно 35 мМ, примерно 40 мМ, примерно 45 мМ, примерно 50 мМ, примерно 55 мМ, примерно 60 мМ, примерно 65 мМ, примерно 70 мМ, примерно 75 мМ, примерно 80 мМ, примерно 85 мМ, примерно 90 мМ, примерно 95 мМ, примерно 100 мМ гистидин, ацетат, цитрат или фосфат, или любое целое число между ними. Термин "примерно" в том виде, как он здесь используется, относительно концентраций буфера означает плюс/минус 2% от указанного значения.

Композиции можно готовить для любого типа введения, известного для антител, включающего интравитреальное и внутривенное введение, но не ограничивающегося ими.

Предложенные здесь композиции могут дополнительно включать приемлемый носитель или эксципиент, включая любой носитель или эксципиент, который представляет собой фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, и который приемлем для введения пациенту.

В одном воплощении предложенная здесь композиция является изотоничной. Типичные изотонич-

ные композиции включают композиции, которые являются от примерно 250 до примерно 350 миллиосмолярными, но не ограничиваются ими. В другом воплощении предложенная здесь композиция является гипертоничной. Типичные гипертоничные композиции включают композиции, которые являются от примерно 351 до примерно 1000 миллиосмолярными, но не ограничиваются ими.

В описанную здесь композицию могут быть добавлены полиолы в количестве вплоть до примерно 1 М. Например, данная композиция может содержать полиол в количестве примерно 50 мМ, примерно 75 мМ, примерно 100 мМ, примерно 150 мМ, примерно 200 мМ, примерно 225 мМ, примерно 240 мМ, примерно 250 мМ, примерно 300 мМ, примерно 350 мМ, примерно 400 мМ, примерно 450 мМ, примерно 500 мМ, примерно 550 мМ, примерно 600 мМ, примерно 650 мМ, примерно 700 мМ, примерно 750 мМ, примерно 800 мМ, примерно 850 мМ, примерно 900 мМ, примерно 950 мМ, примерно 1 М или любое целое число между ними. В одном воплощении предложенная здесь композиция содержит полиол в количестве, меньшем чем 300 мМ, и данную композицию делают изотоничной солью в концентрации от примерно 100 мМ до примерно 175 мМ. Например, композицию, содержащую полиол в количестве, меньшем чем 300 мМ, делают изотоничной солью в концентрации примерно 130 мМ. Термин "примерно" в том виде, как он здесь используется, относительно концентраций полиола означает плюс/минус 2% от указанного значения. В одном аспекте полиол, подлежащий применению в описанных здесь композициях, может представлять собой сахар, такой как, например, невосстанавливающий сахар. Типичные примеры невосстанавливающих сахаров включают трегалозу и сахарозу, но не ограничиваются ими. Например, композиция может содержать от примерно 200 до примерно 300 мМ трегалозы или сахарозы. В одном воплощении композиция может содержать примерно 240 мМ трегалозу или сахарозу. В качестве альтернативы сахар может представлять собой сорбит в количестве (концентрации) от примерно 200 до примерно 300 мМ. В одном воплощении композиция может содержать примерно 240 мМ сорбит.

Другими неограничивающими примерами предложенной здесь композиции является любая из композиций 1-39 в табл. 1.

Таблица 1

№ композиции	pH	фос (мМ)	His (мМ)	цитрат (мМ)	ацетат (мМ)	NaCl (мМ)	трегалола (мМ)	сорбит	Белок мг/мл
F01	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F02	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F03	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F04	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F05	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F06	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F07	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F08	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F09	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F10	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F11	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F12	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F13	6	0	10	0	0	0	240	0	25
F14	6	10	0	0	0	80	120	0	25
F15	6	0	10	0	0	80	120	0	25
F16	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F17	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F18	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F19	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F20	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F21	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F22	4	0	0	0	20	130	0	0	25

F23	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F24	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F25	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F26	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F27	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F28	6	0	10	0	0	0	240	0	50
F29	6	10	0	0	0	80	120	0	50
F30	6	0	10	0	0	80	120	0	50
F31	7	17	0	0	0	145	0	0	5
F32	7	17	0	0	0	145	0	0	7
F33	5,5	0	20	0	0	0	240	0	25
F34	5,5	0	20	0	0	0	0	240	25
F35	4	0	0	0	20	0	0	240	25
F36	5,5	0	20	0	0	0	240	0	50
F37	4	0	0	0	20	0	240	0	50
F38	5,5	0	20	0	0	0	240	0	100
F39	4	0	0	0	20	0	240	0	100

Фос: забуференный фосфатом физиологический раствор;

His: гистидин.

Предложенная здесь композиция может иметь pH от примерно 4,0 до примерно 5,5. В одном воплощении предложенная здесь композиция может иметь pH примерно 4,5, примерно 5,0, примерно 5,5. Термин "примерно" при использовании здесь относительно pH относится к pH плюс/минус 0,05, 0,1 или 0,2.

Было бы понятно, что композиции, содержащие антитело, идентифицированное описанными здесь способами, можно готовить для хранения путем смешивания белка, имеющего желаемую степень чистоты, с возможными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами и/или стабилизаторами в форме вводимых растворов (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)).

Приемлемые носители являются физиологически приемлемыми для пациента, которому осуществляется введение, и сохраняют терапевтические свойства соединений, с которыми они вводятся/которые в них вводятся. Приемлемые носители и их композиции, в общем, описаны, например, в Remington' pharmaceutical Sciences (18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990). Одним типичным носителем является физиологический раствор. Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" в том виде, как она здесь используется, означает приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент и/или растворитель, участвующий в переносе или транспортировке у субъекта соединений от места введения в одном органе или части организма до другого органа или части организма. Каждый носитель является приемлемым в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не вредит субъекту, которому он вводится. Приемлемый носитель не должен изменять удельную активность рассматриваемых соединений.

В одном аспекте здесь предложены фармацевтически приемлемые или физиологически приемлемые композиции, включающие растворители (водные или неводные), растворы, эмульсии, диспергирующие среды, покрытия, изотоничные и стимулирующие или задерживающие поглощение агенты, совместимые с введением. Композиции, следовательно, относятся к подходящей композиции для терапевтического и/или диагностического применения у субъекта. Композиции включают определенное количество описанного здесь соединения и фармацевтически или физиологически приемлемого носителя.

Композиции можно готовить так, чтобы они были совместимыми с конкретным путем введения (т.е. системным или локальным). Таким образом, композиции включают носители, разбавители или эксципиенты, подходящие для ведения разными путями.

Композиции можно вводить, например, путем инъекции, включая подкожную, интравитреальную, внутрикожную, внутривенную, внутриартериальную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию, но не ограничиваясь ими. В композицию можно включать изотоничные агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия. Образующиеся растворы могут быть упакованы для применения в том виде, в котором они находятся, или лиофилизированы; лиофилизированный препарат можно позднее объединять со стерильным раствором перед введением. Для внутривенной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент может находиться в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который является апиrogenным и имеет подходящие pH, изотоничность и стабильность. Специалисты с надлежащей квалификацией в данной области могут хорошо готовить подходящие растворы с использованием, например, изотоничных носителей, таких как

раствор хлорида натрия для инъекции, раствор Рингера для инъекции, раствор Рингера с лактатом для инъекции. При необходимости, можно включать консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Стерильные инъекционные растворы можно получать включением активного ингредиента в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией перечисленных выше ингредиентов, по мере необходимости, с последующей стерилизацией на фильтре.

В одном воплощении описанная здесь композиция не включает поверхностно-активные вещества. В другом воплощении описанная здесь композиция возможно включает поверхностно-активное вещество, такое как, например, полисорбат 20 или 80, TWEEN®, PLURONIC® F68 или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

При рассмотрении композиций для применения в лекарственных средствах или любом из предложенных здесь способов рассматривается то, что композиция может, по существу, не содержать пирогенов, так что данная композиция при введении пациенту, являющемуся человеком, не будет вызывать воспалительную реакцию или небезопасную аллергическую реакцию. Тестирование композиций на предмет пирогенов и получение композиций, по существу, не содержащих пирогены, хорошо понятно обычному специалисту в данной области и может осуществляться с использованием имеющихся в продаже пакетов.

Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулам и композициям, которые, при введении субъекту, являются физиологически переносимыми и типично не дают аллергическую или аналогичную нежелательную реакцию, такую как расстройство желудка, головокружение и тому подобное.

Термин "единичная доза", при использовании относительно терапевтической композиции, относится к физически отличным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, причем каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное так, чтобы давать желаемый терапевтический эффект, в ассоциации с необходимым разбавителем, т.е. носителем или наполнителем.

Композиции можно вводить способом, совместимым с дозируемой композицией, и в терапевтически эффективном количестве. Подлежащее введению количество зависит от субъекта, подлежащего лечению, способности иммунной системы субъекта использовать активный ингредиент и желаемого уровня связывающей способности. Точные количества активного ингредиента, которые требуется вводить, зависят от решения лечащего врача и являются особенными для каждого индивида. Подходящие схемы для первоначального введения и бустер-инъекций также варьируют, но являются типичными для первоначального введения с последующими повторными дозами с интервалом один или более чем один час, с последующей инъекцией или другим введением. В качестве альтернативы, рассматриваются непрерывные внутривенные инфузии, достаточные для поддержания концентраций в крови.

В одном воплощении рассматривается применение описанных здесь композиций для получения лекарственного средства для лечения описанного здесь состояния, заболевания или расстройства. Лекарственные средства можно готовить на основе физических характеристик пациента/субъекта, нуждающегося в лечении, и их можно готовить в одной или многих композициях на основе стадии состояния, заболевания или расстройства. Лекарственные средства могут быть упакованы в подходящие упаковки с подходящими этикетками для распространения в больницы и клиники, где этикетка предназначена для указания способа лечения субъекта, имеющего описанное здесь заболевание. Лекарственные средства могут быть упакованы в виде одиночных или многих единиц. Вместе с упаковками, как описано ниже, можно включать инструкции для дозировки и введения композиций.

Здесь также предложены предварительно заполненные шприцы для внутривенного или интравитреального введения, содержащие описанную здесь композицию. Такие предварительно заполненные шприцы можно упаковывать и прикреплять к ним этикетку, указывающую их применение для лечения состояния, связанного с ангиогенезом, такого как любое из описанных здесь состояний. Упаковки могут дополнительно включать указания по хранению и введению. Здесь предложена упаковка, содержащая один или более чем один предварительно заполненный шприц, подходящий для внутривенного или интравитреального введения, содержащий композицию по любому из предшествующих пунктов. Здесь также предложен препарат лекарственного средства, содержащий описанную здесь композицию, для лечения состояния, связанного с ангиогенезом, такого как любое из описанных здесь состояний.

#### Способы лечения.

Здесь предложен способ лечения субъекта (человека или не являющегося человеком) путем введения субъекту композиции антитела, которое предпочтительно связывается с CD105. Здесь предложены способы предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания или расстройства, ассоциированного с ангиогенезом/неоваскуляризацией, избыточной васкуляризацией, ростом опухоли, пролиферацией опухолевых клеток или расширением маленьких сосудов, включающие введение композиции, содержащей антитело против CD105, посредством этого предупреждая, осуществляя лечение, уменьшая интенсивность или облегчая заболевание или его тяжесть.

Эффективный ответ по настоящему изобретению достигается, когда субъект испытывает стаз либо частичное или полное облегчение, или уменьшение признаков или симптомов заболевания, и он конкретно включает, без ограничения, продление выживания. Ожидаемое время выживания без прогресси-

рования заболевания может измеряться месяцами-годами, в зависимости от прогностических факторов, включающих число рецидивов, стадию заболевания и другие факторы. Продление выживания включает, без ограничения, время, составляющее по меньшей мере 1 месяц (мес.), по меньшей мере примерно 2 мес., по меньшей мере примерно 3 мес., по меньшей мере примерно 4 мес., по меньшей мере примерно 6 мес., по меньшей мере примерно 1 год (г.), по меньшей мере примерно 2 года, по меньшей мере примерно 3 года, по меньшей мере примерно 4 года, по меньшей мере примерно 5 лет и т.д. или любой интервал между ними. Общая выживаемость или выживание без прогрессирования заболевания также могут измеряться месяцами-годами. В качестве альтернативы, эффективным ответом может быть то, что признаки или симптомы субъекта или тяжесть ракового заболевания остаются статичными и не ухудшаются. Дальнейшие указания к лечению показаний описаны более подробно ниже.

Описанные здесь композиции антител можно использовать в качестве нетерапевтических агентов (например, в качестве агентов для аффинной очистки). В общем, в одном таком воплощении интересующий белок иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола Sephadex® или фильтровальная бумага, используя традиционные способы, известные в данной области. Иммобилизованный белок приводят в контакт с образцом, содержащим интересующую мишень (или ее фрагмент), подлежащую очистке, и затем подложку промывают подходящим растворителем, который будет удалять, по существу, все вещество в образце, за исключением белка-мишени, который связывается с иммобилизованным антителом. Наконец, подложку промывают другим подходящим растворителем, таким как глициновый буфер, pH 5,0, который будет высвобождать белок-мишень. Помимо очистки, композиции можно использовать для выявления, диагностики и терапии заболеваний и расстройств, ассоциированных с CD105.

"Приведение в контакт" определяется здесь как способ приведения предложенной здесь композиции в физическую близость с клеткой, органом, тканью или жидкостью, как здесь описано. Приведение в контакт охватывает системное или местное введение любой из предложенных здесь композиций и включает, без ограничения, процедуры и способы *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo*. "Объединение" и "приведение в контакт" используются здесь взаимозаменяемо, и подразумевается, что они определяются одинаково. Для приложений *in vivo* приведение в контакт может происходить, например, посредством введения композиции пациенту посредством любого подходящего способа; композиции с фармацевтически приемлемыми эксципиентами и носителями были более подробно описаны выше.

Термин "предупреждение" в том виде, как он здесь используется, относится к профилактике, предупреждению появления признаков или симптомов, предупреждению прогрессирования заболевания или расстройства, ассоциированного с ангиогенезом или коррелирующего с активностью CD105. В одном неограничивающем воплощении диагностированному с раковым заболеванием стадии 1 можно вводить описанную здесь композицию, предупреждая, посредством этого, прогрессирование рака до стадии 2. В еще одном воплощении пациенту, который является асимптоматическим, но дает положительную реакцию на один или более чем один биомаркер рака, можно вводить описанную здесь композицию, предупреждая посредством этого прогрессирование рака. Термины "ингибирование", "лечение" и "проведение лечения" в том виде, как они здесь используются, используются взаимозаменяемо и относятся, например, к стазу признаков или симптомов, пролонгированию выживания, частичному или полному облегчению признаков или симптомов и частичному или полному уничтожению опухоли или метастазов.

"Субъект" или "пациент" (например, млекопитающее, такое как человек или животное, не являющееся человеком, такое как примат, грызун, корова, лошадь, свинья, овца, верблюд, лама и т.д.) может представлять собой млекопитающее, которое демонстрирует одно или более чем одно клиническое проявление и/или признак или симптом описанного здесь заболевания или расстройства. В определенных ситуациях субъект может быть асимптоматическим и все же иметь клинические проявления заболевания или расстройства. Антитело может быть конъюгировано с терапевтической группировкой или представлять собой слитый белок, содержащий терапевтическую группировку. Антитело может быть конъюгировано с выявляемой группировкой или представлять собой слитый белок, содержащий выявляемую группировку. В одном воплощении антитело может быть конъюгировано как с терапевтической группировкой, так и с выявляемой группировкой. Антитело может быть конъюгировано с аффинной меткой (например, меткой для очистки) или рекомбинантно модифицировано с включением аффинной метки (например, метки для очистки). Аффинные метки являются традиционными в данной области.

Предложенные здесь антитела являются такими, что они могут быть конъюгированы или связаны с терапевтической группировкой и/или группировкой для визуализации, или выявляемой группировкой, и/или аффинной меткой. Способы конъюгирования или связывания полипептидов хорошо известны в данной области. Ассоциации (связывание) между соединениями и метками включают любые способы, известные в данной области, включающие ковалентные и нековалентные взаимодействия, химическое конъюгирование, а также рекомбинантные методики, но не ограничивающиеся ими.

Термин "ангиогенез" используется здесь для включения всех аспектов поддержания и развития кровеносных сосудов. Таким образом, ангиогенез включает образование новых капиллярных кровеносных сосудов (независимо от того, *de novo* или из предсуществующих сосудов), приводящее к неоваскуляризации, а также к поддержанию и контролю существующей сосудистой сети и маленьких кровеносных сосудов. Ангиогенез представляет собой сложный процесс, который включает серию последовательных

этапов, включающих деградацию базальной мембраны сосуда и межклеточного матрикса, опосредованную эндотелиальными клетками, миграцию эндотелиальных клеток, пролиферацию эндотелиальных клеток и образование капиллярных петель эндотелиальными клетками. Ангиогенез включает рост и/или развитие новых кровеносных сосудов (также именуемое неоваскуляризацией), расширение маленьких сосудов, избыточный или пролонгированный рост сосудов и поддержание существующей сосудистой сети.

Термин "заболевание, связанное с ангиогенезом", используется здесь для обозначения определенных патологических процессов у человека, когда ангиогенез является ненормально пролонгированным. Он, кроме того, включает связанные с ангиогенезом состояния и заболевания, такие как те заболевания и состояния, которые относятся к ангиогенезу, вызваны или ассоциированы с ангиогенезом. Неограничивающие примеры таких заболеваний включают различные формы раковых заболеваний и метастазов, дегенерацию желтого пятна и CNV (хороидальная неоваскуляризация). Описанные здесь антитела можно использовать для лечения заболевания, ассоциированного с ангиогенезом, путем связывания с CD105 и ингибирования ангиогенеза.

Термин "антиангиогенная терапия" используется здесь для обозначения терапии, направленной на клетки и/или сосудистую сеть, экспрессирующие CD105 (экспрессируется на высоком уровне на пролиферирующей сосудистой сети по сравнению с сосудистой сетью в состоянии покоя); он, кроме того, включает терапию, которая направлена против ангиогенеза (т.е. формирования новых капиллярных кровеносных сосудов, приводящего к неоваскуляризации), терапию, которая направлена против существующей сосудистой сети и/или избыточной васкуляризации или роста кровеносных сосудов, терапию, направленную на расширение маленьких сосудов, и терапию, направленную на заболевание или состояние (например, терапия, направленная на сосуды). Типичные заболевания или состояния, рассматриваемые в пределах данного изобретения, включают разные формы рака и метастазов, но не ограничиваются ими.

Здесь предложен способ лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, у пациента (субъекта), нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту описанной здесь композиции. Такие композиции можно вводить пациенту интравитреально или внутривенно.

Описанное здесь заболевание, связанное с ангиогенезом, может представлять собой, например, рак или метастаз. В одном воплощении рак представляет собой солидную опухоль. Раковые заболевания, подлежащие лечению, включают, например, опухоль на основе эпителия. Неограничивающие примеры раковых заболеваний, подлежащих лечению такими композициями, включают рак легкого, гинекологическое злокачественное образование, меланому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак матки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак почки, рак головы, рак поджелудочной железы, рак печени (печеночно-клеточный рак), рак матки, рак шеи, рак почки (почечно-клеточный рак), саркому, миелому и лимфому, но не ограничиваются ими. Композиции для лечения рака или метастаза могут вводиться пациенту внутривенно.

В качестве альтернативы, описанное здесь заболевание, связанное с ангиогенезом, может представлять собой, например, офтальмологическое состояние. Офтальмологические состояния включают возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию, макулярный отек и/или хороидальную неоваскуляризацию, но не ограничиваются ими. Возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) может представлять собой влажную AMD или сухую AMD. Композиции для лечения офтальмологического состояния можно вводить пациенту интравитреально.

В таких способах композицию можно вводить пациенту один или более чем один раз. Например, композицию можно вводить один раз в сутки, один раз в неделю, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые 5 месяцев или один раз каждые 6 месяцев. Интенсивность схем лечения можно увеличивать или уменьшать, по необходимости, в зависимости от ответа пациента на лечение.

В одном аспекте композицию вводят до тех пор, пока не ослабевает один или более чем один признак или симптом заболевания, связанного с ангиогенезом.

В том, что касается офтальмологических состояний, один или более чем один признак или симптом может включать сужение кровеносных сосудов, ингибирование пролиферации эндотелиальных клеток, ассоциированной с глазным заболеванием, уменьшение признаков или симптомов кровотечения, лечение мутного зрения, обеспечение остановки потери зрения, улучшение зрения и/или предупреждение трансудации из кровеносных сосудов, но не ограничивается ими.

В том что касается раковых заболеваний или метастазов, лечение может приводить к улучшению состояния пациента, и лечение можно оценивать путем определения того, наблюдается ли один или более чем один из следующих факторов: пониженная пролиферация клеток, пониженное число клеток, усиленный апоптоз или пониженное выживание по меньшей мере части клеток, участвующих в клеточном пролиферативном расстройстве.

Лечение может приводить к частичному или полному устранению опухоли или метастазов и/или к продлению выживания пациента.

В одном воплощении один или более чем один признак или симптом уменьшается по тяжести или продолжительности примерно на 2%, примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на

20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 90%, примерно на 95% или примерно на 100% после введения одной или более чем одной дозы данной композиции пациенту.

В другом воплощении один или более чем один признак или симптом уменьшается по тяжести или продолжительности примерно в 2 раза, примерно в 5 раз, примерно в 10 раз, примерно в 15 раз, примерно в 20 раз, примерно в 25 раз, примерно в 30 раз, примерно в 35 раз, примерно в 40 раз, примерно в 45 раз, примерно в 50 раз, примерно в 55 раз, примерно в 60 раз, примерно в 65 раз, примерно в 70 раз, примерно в 75 раз, примерно в 80 раз, примерно в 90 раз, примерно в 95 раз, примерно в 100 раз или более, после введения одной или более чем одной дозы данной композиции пациенту.

Здесь предложен способ лечения офтальмологического состояния у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту описанной здесь композиции, при этом посредством данного лечения уменьшается интенсивность одного или более чем одного признака или симптома указанного офтальмологического состояния. Введение композиции может представлять собой интравитреальное введение.

Здесь также предложен способ предупреждения или лечения рака или метастаза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту описанной здесь композиции, при этом уменьшается интенсивность одного или более чем одного признака или симптома указанного ракового заболевания или метастаза. Введение композиции может представлять собой внутривенное введение.

Термины "повторное проявление", "рецидив" или "рецидивирующий" относятся к возвращению рака или заболевания после клинической оценки исчезновения заболевания. Рецидивом будет считаться диагноз удаленных метастазов или местного повторного проявления.

Термин "поддерживающая терапия" относится к повторному лечению по графику, которое дают для того, чтобы помочь поддерживать эффекты предыдущего лечения. Поддерживающую терапию часто дают для того, чтобы помочь поддерживать рак в состоянии ремиссии или продлить ответ на специфичную терапию, независимо от прогрессирования заболевания.

Термин "выживаемость без прогрессирования заболевания" в онкологии относится к продолжительности времени на протяжении и после лечения, когда рак не прогрессирует. Выживаемость без прогрессирования заболевания включает количество времени, на протяжении которого пациенты испытывают полный ответ или частичный ответ, а также количество времени, на протяжении которого пациенты испытывают стабильное заболевание.

В одном аспекте здесь предложен способ предупреждения или лечения рака или метастаза у субъекта путем введения любой из предложенных здесь композиций пациенту, страдающему от рака или метастаза. Такой пациент может быть симптоматическим или асимптоматическим.

В некоторых случаях введение данной композиции продлевает жизнь пациента, которого лечат, уменьшает объем опухоли, устраняет опухоль, уменьшает пролиферацию клеток, увеличивает апоптоз опухолевых клеток или приводит к комбинации перечисленного.

При необходимости данные способы могут дополнительно включать хирургическое удаление рака и/или введение дополнительного противоракового агента или лечения. Противораковые агенты были предложены здесь в других местах.

В одном аспекте уменьшается интенсивность признаков или симптомов у пациента, страдающего от рака. Уменьшение интенсивности может проявляться, например, как уменьшение боли, уменьшение размера опухоли, устранение опухолей, предупреждение увеличений размера опухоли или прогрессирования заболевания, предупреждение образования метастаза или ингибирование метастатического роста, или как их комбинация.

В одном аспекте введение описанной здесь композиции уменьшает или устраняет необходимость для пациента подвергаться хирургическому вмешательству или лечению одним или более чем одним дополнительным противораковым агентом или способом лечения.

Композиции, содержащие антитело против CD105, можно вводить последовательно или одновременно с композицией, содержащей антитело против VEGF (или его антигенсвязывающий фрагмент). Такие введения включают, без ограничения, введение в пределах примерно 12 недель друг за другом, в пределах примерно 8 недель друг за другом, в пределах примерно 4 недель друг за другом, в пределах примерно 3 недель друг за другом, в пределах примерно 2 недель друг за другом, в пределах примерно недели друг за другом, в пределах суток друг за другом, в пределах примерно 12 ч друг за другом, в пределах примерно 6 ч друг за другом, в пределах примерно 3 ч друг за другом, в пределах примерно 1 ч друг за другом, в пределах примерно 30 мин друг за другом, в те же самые сутки, в то же самое время или их комбинацию. При рассмотрении многих доз композиции по настоящему изобретению и/или комбинированной терапевтической группировки, понятно, что дозы каждой могут быть определены эмпирически с использованием известных доз и концентраций на основе возраста, роста, массы, состояния здоровья и других физических характеристик субъекта, используя стандарты имеющихся в продаже продуктов.

Композиции можно вводить пациенту в терапевтически эффективном количестве, которое является

эффективным для получения некоторого желаемого терапевтического эффекта путем ингибирования заболевания или расстройства при приемлемом отношении польза/риск, приложимом к любому медицинскому лечению. Для введения настоящих композиций пациентам-людям данные композиции можно готовить посредством методологии, известной специалисту в данной области. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, при котором по меньшей мере частично достигается желаемый терапевтический или профилактический эффект в органе или ткани. Количество антитела против CD105 или антитела против VEGF, необходимое для осуществления предупреждения и/или терапевтического лечения заболевания или расстройства, само по себе не является фиксированным. Количество введенного антитела может варьировать в зависимости от типа заболевания, обширности заболевания и размера млекопитающего, страдающего от заболевания или расстройства. В одном воплощении пациенту вводят два описанных здесь антитела, как описано выше. Введение в комбинации может относиться к введению в одной композиции или в отдельных композициях.

Термин "введение" относится здесь к предоставлению одной или более чем одной композиции пациенту таким способом, который приводит к тому, что композиция оказывается внутри организма пациента. Такое введение можно осуществлять любым путем, включающим, без ограничения, местное, региональное или системное, посредством подкожного, интравитреального, внутрикожного, внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного или внутримышечного введения (например, инъекции).

Реальные уровни дозировок активных ингредиентов в композициях могут варьировать так, чтобы получать такое количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без того, чтобы быть токсичными для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от ряда факторов, включающих активность конкретного используемого соединения, путь введения, время введения, скорость выделения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или вещества, используемые в комбинации с конкретной применяемой композицией, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую медицинскую историю пациента, которого лечат, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Кроме того, дозу(ы) антитела можно вводить дважды в неделю, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 6 недель, каждые 8 недель, каждые 12 недель, каждые 24 недели или на протяжении любой комбинации числа недель между ними. Также рассматриваются циклы дозирования, такие как, например, введение антител один или два раза в неделю в течение 2, 3, 4, 5 или 6 недель, с последующими 1, 2, 3, 4, 5 или 6 неделями без терапии. В качестве альтернативы, в зависимости от ответа субъекта на терапию, время между циклами лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. В пределах данного изобретения также рассматриваются дополнительные циклы дозирования, включающие, например, разные комбинации описанных здесь доз и еженедельных циклов.

Лечащий врач или ветеринар может легко определять и прописывать эффективное количество (ED50) требующейся композиции. Например, лечащий врач или ветеринар мог бы начинать с доз соединений, используемых в композиции, имеющих меньшие уровни, чем уровни, требующиеся для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку, пока не будет достигнут желаемый эффект. В качестве альтернативы, доза может оставаться постоянной.

Композиции можно вводить пациенту любым удобным путем, таким как описанные выше. Независимо от выбранного пути введения, соединения по настоящему изобретению, которые можно использовать в подходящей гидратированной форме, и/или композиции готовят в приемлемых лекарственных формах, таких как описанные ниже, или другими традиционными способами, известными специалистам в данной области.

Данные, полученные из анализов культуры клеток и/или исследований на животных можно использовать для приготовления ряда дозировок для применения у человека. Дозировка может варьировать в пределах данного интервала в зависимости от используемой дозировки и применяемого пути введения. Для любого соединения терапевтически эффективную дозу можно исходно оценивать из анализов на культуре клеток. В животных моделях доза может быть приготовлена для достижения интервала концентрации, циркулирующей в плазме, который включает IC<sub>50</sub> (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование), при определении в культуре клеток. Уровни в плазме можно измерять, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией. Такую информацию можно использовать для более точного определения полезных доз у человека. Композиции, содержащие комбинации соединений, также можно оценивать с использованием любого из данных способов.

В одном воплощении согласно изобретению рассматривается ингибирование ангиогенеза в ткани. Уровень ангиогенеза в ткани и, следовательно, степень достигаемого ингибирования можно оценивать рядом способов, таких как описанные здесь.

Уникальная специфичность антител, которые распознают (например, предпочтительно связываются) с CD105 или VEGF и ингибируют ангиогенез, обеспечивает диагностические и терапевтические применения в отношении заболеваний, характеризующихся ангиогенезом (неоваскуляризацией), расширением маленьких сосудов, избыточной васкуляризацией, пролиферацией опухолевых клеток и/или ростом

опухоли. Антитела можно вводить субъекту, страдающему от разных форм рака (первичных опухолей и метастазов).

Было бы понятно, что помимо введения описанных здесь композиций здесь рассматривается то, что субъекта также можно лечить одним или более чем одним дополнительным ингибитором ангиогенеза.

Термин "ингибитор ангиогенеза" в том виде, в котором он здесь используется для задач описания и формулы изобретения, означает соединение или молекулу, включающую, без ограничения, пептиды, белки, ферменты, полисахариды, олигонуклеотиды, ДНК, РНК, реомбинантные векторы и лекарственные средства, которые функционируют, ингибируя ангиогенез. Ингибиторы ангиогенеза известны в данной области, и здесь рассматриваются все их типы. Неограничивающие примеры соединений и молекул включают природные и синтетические биомолекулы, такие как паклитаксел, О-(хлорацетилкарбомил)фумагиллол ("TNP-470" или "AGM 1470"), тромбоспондин-1, тромбоспондин-2, ангиостатин, происходящий из хондроцитов человека ингибитор ангиогенеза ("hCHIAMP"), ангиогенный ингибитор, происходящий из хряща, фактор тромбоцитов-4, гро-бета, человеческий интерферон-индуцибельный белок 10 ("IP10"), интерлейкин 12, Ro 318220, трициклодекан-9-ил-ксантат ("D609"), ирсогладин, 8,9-дигидрокси-7-метил-бензо[b]хинолизиния бромид ("GPA 1734"), медроксипрогестерон, комбинация гепарина и кортизона, ингибиторы глюкозидазы, генистеин, талидомид, диаминоантрахинон, гербимицин, урсоловая кислота и олеаноловая кислота. Неограничивающие примеры антител включают антитела, направленные против таких молекул, как VEGF, рецептор VEGF или разные эпитопы CD105. Кроме того, известны и рассматриваются здесь низкомолекулярные ингибиторы рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают ранибизумаб, афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб, пегаптаниб и пазопаниб.

С описанными здесь композициями можно вводить многочисленные комбинации данных ингибиторов рецептора VEGF. В одном воплощении комбинации могут приводить к применению меньших доз описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов. Такие изменения дозировки могут возникать в результате синергических эффектов комбинаций антител.

Рак.

CD105 ассоциирован с ангиогенезом опухолей и подвергается сильной повышающей регуляции в эндотелии различных опухолевых тканей по сравнению с регуляцией в нормальных тканях. CD105 подвергается повышающей регуляции в широком спектре эндотелиев опухолей. Кроме того, происходит более сильная экспрессия CD105 в эндотелии опухоли, чем в соответствующей нормальной ткани. Таким образом, ингибирование ангиогенеза антителами против CD105 представляет собой возможность лечения раковых опухолей. Описанные здесь композиции можно использовать для лечения раковых опухолей и метастазов. Данные композиции также можно использовать в композициях лекарственных средств для лечения раковых опухолей и метастазов.

VEGF представляет собой одну мишень для противоопухолевой терапии, так как его экспрессия подвергается повышающей регуляции в целом ряде солидных опухолей. VEGF представляет собой важный регулятор ангиогенеза - роста новых сосудов из существующих сосудов. Данный процесс играет фундаментальную роль для роста солидных опухолей, который основан на образовании новых кровеносных сосудов. Определенные низкомолекулярные терапевтические агенты могут нацеливаться на рецептор фактора роста эндотелия сосудов ("VEGFR"); такое нацеливание низкомолекулярных терапевтических средств может приводить к противораковым эффектам. Агенты, нацеленные на рецептор VEGF, опосредованно блокируют рост опухоли через ингибирование образования новых сосудов. Ингибирование ангиогенеза, индуцированного VEGF, может оказывать противоопухолевый или улучшенный противоопухолевый эффект без значимого ингибирования стимуляции макрофагов, остеокластов или хондрокластов посредством VEGF.

Термин "опухоль" используется здесь для названия раковой ткани, экспрессирующей CD105 и/или VEGF (по сравнению с экспрессией нормальной тканию того же самого типа). Опухоли могут включать солидные опухоли и полусолидные опухоли. Неограничивающие примеры опухолей включают человеческие лейкозы, включая острый лимфобластный лейкоз (ALL) не Т-клеточного типа (не Т), миеломоноцитарный лейкоз и человеческие солидные и полусолидные опухоли с окружающей их сосудистой сетью, экспрессирующие CD105 на уровне от умеренного до высокого (по сравнению с экспрессией нормальной тканию того же самого типа), включая ангиосаркому, карциному молочной железы, рак желудка, хондринскую лимфому, лимфому, мультиформную глиобластому (GBM), карциному легкого, меланому, миелому, лимфому, остеосаркому, карциному яичника, опухоль околоушной железы, карциному глотки, карциному предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, карциному почки и карциному ректосигмоидного отдела.

Раковая ткань, подлежащая лечению, представляет собой, например, эндотелиальную ткань, экспрессирующую ненормальный уровень CD105 и/или VEGF.

В отсутствие неоваскуляризации опухолевой ткани данная опухолевая ткань не получает требующихся питательных веществ, замедляет рост, прекращает дополнительный рост, регрессирует и, в конечном счете, становится некротической, приводя к уничтожению опухоли. Здесь предложены способы ингибирования неоваскуляризации опухоли путем ингибирования ангиогенеза опухоли. Аналогично, здесь

предложены способы ингибирования роста опухоли.

Данные способы также являются особенно эффективными против образования метастазов, так как для их образования требуется васкуляризация первичной опухоли, так что метастатические раковые клетки могут покинуть первичную опухоль, и для того, чтобы они обосновались во вторичном сайте, требуется неоваскуляризация для поддержки роста метастазов.

Будет понятно, что у "субъекта, страдающего от рака/метастаза", по изобретению, может экспрессироваться мутантный белок (ассоциированный с опухолью антиген) или мутантный ген, и он все еще может не быть симптоматическим в отношении заболевания. В одном неограничивающем примере рака толстой кишки (который ассоциирован с мутантным белком K-ras) субъект с мутантным белком K-ras в некоторых клетках толстой кишки представляет собой субъекта, подлежащего лечению, даже несмотря на то что субъект все еще может не быть симптоматическим в отношении рака толстой кишки. "Признаки или симптомы заболевания" представляют собой клинически признанные проявления или признаки заболевания.

Под "лечением" субъекта, страдающего от опухоли или метастаза, подразумевается то, что признаки или симптомы субъекта частично снимаются, полностью снимаются или остаются статичными после лечения. Пациент, которого лечили, может демонстрировать частичное или полное снятие опухолевой нагрузки. Подразумевается, что это охватывает профилактику, терапию и излечение. В одном неограничивающем примере лечат субъекта, страдающего от высокометастатического рака (например, рака молочной железы), при чем дополнительные метастазы либо не появляются, либо уменьшаются в числе по сравнению с субъектом, который не получает лечение. В другом неограничивающем примере субъекта лечат, причем солидный рак субъекта либо уменьшается в размере, либо не увеличивается в размере по сравнению с субъектом, который не получает лечение. В еще одном неограничивающем примере число раковых клеток у субъекта, которого лечат, либо не возрастает, либо уменьшается по сравнению с числом раковых клеток у субъекта, который не получает лечение. Улучшение также можно определять, например, как пониженную пролиферацию клеток, уменьшенное число клеток, усиленный апоптоз и/или улучшенное выживание субъекта, которого лечат.

Лечение может приводить к частичному или полному устранению опухоли или метастазов и/или к продлению выживания пациента.

В одном воплощении тяжесть или продолжительность одного или более чем одного признака или симптома уменьшается примерно на 2%, примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 90%, примерно на 95% или примерно на 100% после введения пациенту одной или более чем одной дозы композиции.

В другом воплощении тяжесть или продолжительность одного или более чем одного признака или симптома уменьшается примерно в 2 раза, примерно в 5 раз, примерно в 10 раз, примерно в 15 раз, примерно в 20 раз, примерно в 25 раз, примерно в 30 раз, примерно в 35 раз, примерно в 40 раз, примерно в 45 раз, примерно в 50 раз, примерно в 55 раз, примерно в 60 раз, примерно в 65 раз, примерно в 70 раз, примерно в 75 раз, примерно в 80 раз, примерно в 90 раз, примерно в 95 раз, примерно в 100 раз или более после введения пациенту одной или более чем одной дозы композиции.

Опухоль или рак, подлежащие лечению в описанных здесь способах, включают рак легкого, гинекологическое злокачественное образование, меланому, рак молочной железы, рак мозга (например мультиформная глиобластома, "GBM" или глиома), рак поджелудочной железы, рак яичника, рак матки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак почки, рак головы, рак печени (печеночно-клеточный рак), рак шеи, рак почки (почечно-клеточный рак), рак пениса, рак желудка, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, саркому, карциному, миелому и лимфому, но не ограничиваются ими. В одном воплощении опухоль, подлежащая лечению, представляет собой солидную или полусолидную опухоль. В другом воплощении опухоль, подлежащая лечению, представляет собой первичную опухоль. В другом воплощении опухоль, подлежащая лечению, представляет собой метастатическую опухоль. В одном воплощении опухоль или рак, подлежащие лечению, имеют эпителиальное происхождение. В другом воплощении рак, подлежащий лечению, представляет собой миелому. В другом воплощении рак, подлежащий лечению, представляет собой рак яичника. В другом воплощении рак, подлежащий лечению, представляет собой рак почки/почечный рак. В еще одном воплощении рак, подлежащий лечению, представляет собой печеночно-клеточный рак/рак печени.

При необходимости соединения можно вводить в комбинации с одним или более чем одним дополнительным терапевтическим лечением, включающим, без ограничения, следующие: адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел, пеметрексед, темозоломид, оксалиплатин, цетуксимаб, панитумумаб, сорафениб, сунитиниб, gefитиниб, эрлотиниб, 5-фторурацил, иринотекан, топотекан, лейковорин, бортезومیб, леналидомид, талидомид, капецитабин, доцетаксел и многие другие описанные здесь традиционные противораковые терапии. Термин "излучение" в том виде, как он здесь используется, относится, например, к микроволнам, ультрафиолетовому (УФ), инфракрасному (ИК) или альфа-, бета-, или гамма-излучению. Излучение может быть "сфокусировано" или доставлено локально с использованием традиционных ме-

тодик для нацеливания излучения на место одной или более чем одной опухоли без облучения всего организма. Было бы понятно, что перечисление перечисленных ниже терапевтических схем представляет традиционные терапии, но настоящее изобретение охватывает другие известные терапевтические схемы, которые здесь конкретно не раскрыты.

В одном воплощении рак представляет собой рак яичника, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, химиотерапию (например, доксорубицин, липосомы с доксорубицином HCl, гемцитабин и химиотерапевтические средства на основе платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), мелфалан, ингибиторы топоизомеразы I, такие как топотекан и иринотекан, терапия на основе таксанов, гормоны, лучевая терапия, гипотермия всего организма, производные изофлавона, цитотоксические макролиды, такие как эритромицин, ингибиторы ангиогенеза, такие как бевацизумаб, ингибиторы трансдукции сигнала, такие как трастузумаб, генотерапия, терапия на основе РНКи (РНК-интерференция), иммунотерапия, моноклональные антитела, ингибиторы фосфатидилинозитол-подобной киназы, такие как рапамицин, или любая их комбинация. Также можно предоставить комбинированную терапию описанными здесь антителами с терапиями против рака яичника для снижения доз любой из двух терапий или обеих благодаря синергическому эффекту в результате совместного введения данных терапий.

В одном воплощении рак представляет собой почечный рак/рак почки, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, химиотерапию, пазопаниб, интерферон-альфа или IL-2 (интерлейкин-2). В еще одном воплощении дополнительный агент представляет собой ингибитор рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают описанные выше ингибиторы, афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб. Также можно предоставить комбинированную терапию описанными здесь антителами с терапиями против рака почки для снижения доз любой из двух терапий или обеих благодаря синергическому эффекту в результате совместного введения данных терапий.

В одном воплощении раковое заболевание представляет собой миелому, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, лучевую терапию, бортезомиб, леналидомид или талидомид. Дозировки для любой из этих терапий известны в данной области и могут быть соответствующим образом скорректированы при комбинированной терапии.

В одном воплощении раковое заболевание представляет собой рак предстательной железы, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, лучевую терапию (например терапию внешним пучком или брахитерапию), гормональную депривацию (подавление андрогена, включая абиратерон), ингибиторы белка теплового шока 90 (HSP90), химиотерапию (например доцетаксел, эстрамустин, химиотерапия на основе платины, как, например, цисплатин, карбоплатин, сатраплатин и оксалиплатин), преднизон или преднизолон, снижающие уровень холестерина лекарственные средства, такие как статины, агонисты релизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH), терапия на основе РНКи, терапии на основе дендритных клеток, целые опухолевые клетки, генетически модифицированные для секреции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (также известные как GVAX) или любую их комбинацию. В еще одном воплощении дополнительный агент представляет собой ингибитор рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб.

В одном воплощении раковое заболевание представляет собой рак легкого, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, лучевую терапию (например торакальную лучевую терапию, лучевую терапию заряженными частицами, химиотерапию на основе урацил-тегафура и платины (например цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин и т.д.) и винорелбин, эрлотиниб, gefитиниб, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например цетуксимаб), низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ, прямые ингибиторы белков, участвующих в пролиферации клеток рака легкого, ингибиторы киназы Auroга, термотерапия, индуцированная лазером, терапия на основе РНКи, целые опухолевые клетки, генетически модифицированные для секреции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (также известные как GVAX) или любую их комбинацию. Дополнительные терапевтические лечения включают паклитаксел или пеметрексед. В еще одном воплощении дополнительный агент представляет собой ингибитор рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб. Дозировки для любой из данных терапий известны в данной области и могут быть соответствующим образом скорректированы при комбинированной терапии.

В одном воплощении рак представляет собой рак молочной железы, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, моноклональные антитела (например антитела против Her-2, герцептин), адьювантную химиотерапию, как, например, химиотерапию с одним агентом или комбинированную химиотерапию (например полихимиотерапии на основе антрацилина и таксана), специфичный в отношении мишени трастузумаб с манипуляцией эндокринной системой или без нее, с PMRT (постмастэктомическая лучевая терапия) или без нее, винорелбин, адриамицин, циклофосфамид, капецитабин, доцетаксел, селективные модуляторы рецептора эстрогена, такие как тамоксифен и ралоксифен, аллостерические модуляторы рецептора эстрогена, такие как трилостан, излу-

чение (например интерстициальная брахитерапия, устройство Mammosite, 3-мерное конформное внешнее излучение и интраоперационная лучевая терапия), ингибиторы ароматазы, которые подавляют общий синтез в организме (например анастрозол, экземестан и летрозол), терапия на основе РНКи, внутривенные аналоги рапамицина, которые являются иммуносупрессивными и антипролиферативными, такие как темсиролимус, или любую их комбинацию. Обзор способов осуществления трехмерного моделирования рака молочной железы на основе культуры ткани *in vitro* описан Kim et al., *Breast Cancer Research Treatment* 85(3): 281-91 (2004). Известны другие модели *in vivo* и *in vitro* для тестирования раковых заболеваний, и их можно использовать для тестирования описанных здесь антител. В еще одном воплощении дополнительный агент представляет собой ингибитор рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб. Дозировки для любой из данных терапий известны в данной области и могут быть соответствующим образом скорректированы при комбинированной терапии.

В одном воплощении раковое заболевание представляет собой рак толстой кишки, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой хирургию, лучевую терапию и химиотерапию (например 5-фторурацил, левамизол, лейковорин или семустин (метил CCNU)), N-[2-(диметиламино)этил]акридин-4-карбоксамида и другие родственные карбоксамидные противораковые лекарственные средства; ингибиторы топоизомеразы, не являющиеся ингибиторами топоизомеразы II, иринотекан, липосомный топотекан, противораковые агенты из класса таксанов (например паклитаксел или доцетаксел), соединение из класса ксантенон-уксусной кислоты (например 5,6-диметилантенон-4-уксусная кислота PMAA), ламинарин, сайт-селективные аналоги циклического АМФ (например, 8-хлораденозин-3',5'-циклический фосфат), пираноиндольные ингибиторы Cox-2 (циклооксигеназа-2), карбазольные ингибиторы Cox-2, тетрагидрокарбазольные ингибиторы Cox-2, инденовые ингибиторы Cox-2, локализованные ингибиторы NSAID (нестероидные противовоспалительные лекарственные средства) (например анраниловые кислоты, аспирин (5-ацетилсалициловая кислота), азодисалицилат натрия, карбогетероциклические кислоты, карпрофен, хлорамбуцил, диклофенак, фенбуфен, фенклофенак, фенопрофен, флуфенамовая кислота, флурбипрофен, флупрофен, фуросемид, ауротиомалат натрия, ибупрофен, индометацин, индопрофен, кетопрофен, лоназолак, локсопрофен, меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, мелфалан, напроксен, пеницилламин, фенилуксусные кислоты, проприононовые кислоты, салициловые кислоты, салазосульфамиридин, сулиндак, толметин, пиразолон, бутазон, пропазон, NSAID, мелоксикам, оксикамы, пироксикам, фелден, пироксикам-бета-циклодекстран, теноксикам, этодолак и оксапрозин), ингибитор HER-2/неу, терапия на основе РНКи, GM-CSF, моноклональные антитела (например антитела против Her-2/неу, антитела против CEA (карциноэмбриональный антиген), A33 (HB 8779), 100-210 (HB 11764) и 100-310 (HB 11028)), цетуксимаб, панитумумаб, гормональная терапия, пиримидинамины, производные камптотецина (например СРТ-11), фолиновая кислота (ФА), гемцитабин, Ага-С, химиотерапевтические средства на основе платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, цГМФ(циклический гуанозинмонофосфат)-специфичный ингибитор фосфодиэстеразы или любую их комбинацию. В одном воплощении дополнительное терапевтическое лечение представляет собой комбинацию 5-фторурацила, лейковорина и оксалиплатина (FOLFOX). В одном воплощении дополнительное терапевтическое лечение представляет собой комбинацию 5-фторурацила, иринотекана и лейковорина (IFL). В одном воплощении дополнительный агент представляет собой цетуксимаб. В одном воплощении дополнительный агент представляет собой панитумумаб. В еще одном воплощении дополнительный агент представляет собой ингибитор рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб. Дозировки для любой из данных терапий известны в данной области и могут быть соответствующим образом скорректированы при комбинированной терапии.

В одном воплощении раковое заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое лечение представляет собой комбинацию терапевтических лечений в виде хирургии, лучевой терапии, 5-фторурацила и лучевой терапии, системной терапии, стентирования, гемцитабина, гемцитабина и лучевой терапии, цетуксимаба, эрлотиниба, химиолучевой терапии или любую их комбинацию. В еще одном воплощении дополнительный агент представляет собой ингибитор рецептора VEGF. Неограничивающие примеры ингибиторов рецептора VEGF включают афлиберцепт, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб.

Пациентов можно оценивать в отношении признаков или симптомов в один или более чем один из множества моментов времени, включая моменты до, во время и после схем лечения. Лечение может приводить к улучшению состояния субъекта и может быть оценено путем определения того, наблюдается ли один или более чем один из следующих факторов: уменьшенный размер опухоли, пониженная пролиферация клеток, пониженное число клеток, ослабленная неоваскуляризация, усиленный апоптоз или пониженное выживание по меньшей мере части клеток, участвующих в клеточном пролиферативном расстройстве. Одно или более чем одно из данных проявлений может, в некоторых случаях, приводить к частичному или полному устранению рака и/или продлению выживания пациента. В качестве альтернативы, для последних стадий раковых заболеваний, лечение может приводить к стазу заболевания, лучшему качеству жизни и/или продлению выживания.

При введении композиций последовательно композицию, описанную здесь, содержащую антитело против CD105, можно, например, вводить до и/или после антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента).

При введении композиций одновременно композицию, содержащую антитело против CD105, можно вводить в тот же самый сайт или в другой сайт, чем композицию, содержащую антитело против VEGF.

В еще одном воплощении здесь предложены композиции (лекарственные средства), содержащие антитело против CD105 и антитело против VEGF (или его антигенсвязывающий фрагмент), способные ингибировать одну или более чем одну биологическую активность CD105 и VEGF соответственно, такую как митогенная активность, пролиферация клеток, рост опухоли, неоваскуляризация или ангиогенная активность.

Было бы понятно, что схемы лечения могут включать одно или более чем одно введение каждой из описанных здесь композиций. Композицию можно вводить в одной дозе или во многих дозах. Введение отдельных композиций может осуществляться тем же самым путем или разными путями.

В одном воплощении композицию вводят каждые 1-3 недели в течение 6-12 циклов или пока опухоль прогрессирует. Данный способ может дополнительно включать стадию введения композиции каждые 1-12 недель в течение вплоть до 2 лет. В другом неограничивающем примере одновременное введение антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента) происходит в неделю 1, с последующим дополнительным введением композиций в неделю 1, 2, 3 или 4, причем одновременное введение повторяют в течение 6-12 циклов или пока опухоль прогрессирует и с последующим введением композиций каждые 1-12 недель в течение вплоть до 2 лет.

В одном неограничивающем примере способа лечения рака у пациента данный способ включает хирургическое удаление рака и введение антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента) в 1-3 недели в течение 12 месяцев или пока опухоль прогрессирует, с последующим одновременным введением антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента) в дозе в 1-12 недель. Кроме того, одновременное введение антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента) можно повторять каждые 1-3 недели в течение вплоть до 6 циклов. Возможно данный способ дополнительно включает введение антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента) каждые одну-двенадцать недель в течение вплоть до двух лет. Будет понятно, что схемы лечения можно объединять с предложенными здесь способами отслеживания для определения того, нужно ли или когда нужно вводить дополнительные дозы антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента).

Комбинированная терапия может давать синергический и/или полезный эффект или может позволить использовать меньшие дозы комбинации для обеспечения большей степени безопасности. Данное изобретение охватывает протоколы лечения, которые улучшают профилактический или терапевтический эффект антитела против CD105 и антитела против VEGF (или его антигенсвязывающего фрагмента) для предупреждения, управления, лечения или удаления рака или других заболеваний.

В одном воплощении субъекту вводят дополнительное терапевтическое лечение, такое как, например, ингибитор ангиогенеза (как здесь описано). Композицию, содержащую такое дополнительное терапевтическое лечение, можно вводить в комбинации (либо последовательно, либо одновременно) с другими описанными здесь композициями.

В одном неограничивающем предложенном здесь способе лечения рака дополнительное терапевтическое лечение включает хирургическое удаление рака, облучение, один или более чем один химиотерапевтический агент или их комбинацию и одновременное введение одной или более чем одной описанной здесь композиции. В одном аспекте введение композиции может представлять собой, например, 20-минутную внутривенную инфузию.

Глазные состояния, включающие ангиогенез.

В одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения диабетической ретинопатии, дегенерации желтого пятна, хориоидальной неоваскуляризации, макулярного отека или неоваскулярной глаукомы у пациента путем введения данному пациенту терапевтически эффективного количества одной или более чем одной предложенной здесь композиции.

Дегенерация желтого пятна (AMD) представляет собой потерю фоторецепторов в части центральной сетчатки, называемой макулой, ответственной за острое зрение. Дегенерация желтого пятна ассоциирована с ненормальным отложением компонентов внеклеточного матрикса и другого дебриса в мембране между пигментным эпителием сетчатки и сосудистой оболочкой глаза. Такой дебрисоподобный материал называют друзы. Друзы наблюдаются при офтальмоскопическом исследовании глаза. Нормальные глаза могут иметь желтые пятна, не содержащие друзы, тем не менее, друзы могут быть многочисленными на периферии сетчатки. Присутствие мягких друз в желтом пятне в отсутствие какой-либо потери зрения, опосредованного желтым пятном, считается ранней стадией AMD. Дегенерация желтого пятна характеризуется хориоидальной неоваскуляризацией (CNV) - развитием ненормальных кровеносных сосудов под слоем пигментного эпителия сетчатки (RPE). Данные сосуды прорываются через мембрану

Бруха, разрывая пигментный эпителий сетчатки, кровоточат и, в конечном счете, вызывают образование рубцов в желтом пятне, приводя к глубокой потере центрального зрения (образование дисковидных рубцов).

Хороидальная неоваскуляризация (CNV) обычно наблюдается при макулярной дегенерации, помимо других глазных расстройств, и ассоциирована с пролиферацией хороидальных эпителиальных клеток, сверхпродукцией внеклеточного матрикса и образованием волокнисто-сосудистой субретинальной мембраны. Проллиферация клеток пигментного эпителия сетчатки и продуцирование ангиогенных факторов, по-видимому, оказывают эффект на хороидальную неоваскуляризацию.

Диабетическая ретинопатия (DR) представляет собой глазное расстройство, характеризующее избыточным ангиогенезом, который развивается при диабете из-за утолщения базальных мембран капилляров и отсутствия контакта между перицитами и эндотелиальными клетками капилляров. Потеря перицитов увеличивает трансудацию из капилляров и приводит к нарушению гематоретинального барьера. Диабетическая ретинопатия является результатом изменений в микрососудах сетчатки. Индуцированные гипергликемией гибель перицитов и утолщение базальной мембраны приводят к функциональной недостаточности стенок сосудов. Эти повреждения изменяют образование гематоретинального барьера и также делают кровеносные сосуды сетчатки более проницаемыми. Маленькие кровеносные сосуды, такие как кровеносные сосуды в глазу, особенно чувствительны к плохому контролю сахара в крови (глюкозы в крови). Избыточное накопление глюкозы и/или фруктозы повреждает очень мелкие кровеносные сосуды в сетчатке. При трансудации жидкости и липидов из поврежденных кровеносных сосудов в желтое пятно также может развиваться макулярный отек. Данные жидкости заставляют желтое пятно набухать, что размывает зрение. Данное повреждение также приводит к недостатку кислорода в сетчатке.

По мере прогрессирования заболевания недостаток кислорода в сетчатке стимулирует ангиогенез во всей сетчатке и в прозрачном гелеподобном стекловидном теле, которое заполняет внутреннюю часть глаза. Без своевременного лечения эти новые кровеносные сосуды могут кровоточат, замутнить зрение и разрушать сетчатку. Сосудисто-волокнистая пролиферация также может вызывать тракционную отслойку сетчатки. Новые кровеносные сосуды также могут врастать в угол передней камеры глаза и вызывать неоваскулярную глаукому.

Проллиферативная витреоретинопатия ассоциирована с клеточной пролиферацией клеточных и фиброзных мембран внутри стекловидных мембран и на поверхностях сетчатки. Проллиферация и миграция клеток пигментного эпителия сетчатки является обычной при данном глазном расстройстве. Мембраны, ассоциированные с пролиферативной витреоретинопатией, содержат компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген типов I, II и IV и фибронектин, и постепенно становятся фиброзными.

Возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) и диабетическая ретинопатия являются двумя ведущими причинами слепоты в развитых странах. Афлиберцепт, ранибизумаб и пегаптаниб улучшили возможности лечения, доступные для пациентов с AMD. Ранибизумаб представляет собой Fab, и афлиберцепт представляет собой слитый белок. Они оба связываются с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и к настоящему времени продемонстрировали наиболее впечатляющие результаты в лечении AMD; однако, лишь меньшинство пациентов, подвергавшихся лечению, испытывают значительное улучшение остроты зрения. Антиангиогенная терапия, сфокусированная на мишени, отличной от VEGF, может преодолевать некоторые ограничения, ассоциированные с агентами, которые направлены действуют на путь VEGF.

Описанные здесь антитела против CD105 можно использовать для лечения или предупреждения дегенерации желтого пятна, CNV, диабетической ретинопатии или пролиферативной витреоретинопатии. Здесь описаны способы лечения или предупреждения дегенерации желтого пятна, CNV, диабетической ретинопатии, макулярного отека или пролиферативной витреоретинопатии посредством введения описанных здесь антител. Описанные здесь антитела против CD105 также могут сужать кровеносные сосуды, ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток, ассоциированную с глазным заболеванием, уменьшать признаки или симптомы кровотоечения, лечить мутное зрение, обеспечивать остановку потери зрения, улучшать зрение и/или предупреждать трансудацию из кровеносных сосудов. Описанные здесь антитела против CD105 также можно использовать в лекарственных средствах для лечения дегенерации желтого пятна, CNV, диабетической ретинопатии, макулярного отека или пролиферативной витреоретинопатии.

Кроме того, описанные здесь антитела против CD105 также можно использовать в комбинации с известными терапиями и/или соединениями для лечения дегенерации желтого пятна, CNV, диабетической ретинопатии, макулярного отека или пролиферативной витреоретинопатии. Примеры таких соединений включают ранибизумаб, афлиберцепт и пегаптаниб, но не ограничиваются ими. Помимо описанных здесь способов введения, антитела против CD105 можно вводить посредством интравитреальных путей. Неограничивающие примеры интравитреальных способов введения включают интравитреальную инъекцию и применение интравитреальных имплантов.

Пациентов можно оценивать на предмет улучшения и чувствительности к лечению. Лечение включает уменьшение макулярного отека, уменьшение площадей CNV и повышение остроты зрения, но не ограничивается ими. Измерения признаков и симптомов известны в данной области и дополнительно

описаны в приведенных ниже примерах.

Согласно описанным здесь воплощениям описанные здесь композиции можно вводить одни или в комбинации с одним или более чем одним дополнительным активным или неактивным агентом. При использовании комбинаций можно использовать одновременное или последовательное введение антител против CD105 и антител против VEGF (их антигенсвязывающих фрагментов).

Функциональные анализы.

Описанные здесь композиции можно оценивать в ряде анализов *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. Для отслеживания таких эффектов можно использовать любой подходящий анализ, известный специалисту в данной области. Здесь описано несколько таких методик.

Анализ сигнализации и функции CD105.

CD105 (эндоглин) является членом семейства рецептора TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста-бета), который экспрессируется пролиферирующими эндотелиальными клетками, и для пролиферации эндотелиальных клеток нужны нормальные уровни CD105. CD105 сильно экспрессируется в ангиогенной сосудистой сети солидных опухолей, участвует в ангиогенезе/развитии сосудов и представляет собой вспомогательный рецептор трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). CD105 представляет собой гомодимерный гликопротеин клеточной мембраны, который экспрессируется на лейкозных клетках и эндотелиальных клетках. Были охарактеризованы две изоформы CD105: L-эндоглин (170 кДа) и S-эндоглин (160 кДа), отличающиеся аминокислотной последовательностью их цитоплазматических хвостов.

Экспрессия CD105 усиливается клеточной гипоксией через продукцию индуцируемого гипоксией фактора-1- $\alpha$  (HIF-1- $\alpha$ ) и защищает подверженные гипоксии клетки от апоптоза. CD105 действует, модулируя сигнализацию многочисленных комплексов рецепторных киназ надсемейства TGF- $\beta$ , включая рецепторы TGF- $\beta$  (TGF-PR), киназы, подобные рецептору активина (ALK), и рецепторы активина. В отсутствие CD105 активация рецепторов TGF- $\beta$  приводит к фосфорилированию белков SMAD, которые ингибируют рост эндотелиальных клеток. Однако активация CD105 посредством TGF- $\beta$  модулирует фосфорилирование белков SMAD. Конечным результатом является высвобождение ингибирующих рост эффектов активации рецептора TGF- $\beta$  на эндотелиальных клетках.

Предотвращение активации CD105 посредством антитела против CD105 действует синергически с TGF- $\beta$ , подавляя рост эндотелиальных клеток. TGF- $\beta$  может стимулировать два отличных рецептора типа I/пути сигнализации SMAD с противоположными эффектами в эндотелиальных клетках. Путь сигнализации TGF- $\beta$ /ALK5 (A) приводит к ингибированию пролиферации и миграции клеток, тогда как путь TGF- $\beta$ /ALK1 (B) индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. CD105, вспомогательный рецептор TGF- $\beta$ , высокоэкспрессируемый во время ангиогенеза, является необходимым для сигнализации ALK1. В отсутствие CD105 сигнализация TGF- $\beta$ /ALK5 преобладает и поддерживает эндотелий в состоянии покоя. Высокая экспрессия CD105 стимулирует путь ALK1 и опосредованно ингибирует сигнализацию ALK5, таким образом, стимулируя состояние активации ангиогенеза.

В одном неограничивающем воплощении антитела можно оценивать в отношении ингибирования ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных клеток. Связывание антител против CD105 с HUVEC не предотвращает последующее связывание TGF- $\beta$  с HUVEC. Таким образом, прямое подавление роста эндотелиальных клеток антителами против CD105 представляет собой один из лежащих в основе механизмов, посредством которых наблюдаются антиангиогенные и подавляющие опухоли эффекты *in vivo*. В другом воплощении антитела можно оценивать в отношении блокирования ангиогенеза посредством предотвращения фосфорилирования и/или сигнализации Smad1/5/8. CD105 участвует в стимуляции ангиогенеза через сигнализацию TGF- $\beta$ /ALK1, которая, в свою очередь, вовлекает снижение и/или блокировку фосфорилирования белков Smad2/3. В еще одном воплощении антитела можно оценивать в отношении блокирования ангиогенеза посредством усиления фосфорилирования и/или сигнализации Smad2/3.

Способы и методики для анализа блокирующего или ингибирующего эффекта предложенных здесь антител на путь сигнализации TGF- $\beta$ /ALK1 и/или фосфорилирование Smad1/5 включают известные молекулярные методики, но не ограничиваются ими. В качестве примера, для определения ингибирующего и/или стимулирующего эффекта раскрытых здесь антител против CD105 на пути TGF- $\beta$ /ALK5 или TGF- $\beta$ /ALK1 можно использовать вестерн-блоттинг с антителами, специфичными к любому из белков в путях TGF- $\beta$ /ALK5 или TGF- $\beta$ /ALK1. Аналогичным образом, для анализа ингибирующего и/или стимулирующего эффекта раскрытых здесь антител можно использовать выявление мРНК (матричная РНК) или регуляцию мРНК для белков, участвующих в путях TGF- $\beta$ /ALK5 или TGF- $\beta$ /ALK1. В данной области известны и рассматриваются здесь дополнительные способы анализа клеточной сигнализации в отношении путей TGF- $\beta$ /ALK5 или TGF- $\beta$ /ALK1.

Активность раскрытых здесь антител против CD105 можно оценивать с использованием признанных в данной области анализов, например анализами связывания, такими как ELISA, конкурентные ELISA, поверхностный плазмонный резонанс и эффект на клетки HUVEC, как более подробно описано ни-

же.

SCID/"голые" мыши.

В одном способе анализа роста опухолей используют мышей SCID (тяжелый комбинированный иммунодефицит) следующим образом: отбирают субконфлюентные клетки человеческой меланомы M21, промывают и ресуспендируют в стерильном PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) ( $20 \times 10^6$  на мл). Мышам SCID подкожно инъецируют 100 мкл суспензии клеток человеческой меланомы M21 ( $2 \times 10^6$ ). Через трое суток после инъекции опухоли мышей либо оставляют необработанными, либо внутривенно или внутрибрюшинно обрабатывают (например 100 мкг/мышь) одной или более чем одной контрольной или тестируемой композицией. Мышей обрабатывают ежедневно в течение 24 суток. Размер опухоли измеряют циркулями, и объем оценивают с использованием формулы  $V=(L \times W^2)/2$ , где V представляет собой объем, L представляет собой длину и W представляет собой ширину.

В одном способе анализа роста опухолей используют "голых" мышей следующим образом: опухолевые клетки MDA-MB-435 ( $0,4 \times 10^6$  клеток/мышь) в 50 мкл PBS ортотопически имплантируют в жировое тело молочной железы самок "голых" мышей (в возрасте от пяти до шести недель). При достижении опухолями среднего объема приблизительно 50-80 мм мышей рандомизируют (по меньшей мере 10/группу) и инициируют внутривенную или внутрибрюшинную обработку одним или более чем одним антителом в количестве 1 мкг (0,05 мг/кг) на дозу, 10 мкг (0,5 мг/кг), 100 мкг (5 мг/кг) или 200 мкг (10 мг/кг), или 100 мкг контрольного антитела в 100 мкл PBS, или наполнителем - 100 мкл PBS дважды в неделю; в некоторых исследованиях также можно оценивать необработанную группу. Размер опухоли измеряют циркулями, и объем оценивают с использованием формулы  $V=(L \times W^2)/2$ , где V представляет собой объем, L представляет собой длину, и W представляет собой ширину.

Модели на основе BALB/c сингенных мышей.

В качестве альтернативы, для оценки роста опухоли и его ингибирования антителами, или как здесь описано, также можно использовать модели на основе сингенных мышей BALB/c, как проиллюстрировано, например, у Tsujie et al., *Int. J. Oncology*, 29: 1087-1094 (2006).

Мыши.

В другом анализе измеряют ангиогенез в мышинной модели химерная мышь:человек, и это называется анализом химерных мышей. Данный анализ был подробно описан другими авторами и дополнительно был описан здесь для измерения ангиогенеза, неоваскуляризации и регрессии опухолевых тканей. См. Yan, et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:986-996.

Анализ химерных мышей является полезной моделью для анализа ангиогенеза *in vivo*, так как трансплантированные лоскуты кожи имеют близкое гистологическое сходство с нормальной человеческой кожей, и происходит неоваскуляризация всей ткани, при которой реальные человеческие кровеносные сосуды растут из пересаженной человеческой кожи в человеческую опухолевую ткань на поверхности пересаженной человеческой кожи. Источник неоваскуляризации в человеческом трансплантате может быть продемонстрирован посредством иммуногистохимического окрашивания новых сосудов на специфичные для человека маркеры эндотелиальных клеток.

Анализ химерных мышей демонстрирует регрессию неоваскуляризации на основе как количества, так и степени регрессии роста новых сосудов. Кроме того, легко отслеживать эффекты на рост любой ткани, трансплантированной на пересаженную кожу, такой как опухолевая ткань. Наконец, данный анализ является полезным, так как имеется внутренний контроль токсичности в данной системе анализа. Химерную мышь подвергают воздействию любого тестируемого реактива, и, следовательно, здоровье мыши является показателем токсичности. В описанных здесь способах также могут быть использованы другие животные модели, описанные здесь и известные в данной области.

Анализ глаза кролика.

Другой мерой ангиогенеза является модель глаза кролика *in vivo*, и она называется анализом глаза кролика. Анализ глаза кролика был подробно описан другими авторами и был использован для измерения как ангиогенеза, так и неоваскуляризации в присутствии ингибиторов ангиогенеза, как проиллюстрировано примерами у D'Amato et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9): 4082-4085.

Анализ глаза кролика является признанной моделью анализа для ангиогенеза *in vivo*, поскольку процесс неоваскуляризации, проиллюстрированный примерами кровеносных сосудов кролика, растущих из края роговицы в роговицу, легко визуализировать через прозрачную по ее природе роговицу глаза. Кроме того, можно легко отслеживать во времени как степень, так и количество стимуляции или ингибирования неоваскуляризации или регрессии неоваскуляризации.

Наконец, кролика подвергают воздействию любого тестируемого реактива, и, следовательно, здоровье кролика является показателем токсичности тестируемого реактива.

Вкратце, проводят анализы на куриной хориоаллантаоидной мембране (CAM), и эффекты на развивающуюся сосудистую сеть записываются в 48 ч после имплантации гранулы 0,5%-ной карбоксиметилцеллюлозы, содержащего одно или более чем одно контрольное или тестируемое соединение. Неоваскуляризация роговицы индуцируется имплантированной гранулой из поли(гидроксиэтилметакрилата) (Hydron; Interferon Sciences, New Brunswick, NJ), содержащим 650 нг мощного ангиогенного белка - основ-

ного фактора роста фибробластов (bFGF), связанного с сукральфатом (сахарозы алюминия сульфат; Bukh Meditec, Копенгаген). Добавление сукральфата в гранулы защищает bFGF от деградации и обеспечивает его медленное высвобождение, таким образом вызывая устойчивый агрессивный ангиогенез, который является более выраженным, чем ангиогенез, индуцированный только bFGF/гидроном. Высвобождение bFGF из гранул, содержащих сукральфат/гидрон, можно выявлять *in vitro* в течение вплоть до 4 суток после образования таких гранул по сравнению с лишь 1 сутками для гранул с одним гидроном. Гранулы делают путем смешивания 110 мкл физиологического раствора, содержащего 12 мкг рекомбинантного bFGF (Takeda, Осака) с 40 мг сукральфата; данную суспензию добавляют в 80 мкл 12% (мас./об.) гидрона в этаноле. Аликвоты (10 мкл) данной смеси затем переносят пипеткой на тефлоновые штифты и дают высохнуть с получением приблизительно 17 гранул.

Гранулу имплантируют в микрокарманы роговицы каждого глаза анестезированных самок кролика New Zealand White в 2 мм от края, с последующим однократным местным нанесением эритромициновой мази на поверхность роговицы. Гистологическое исследование в последующие сутки демонстрирует прогрессирующий рост кровеносных сосудов в роговицу по направлению к грануле с наблюдением лишь редких воспалительных клеток. Данный ангиогенный ответ не изменяется тяжелой иммуносупрессией посредством облучения всего организма, и гранулы с одним сукральфатом не индуцируют ангиогенез. Новые сосуды индуцируются, прежде всего, bFGF, а не воспалением. Животным посредством промывания желудка ежесуточно, начиная с суток 2 после имплантации, скармливают одно или более чем одно соединение, суспендированное в 0,5%-ной карбоксиметилцеллюлозе, или один носитель. Непосредственно перед имплантацией гранул животные с иммуносупрессией получают воздействие радиации 6 Гр (Грэй) на весь организм в течение 6 мин. Данная доза радиации приводит к заметной лейкоцитопении с более чем 80%-ным уменьшением числа лейкоцитов к суткам 2 и более чем 90%-ным уменьшением к суткам 3, давая результаты, согласующиеся с предыдущими сообщениями.

Тот же самый специалист по роговице (M.S.L.) обследовал животных с использованием щелевой лампы через сутки маскированным способом. Площадь неоваскуляризации роговицы определяют измерением с использованием окулярной сетки длины сосудов (L) от края и количества участвующих сегментов края, соответствующих часам на циферблате (C). Формула, используемая для определения площади сегмента круговой полосы, является следующей:

$$C/12 \times 3,1416 [r^2 - (r-L)^2],$$

где r (измеренный радиус роговицы кролика) равен 6 мм. Измеряют однородную непрерывную полосу неоваскуляризации, прилегающую к грануле, таким образом, может быть оценено общее ингибирование неоваскуляризации.

Анализ ангиогенеза у мышей с использованием вставки из матригеля.

Для подтверждения эффектов композиции на ангиогенез можно использовать анализ ангиогенеза у мышей с использованием вставки из матригеля. Различные факторы роста (например IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1), bFGF или VEGF) (250 нг) и гепарин (0,0025 единиц на мл) смешивают с матригелем с пониженным содержанием факторов роста, как описано ранее (Montesano et al., J. Cell Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson et al., J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141). Описанные здесь композиции или контрольные антитела можно включать в препараты матригеля с использованием одной или более чем одной группы дозирования животных. В контрольных экспериментах матригель готовят в отсутствие факторов роста. Мышам подкожно инъецируют 0,5 мл препарата матригеля и оставляют инкубироваться в течение одной недели. После периода инкубации мышей умерщвляют и хирургически удаляют полимеризованные вставки из матригеля. Ангиогенез внутри вставок из матригеля количественно измеряют двумя установленными способами, включающими иммуногистохимический анализ и определение содержания гемоглобина (Furstenberger et al., Lancet. 2002, 3:298-302; Volpert et al., Cancer Cell 2002, 2(6):473-83 и Su et al., Cancer Res. 2003, 63:3585-3592). Для иммуногистохимического анализа вставки из матригеля погружают в OCT, быстро замораживают и получают 4 мкм срезы. Замороженные срезы фиксируют в метаноле/ацетоне (1:1). Замороженные срезы окрашивают поликлональным антителом, направленным на CD31. Ангиогенез количественно измеряют путем подсчета плотности микрососудов в 20 микроскопических полях при большом увеличении (200x).

Содержание гемоглобина можно количественно измерять, как описано ранее (Schnaper et al., J. Cell Physiol. 1993, 256:235-246; Montesano et al., J. Cell Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson et al., J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141 и Gigli et al., J. Immunol. 1986, 100:1154-1164). Матригелевые импланты быстро замораживают на сухом льду и лиофилизируют в течение ночи. Высушенные импланты ресуспендируют в 0,4 мл 1,0%-ного сапонина (Calbiochem) в течение одного часа и разрушают энергичным пипетированием. Препараты центрифугируют при 14000 × g в течение 15 мин для удаления любых твердых частиц. Затем прямо определяют концентрацию гемоглобина в супернатанте путем измерения поглощения при 405 нм и сравнивают со стандартной концентрацией очищенного гемоглобина.

Способы анализа миграции клеток.

Анализ миграции клеток были описаны в литературе, например, Brooks et al., J. Clin. Invest 1997, 99:1390-1398, и способы измерения миграции клеток известны специалистам в данной области. В одном

описанном здесь способе измерения миграции клеток мембраны из камер Transwell для определения миграции покрывают субстратом (здесь CD105 и/или VEGF), камеры Transwell промывают и сайты неспецифического связывания блокируют с помощью BSA (бычий сывороточный альбумин). Опухолевые клетки из субконфлюентных культур отбирают, промывают и ресуспендируют в буфере для миграции в присутствии или в отсутствие анализируемых антител. После того как опухолевым клеткам позволяют мигрировать на нижнюю сторону мембран Transwell с покрытием, клетки, остающиеся на верхней стороне мембраны, удаляют, и клетки, которые мигрируют на нижнюю сторону, окрашивают кристаллическим фиолетовым. Миграцию клеток затем количественно измеряют прямым подсчетом клеток на микроскопическое поле.

Способы анализа пролиферации клеток.

Пролиферацию клеток можно анализировать способами, известными специалистам в данной области. Как здесь описано, субконфлюентные человеческие эндотелиальные клетки (HUVEC) можно ресуспендировать в буфере для пролиферации, содержащем малое (5%) количество сыворотки в присутствии или в отсутствие CM (25 мкл) из клеток ECV или ECVL, и эндотелиальным клеткам давали пролиферировать в течение 24 ч. Пролиферацию можно количественно оценивать измерением митохондриальной дегидрогеназной активности с использованием имеющегося в продаже набора для анализа WST-1 (Chemicon). Также, как здесь описано, пролиферацию можно количественно оценивать измерением включения  $^3\text{H}$  с использованием стандартных способов. (She et al., *Int. J. Cancer*, 108: 251-257 (2004)).

В данной области известны и рассматриваются здесь другие способы оценки пролиферации клеток. Другие неограничивающие примеры более подробно описаны в примерах.

Способы индуцирования CDC, ADCC и опсонизации.

На усиление природного иммунного ответа организма на трансформированные клетки были направлены различные терапии. Традиционные эффекторными способами включают комплементзависимый цитолиз ("CDC"), антителозависимую клеточную цитотоксичность ("ADCC") и фагоцитоз (клиренс ретикулоэндотелиальной системой после покрытия клетки-мишени иммуноглобулином). Известно, что в присутствии антител определенные эффекторные клетки, такие как лимфоидные клетки, имеющие связанные с поверхностью рецепторы к областям Fc антител, опосредуют реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности ("ADCC") против клеток-мишеней. Посредством ADCC данные эффекторные клетки оказывают цитолитическую активность против таких клеток-мишеней.

Было продемонстрировано два типа реакций ADCC *in vitro*. В классических реакциях ADCC эффекторные клетки прикрепляются к клеткам-мишеням, покрытым антителами, и затем вызывают цитолиз клеток-мишеней (A.H. Greenberg et al., "Characteristics Of The Effector Cells Mediating Cytotoxicity Against Antibody-Coated Target Cells," *Immunology*, 21, p. 719 (1975)). Данное присоединение между эффекторной клеткой и клеткой-мишенью происходит в результате взаимодействия области Fc антитела, покрывающего клетку-мишень, и рецептора Fc эффекторной клетки. Одним недостатком данного типа реакции ADCC является то, что она может затрудняться находящимися в системе кровообращения комплексами антиген-антитело, часто ассоциированными с различными заболеваниями, которые конкурируют с антителом, связанным с клеткой-мишенью, за рецепторы Fc эффекторных клеток (I.C.M. MacLennan, "Competition For Receptors For Immunoglobulin On Cytotoxic Lymphocytes," *Clin. Exp. Immunol.*, 10, p. 275 (1972)). Из-за этого недостатка классической ADCC может использоваться второй тип реакции ADCC - направляемая антителами ADCC. При направляемой антителами ADCC специфичное к мишени антитело сперва присоединяется к эффекторной клетке, и образующийся комплекс затем "направляется", посредством антитела, к его специфичному антигену на поверхности клетки-мишени. Преимущественно, направляемая антителами ADCC может не подвергаться влиянию присутствия комплексов антиген-антитело, циркулирующих в системе хозяина. Взаимодействие между антителами и эффекторными клетками через присоединение области Fc к рецептору Fc обычно является слабым. И, в некоторых случаях, антитела не остаются ассоциированными с эффекторными клетками в течение достаточного периода времени для обеспечения лизиса клеток-мишеней. Ввиду этой потенциальной проблемы антитела были присоединены к эффекторным клеткам с использованием предобработки полиэтиленгликолем и смесью фталатных масел (J.F. Jones, D.M. Segal, "J. Immunol.", 125, pp. 926-33 (1980)). Применимость данного способа для работ *in vivo*, однако, может быть снижена токсичными эффектами на организм, которые могут иметь остатки полиэтиленгликоля и фталатного масла на комплексе антитело-эффекторная клетка.

В качестве альтернативы, был предложен способ усиления направляемой антителами ADCC посредством адьювантной химиотерапии с цитотоксическими лекарственными средствами (I.R. Maskay et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 16, pp. 98-100 (1983)). Анализы для тестирования ADCC хорошо известны в данной области, как, например, патент США № 5756097.

Соответственно, согласно настоящим воплощениям предложены антитела, которые могут связываться с клетками, имеющими роль в неоваскуляризации или ангиогенезе, или которые могут усиливать фагоцитоз и умерщвление клеток и, посредством этого, усиливать защиту *in vivo*. Также предложены другие антитела и их функциональные фрагменты, которые являются иммуннореактивными, специфично связываются или предпочтительно связываются с сайтом связывания или эпитопом, с которым такие антитела могут связываться, и которые имеют такой же эффект.

Антитела также могут быть опсоническими или демонстрировать опсоническую активность в отношении клеток, имеющих роль в неоваскуляризации или ангиогенезе (например эндотелиальных клеток). Как известно специалистам в данной области, термин "опсоническая активность" относится к способности опсонина (обычно либо антитело, либо сывороточный фактор С3b) связываться с антигеном или рецептором клетки для стимуляции присоединения антигена или клеточного рецептора к фагоциту и посредством этого усиления фагоцитоза. Определенные клетки становятся особенно привлекательными для фагоцитов, таких как нейтрофилы и макрофаги, когда они покрыты опсоническим антителом, и их скорость клиренса из кровотока поразительно увеличивается. Опсоническую активность можно измерять любым традиционным способом, как описано, например, в патенте США № 6610293.

В другом неограничивающем воплощении пациент, имеющий неоваскулярное расстройство или расстройство, зависимое от ангиогенеза, выделяет антигены/пептиды (например CD105) в результате ангиогенеза. Данные антигены/пептиды могут представлять собой "антигены, ассоциированные с опухолью". Таким пациентам можно системно вводить антитело на антиген/пептид (например CD105), и у них может инициироваться любой из описанных здесь путей для индуцирования CDC, ADCC, опсонизации или любой другой формы клеточно-опосредованного умерщвления.

Дополнительные анализы.

Для тестирования эффекта описанных здесь композиций, таких как, например, композиции, описанные в приведенных ниже примерах, также можно использовать другие анализы, известные в данной области.

### Примеры

Изобретение можно лучше понять посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры, которые приведены как типичные воплощения заявки. Следующие примеры представлены для того, чтобы более полно проиллюстрировать типичные воплощения, и они, однако, ни в коей мере не должны истолковываться как ограничивающие широкий объем данной заявки. В то время как здесь были показаны и описаны определенные воплощения настоящей заявки, будет очевидным, что такие воплощения приведены лишь в качестве примера. Могут иметь место многочисленные вариации, изменения и замены; следует понимать, что в применении описанных здесь способов на практике можно использовать разные альтернативы описанных здесь воплощений.

Пример 1. Типичные схемы дозировки для введения.

Оптимальные схемы дозировки для введения описанных здесь антител и их антигенсвязывающих фрагментов можно определять с использованием известных в данной области способов и как описано выше.

В одном неограничивающем воплощении описанные здесь антитела можно вводить субъекту на протяжении разных временных рамок. Дозу(ы) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно вводить дважды в неделю, еженедельно, каждые две недели, каждые три недели, каждые 4 недели, каждые 6 недель, каждые 8 недель, каждые 12 недель или в течение любой из приведенных здесь комбинаций недель. Также рассматриваются циклы дозирования, такие как, например, введение антител один или два раза в неделю в течение 4 недель, с последующими двумя неделями без терапии. Здесь также рассматриваются дополнительные циклы дозирования, включающие, например, описанные здесь различные комбинации доз и недельных циклов.

Пример 2. Анализ ВІАscore (поверхностный плазмонный резонанс: SPR).

Аффинность антител можно оценивать с использованием, например, анализа ВІАscore, используя стандартные протоколы. Вкратце, антитело против гистидинового метки связывают с чипом ВІАscore для захвата His-меченного рекомбинантного человеческого CD105, который, в свою очередь, будет использоваться для измерения связывания антитела против CD105. Анализ SPR проводят минимум на 2 партиях препаратов чипов с 8 аналитическими партиями. В ходе данного анализа оценивают следующие параметры.

(а) Связывание антитела против His с чипами CM5.

Антитело против His-метки связывают с чипом CM5 ВІАscore посредством традиционной аминной химии с использованием EDC/NHS (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид/N-гидроксисукцинимид). Условия реакции (концентрация и pH) будут оптимизированы.

(б) Связывание человеческого CD105 и регенерация биосенсорного чипа.

Тестируют условия для связывания человеческого CD105 и регенерации чипа с использованием разных буферов (на основе предыдущего опыта) для элюции связанного антитела. Как только был разработан потенциальный способ регенерации, измеряли способность к связыванию и фон одной поверхности чипа на протяжении по меньшей мере 25 циклов. Целью является получение увеличения фона в среднем на менее чем 10 RU (резонансная единица) за цикл и снижение способности на менее чем 1% за цикл.

(в) Связывание человеческого CD105.

Измеряют ответ на дозу человеческого CD105 для того, чтобы определить подходящую концентрацию для достижения максимального связывания.

(г) Связывание антитела против CD105.

Измеряют ответ на дозу антитела против CD105 для того, чтобы определить подходящий интервал для экспериментов по кинетике или равновесному связыванию (которые могут включать сравнение относительных кинетических констант,  $k_a$  и  $k_d$ , или сравнение относительной эффективности посредством способа параллельных линий).

(д) Эксперименты по предварительной валидации.

Эксперименты по связыванию повторяют по меньшей мере три раза при выбранных условиях с использованием разных чипов, разных проточных ячеек и в разных ситуациях для того, чтобы получить предварительную информацию относительно точности и аккуратности измерений. Все эксперименты VIAcore проводят при 25°C в буфере для анализа HBS-EP.

Пример 3. ELISA для связывания антитела против CD105.

ELISA можно использовать для анализа связывания антител против CD105 с CD105. Вкратце, ELISA проводят согласно следующим этапам.

1. Покрыть планшет MAB9811-01 (моноклональное антитело против CD105) в концентрации 1500 нг/мл в PBS, 100 мкл/лунку. Накрыть планшет запечатывающей пленкой и инкубировать в течение ночи (16-24 ч) при 4°C.

2. Промыть планшет 2× 200 мкл PBS (без Tween).

3. Промыть планшет 3× PBS, содержащим Tween (PBS-T).

4. Добавить 100 мкл/лунку CD105 в концентрации 100 нг/мл в PBS-T с 0,1% BSA и инкубировать 60 мин при комнатной температуре.

5. Промыть планшет 3× PBS-T.

6. В опытные лунки: добавить 100 мкл/лунку антител против CD105 в концентрации 20, 10, 4, 2, 1, 0,5 и 0,2 нг/мл (разведенных в PBS-T с 0,1% BSA) и инкубировать 60 мин при комнатной температуре. В лунки негативного контроля: добавить 100 мкл/лунку контрольного антитела, соответствующего по изо-типу.

7. Промыть планшет 3× PBS-T.

8. Добавить 100 мкл/лунку козьего противочеловеческого IgG, конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена), разведенного 1:10000 в PBS-T с 0,1% BSA во все лунки; инкубировать 30-60 мин при комнатной температуре.

9. Промыть планшет 5× PBS-T.

10. Добавить 100 мкл/лунку раствора субстрата TMB (тетраметилбензидин) и инкубировать в незакрытом планшете в темноте в течение 15 мин.

11. Остановить реакцию добавлением 100 мкл/лунку останавливающего раствора с TMB.

Образцы анализируют в тройной повторности и считывают оптическую плотность для построения стандартной кривой и определения константы связывания. Статистический анализ проводят с использованием t-критерия Стьюдента или другого стандартного критерия.

Было бы понятно, что аналогичный протокол можно использовать для тестирования связывания антител с VEGF.

Пример 4. Авидность антител и количество доступных эпитопов на клетках, экспрессирующих CD105.

Авидность антител и количество доступных эпитопов на клетках, экспрессирующих CD105, можно оценивать с использованием анализов графиков Скэтчарда с использованием стандартных протоколов.

Вкратце, проводят анализы графиков Скэтчарда прямого связывания радиоактивно меченных антител против CD105 с лейкозными клетками KM-3, экспрессирующими CD105, и субконфлюентными пролиферирующими HUVEC. Очищенные антитела против CD105 индивидуально радиоактивно метят  $^{125}\text{I}$  с использованием Indo-Gen и согласно стандартным способам, известным специалистам в данной области. Радиоактивно меченные антитела против CD105 анализируют на предмет атомов йода, в среднем приходящихся на молекулу IgG, соответственно. Проводят эксперименты по титрованию с использованием фиксированного количества (0,1 мкг) каждого mAb (моноклональное антитело), меченного  $^{125}\text{I}$ , и 2-кратных серийных инкрементов KM-3, экспрессирующих CD105, или клеток HUVEC для определения антигенсвязывающей активности. Анализ графика Скэтчарда данных связывания проводят согласно известным способам. Посредством данного анализа оценивают константу равновесия и среднее максимальное число связанных mAb/клетку.

Пример 5. Анализ блокирующей активности с использованием вестерн-блоттинга.

Способность антител против CD105 блокировать стимулируемую CD105 активацию клеток, которые экспрессируют CD105, можно анализировать посредством вестерн-блоттинга для выявления фосфорилирования белков, участвующих в пути сигнализации CD105.

Вестерн-блоттинг-анализы проводят для идентификации фосфорилированных Smad1/5/8 или Smad2 согласно известным методикам вестерн-блоттинга. Антитела PSmad1 и PSmad2 специфично распознают фосфорилированный Smad1/5 или фосфорилированный Smad2 в нетрансфицированных эндотелиальных клетках. Для выявления молекул в образцах используют первичные антитела против Smad1, Smad2, Smad5, Id1 (Santa Cruz) и CD105. Выявление осуществляют посредством усиленной хемилюминисцен-

ции (ECL).

Пример 6. Ингибирование роста HUVEC и анализ включения  $^3\text{H}$ -тимидина.

Доступен ряд анализов для оценки ингибирования роста клеток.

В одном примере HUVEC культивируют в 75 см<sup>2</sup> флаконах (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) в инкубаторе с CO<sub>2</sub> при 37°C при субконфлюентных условиях. Клетки отделяют путем инкубирования со сбалансированным солевым раствором Хэнкса с 15 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) в 25 мМ буфере HEPES, pH 7,3 при 37°C в течение 15 мин. После двукратной промывки ледяным PBS клетки ресуспендируют в среде для роста эндотелиальных клеток в концентрации 25000 клеток/мл.

В дополнительных экспериментах человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC) суспендируют и культивируют в среде для роста эндотелиальных клеток, не содержащей FBS (фетальная телячья сыворотка) и экстракт бычьего мозга. 200 мкл аликвоту клеточной суспензии высевает в каждую лунку 96-луночных культивируемых планшетов. Перед добавлением в тройной повторности антител против CD105, антител против VEGF, комбинации антител против CD105 и антител против VEGF, контрольного IgG или TGF- $\beta$ 1 клетки культивируют при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub> в течение ночи. Культуральные планшеты выдерживают в инкубаторе в течение 72 ч, на протяжении которых каждые 24 ч осуществляется замена на свежие среды и антитела или контроли. В каждую лунку добавляют  $^3\text{H}$ -тимидин (1 мкКи), и планшеты инкубируют в течение 20 ч. Клетки промывают PBS с последующей обработкой 100 мкл/лунку трипсина-EDTA (0,05% трипсин, 0,53 мМ EDTA) при 37°C в течение 15 мин. Клетки отбирают на фильтры из стекловолокна (Wallac Printed FiltermatA) с использованием сборщика клеток 96 (ТОМТЕС, Hamden, CT), и радиоактивность H определяют на жидкостном сцинтилляционном и люминисцентном счетчике Trilux 1540 MicroBeta (Wallac, Турку, Финляндия).

Пример 7. Анализ ингибирования миграции клеток.

Миграцию (хемотаксис) как меру пролиферации и активации клеток измеряют с использованием камеры Бойдена.

Вкратце, миграцию клеток оценивают следующим образом: нуклеопоровый фильтр Costar (поры 8 мкм) покрывают фибронектином в течение ночи при 4°C. Камеру промывают забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS), и нижнюю камеру заполняют DMEM с сывороткой или без нее и с TGF- $\beta$ 3 или без него. Клетки трипсинизируют и суспендируют в конечной концентрации 50000 клеток/мл в DMEM в присутствии контрольного антитела, антитела против CD105, антитела против VEGF или их комбинации. В верхнюю камеру добавляют 150 мкл аликвоту суспензии клеток и инкубируют при 37°C. Через 16 ч клетки промывают и верхнюю поверхность протирают для удаления немигрирующих клеток. Мембраны фиксируют в метаноле, промывают водой, окрашивают и подсчитывают число клеток, присутствующих на нижней поверхности.

Пример 8. Анализ ADCC.

Описанные здесь антитела можно оценивать в отношении их способности генерировать естественные клетки-киллеры (NK), активируемые IL-2 (интерлейкин-2), и индуцировать ADCC с использованием, например, следующих протоколов.

Выделение NK и получение клеток NK, активируемых IL-2.

PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) выделяют и дают им находиться в покое в течение 24 ч при 4°C в RPMI с 10% FBS. PBMC затем помещают в RPMI с 2% FBS (общий объем - 50 мл) и 10 мл клеточной суспензии переносят в чашки Петри. PBMC инкубируют в течение 2 ч при 37°C и собирают неприкрепившиеся клетки. Клетки NK культивируют в количестве  $8 \times 10^6$  /мл с 1000 U/мл IL-2 в течение 48 ч, затем посредством нормального культивирования в течение 5-8 суток перед использованием в анализе.

Анализ цитотоксичности естественных киллеров и ADCC.

Клетки NK соскабливают из культуры и отбирают в 50 мл коническую пробирку. Клетки один раз промывают полной RPMI и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 10 мин. Клетки NK затем ресуспендируют в 5 мл полной среды RPMI и подсчитывают. Перед проведением анализа число клеток NK нормируют к соотношению эффектор:мишень 10:1. Нормированные клетки NK переносят на планшет и в обозначенные лунки добавляют 10 мкл антител против CD105 и инкубируют в течение 30 мин при 37°C. Контрольные образцы включают необработанные или обработанные контрольным антителом популяции клеток.

Интересующие клетки-мишени собирают (клетки HUVEC), промывают, центрифугируют при 1200 об/мин в течение 10 мин и ресуспендируют в 5 мл полной среды RPMI. Клетки-мишени снова промывают и ресуспендируют в бессывороточной RPMI до конечной концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки-мишени затем метят конечной концентрацией 5 мкг/мл кальцеина AM в течение 1 ч при 37°C с последующими двумя промывками полной RPMI. Клетки-мишени затем ресуспендируют и добавляют в лунки с клетками NK. Комбинацию клетка-мишень/клетка NK инкубируют при 37°C в течение 4 ч. После инкубации планшеты центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин и клетки промывают и ресуспендируют в DPBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, модифицированный по Дульбекко). Флуорес-

ценцию считают с использованием возбуждения/испускания 450/530 нм, и испускание является мерой умерщвления клеток, опосредованного антителами.

Пример 9. Оценка стабильности композиций TRC105 (антитело против CD105).

Авторы настоящего изобретения идентифицировали композиции, которые обеспечивали адекватную стабильность для концентрации TRC105 больше чем 5 мг/мл. Исходные исследования показали, что TRC105 могло быть сконцентрировано до по меньшей мере 25 мг/мл без каких-либо очевидных проблем с растворимостью. Следовательно, 25 мг/мл TRC105 выбрали в качестве исходной концентрации для исследований по скринингу. По ходу данных исследований оценивали композиции, содержащие вплоть до 50 мг/мл TRC105. Также оценивали дополнительные композиции с концентрациями 7 мг/мл TRC105 и 100 мг/мл TRC105.

#### Методики

Абсорбционная спектроскопия в ультрафиолетовой (УФ) области.

Для определения концентрации белка в образцах с различной стабильностью использовали УФ спектроскопию. Определили, что поглощение основной части вещества (7,0 мг/мл) при 280 нм составляет 1,13 при использовании ячейки с длиной пути 1 мм, что дает коэффициент экстинкции 1,61 мл/мг·см. Данное значение использовали для всех расчетов в данном проекте. Дальнейшие измерения проводили с использованием ячейки с длиной пути 0,0096 см, которая больше подходила для образцов с высокой концентрацией.

Инкубация образцов TRC105 для определения тепловой стабильности.

Каждую композицию для определения тепловой стабильности пропускали через 0,22 мкм фильтр Millex с использованием шприца с наконечником Люэра и затем аликвотировали в 1 мл лиофилизационные флаконы. Каждый флакон закрывали бутиловой пробкой и обжимали алюминиевым колпачком. Образцы помещали при указанной температуре в камеры для определения стабильности и удаляли из них после указанного периода инкубации, через недели.

Замораживание-оттаивание и встряхивание TRC105.

Образцы для замораживания-оттаивания (F/T) замораживали в течение 25 мин, затем оттаивали в течение 25 мин 0, 3 или 5 раз. Все замораживания проводили при -80°C. Оттаявшие образцы проверяли на предмет полного оттаивания перед возвращением в морозильник. Каждый образец для замораживания-оттаивания содержал 100 мкл раствора и хранился в 0,5 мл пробирках Эппендорфа. Каждый образец содержал 0,1% F68, 0,005% Tween 80 или не содержал поверхностно-активное вещество.

Образцы для исследования влияния встряхивания готовили в количестве 350 мл на флакон и метили как находящиеся в состоянии покоя, либо встряхиваемые. Все образцы перемещали в холодную комнату с температурой 4°C. Образцы, помеченные как встряхиваемые, помещали на орбитальный шейкер, работающий на скорости 150 об/мин. Образцы, находящиеся в состоянии покоя, помещали на полку, расположенную рядом с орбитальным шейкером. Каждый образец содержал 0,1% F68, 0,005% Tween 80 или не содержал поверхностно-активное вещество. Образцы инкубировали в течение 24 ч при указанных условиях.

Гель-хроматография (SEC).

Получали подвижную фазу, содержащую 0,2М одноосновный фосфат натрия, доведенный до pH 7,0 с использованием 1,0М гидроксида натрия. Для всех разделений использовали колонку TSK Gel G3000 PWx1 (7,8 мм × 30 см, частицы 7 мкм № P0047-02PN). Использовали скорость тока 1 мл/мин, и длина волны выявления была установлена на 280 нм. Инъекционный объем составлял 2 мкл для образцов с концентрацией 25 мг/мл и 1 мкл для образцов с концентрацией 50 мг/мл. Перед анализом каждого образца в тройной повторности прогоняли пустые пробы, содержащие только буфер, и данные хроматограммы надлежащим образом вычитали. Все интегрирования пиков проводили на Chromeleon 6.08.

Капиллярное IEF (сIEF).

Анализ капиллярным изоэлектрическим фокусированием (сIEF) проводили, как описано в руководстве по применению PA 800 plus, опубликованному Beckman Coulter. Более подробное описание можно найти у Mack et al. (Electrophoresis 2009, 30 (23), 4049-4058). Все анализы проводили с использованием системы Beckman Coulter P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Inc.; Brea, CA), работающей при температуре окружающей среды с нейтральным капилляром (внутр. диаметр 50 мкм) общей длины 30 см (20 см эффективной длины). Нейтральный капилляр получали путем иммобилизации поли(акриламида) в стенку капилляра с использованием способа, описанного Gao et al. (Anal Chem 2004, 76 (24), 7179-7186). Все образцы для сIEF получали смешиванием интересующего белка в концентрации 0,25 мг/мл со смесью 3М мочевины-амфолита, содержащего гель для сIEF, катодного стабилизатора, анодного стабилизатора и маркеров pI. Образец инъецировали в капилляр под давлением 65,5 кПа в течение 4,1 мин, после этого времени его фокусировали путем приложения напряжения 25 кВ между анолитом и католитом на 15 мин. После данной стадии следовала химическая мобилизация при 30 кВ между анолитом и химическим мобилизатором в течение 30 мин. Во время стадии мобилизации маркеры pI и интересующий белок выявляли с использованием поглощения при 280 нм. pI данного белка рассчитывали из полученного уравнения регрессии pI относительно момента первого пика, полученного со стандартами pI.

### Результаты и обсуждение

Исследование 1.

Образцы TRC105 успешно концентрировали до концентраций, превышающих 5 мг/мл. В результате исследование 1 проводили с использованием концентрации белка 25 мг/мл. Образцы хранили в течение двух недель при 40°C. Готовили пятнадцать препаратов, сосредотачиваясь на эффектах pH и состава буфера (табл. 2). Первичным аналитическим способом, используемым для оценки стабильности данных образцов, была SEC. После хранения в течение двух недель при 40°C посредством SEC наблюдали очень маленькое изменение либо содержания мономера, либо количества высокомолекулярных агрегатов (табл. 3). После хранения все композиции все еще содержали более чем 99% мономера.

Таблица 2. Состав композиции TRC105, оцениваемой в исследовании 1

Номер композиции	pH	фос. (мМ)	His (мМ)	цитрат (мМ)	ацетат (мМ)	NaCl (мМ)	трегалоза (мМ)
F01	7	20	0	0	0	130	0
F02	6	20	0	0	0	130	0
F03	6	0	20	0	0	130	0
F04	5	0	20	0	0	130	0
F05	6	0	0	20	0	130	0
F06	5	0	0	20	0	130	0
F07	4	0	0	0	20	130	0
F08	5	0	0	0	20	130	0
F09	5	0	20	0	0	0	240
F10	5	0	0	20	0	0	240
F11	5	0	0	0	20	0	240
F12	6	10	0	0	0	0	240
F13	6	0	10	0	0	0	240
F14	6	10	0	0	0	80	120
F15	6	0	10	0	0	80	120

Таблица 3. Краткое изложение уровней мономера и агрегатов, измеренных посредством SEC, для композиций из исследования 1 в исходный момент времени и момент времени две недели (t2)

Номер композиции	pH	исходный % агрегатов	исходный % мономера	% агрегатов в две недели	% мономера в две недели
F01	7	0,32	99,54	0,48	99,52
F02	6	0,19	99,70	0,22	99,71
F03	6	0,19	99,78	0,14	99,82
F04	5	0,14	99,82	0,13	99,85
F05	6	0,19	99,78	0,28	99,71
F06	5	0,13	99,83	0,21	99,77
F07	4	0,11	99,86	0,10	99,88
F08	5	0,11	99,85	0,26	99,72
F09	5	0,16	99,81	0,09	99,90
F10	5	0,13	99,84	0,19	99,79
F11	5	0,15	99,82	0,16	99,82
F12	6	0,19	99,78	0,53	99,45
F13	6	0,21	99,76	0,15	99,81
F14	6	0,20	99,76	0,45	99,52
F15	6	0,21	99,79	0,21	99,77

Обнаружили, что TRC105 является очень стабильным.

Исследование 2.

Имея в распоряжении результаты исследования 1, разработали новое исследование. В исследовании 2 pH варьировал от 4,5 до 5,5, и оценивали эффекты ацетата, гистидина и цитрата. Выбранными модифи-

каторами/стабилизаторами тоничности были сорбит и трегалоза. Наконец, помимо композиций с концентрацией 25 мг/мл, исследовали три композиции с концентрацией 50 мг/мл.

Таблица 4. Состав композиции TRC105, оцениваемой в исследовании 2

Номер композиции	pH	Белок Мг/мл	His (мМ)	цитрат (мМ)	ацетат (мМ)	сорбит	трегалоза
F01	5,5	25	0	0	20	0	0
F02	4,5	25	0	0	20	0	0
F03	5,5	25	0	20	0	0	0
F04	5,5	25	20	0	0	0	0
F05	4,5	25	0	0	10	0	0
F06	4,0	25	0	0	10	0	0
F07	5,5	25	20	0	0	240	0
F08	5,5	25	20	0	0	0	240
F09	4,0	25	0	0	20	240	0
F10	4,0	25	0	0	20	0	240
F11	5,5	25	0	10	0	240	0
F12	5,5	25	0	10	0	0	240
F13	5,5	25	10	0	0	240	0
F14	5,5	25	10	0	0	0	240
F15	4,0	50	0	0	10	0	0
F16	5,0	50	0	0	20	0	0
F17	5,5	50	20	0	0	240	0

Принимая во внимание стабильность TRC105, данные образцы хранили в течение четырех недель при 40°C для того, чтобы постараться в большей степени различать композиции. Первичным инструментом для скрининга была SEC.

Таблица 5. Краткое изложение уровней мономера и агрегатов, измеренных посредством SEC, для композиций из исследования 1 в исходный момент времени и момент времени четыре недели

Номер композиции	pH	буфер	исходный % агрегатов	исходный % мономера	% агрегатов в четыре недели	% мономера в четыре недели
F01	5,5	ацетат	0,17	99,83	0,27	99,73
F02	4,5	ацетат	0,10	99,90	0,16	99,84
F03	5,5	цитрат	0,14	99,86	0,22	99,78

F04	5,5	His	0,17	99,83	0,13	99,87
F05	4,5	ацетат	0,11	99,89	0,14	99,86
F06	4,0	ацетат	0,10	99,90	0,12	99,88
F07	5,5	His	0,15	99,85	0,13	99,87
F08	5,5	His	0,23	99,77	0,16	99,84
F09	4,0	ацетат	0,14	99,86	0,15	99,85
F10	4,0	ацетат	0,15	99,85	0,15	99,85
F11	5,5	цитрат	0,16	99,84	0,30	99,70
F12	5,5	цитрат	0,21	99,79	0,28	99,72
F13	5,5	His	0,19	99,81	0,15	99,85
F14	5,5	His	0,27	99,73	0,16	99,84
F15	4,0	ацетат	0,17	99,83	0,16	99,84
F16	5,0	ацетат	0,19	99,81	0,85	99,15
F17	5,5	His	0,24	99,76	0,26	99,74

Аналогично тому, что наблюдали в исследовании 1, содержание мономера практически во всех композициях превышает 99,5%, даже после одного месяца при 40°C (табл. 5). Один образец, по-видимому, демонстрирует повышенный уровень агрегации, и им был F16; данный образец не подвергали повторному испытанию для того, чтобы понять, был ли этот результат реальным. Показателем является то, что pH 4 в ацетате или pH 5,5 в гистидине, по-видимому, обеспечивают адекватную и сравнимую стабильность. Принимая во внимание связь цитрата и раздражения, его удалили из дальнейшего рассмотрения.

Данные образцы также анализировали с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF). Общий центр электрофореграммы сIEF считали в качестве первого момента. Данные значения можно рассматривать как средние значения pI образца (табл. 6).

Таблица 6. Среднее значение pI для композиций TRC из исследования 2 в исходный момент времени и момент времени четыре недели

№ композиции	pH	буфер	исходный	4 недели
F01	5,5	ацетат	8,97	8,88
F02	4,5	ацетат	8,76	8,94
F03	5,5	цитрат	8,84	8,88
F04	5,5	His	8,94	8,88
F05	4,5	ацетат	8,78	8,87
F06	4,0	ацетат	8,86	8,89
F07	5,5	His	8,87	8,88
F08	5,5	His	8,93	8,87
F09	4,0	ацетат	8,92	8,90
F10	4,0	ацетат	8,92	8,92
F11	5,5	цитрат	8,96	8,87
F12	5,5	цитрат	8,92	8,85
F13	5,5	His	8,91	8,90
F14	5,5	His	8,95	8,92
F15	4,0	ацетат	8,90	8,87
F16	5,0	ацетат	8,90	8,86
F17	5,5	His	8,95	8,93

В целом, изменение значения pI для любой из композиций является малым, свидетельствуя о том, что дезамидирование, т.е. гидролиз боковых цепей Asp с образованием продуктов в виде заряженных Asp, является относительно медленным (табл. 6). Таким образом, данные композиции TRC105, по-видимому, являются физически стабильными (т.е. демонстрируют мало агрегации или не демонстрируют ее) и химически стабильными (т.е. не демонстрируют фрагментацию и демонстрируют мало дезамиди-

рования или не демонстрируют его).

Другая проблема касалась того, демонстрировали ли данные композиции с более высокой концентрацией неблагоприятную вязкость, ограничивая посредством этого их клиническое применение.

Таблица 7. Динамическая вязкость TRC105 в ацетатном и гистидиновом буферах при концентрациях примерно 25 и примерно 50 мг/мл

Композиция	pH	[Белок]	Вязкость (сСт)
20 mM ацетат	4,0	25,1	1,19 ± 0,01
	4,0	51,8	1,53 ± 0,01
20 mM гистидин	5,5	23,8	1,22 ± 0,01
	5,5	47,6	1,65 ± 0,04

Даже в концентрации 50 мг/мл TRC105 демонстрирует вязкость меньше чем 2 сСт, что значительно меньше любого значения, которое вызвало бы проблему органичений при обращении и введении (см. табл. 7).

Исследование встряхивания.

В то время как тепловой стресс является полезным для различения композиций разной стабильности, он является не единственным стрессовым воздействием, с которым может сталкиваться белок. Обычным является повреждение белков на границе раздела фаз, и должна оцениваться их чувствительность к напряжению на границе раздела фаз. Это делали с использованием встряхивания и повторных циклов замораживания-оттаивания (F/T).

Таблица 8. Содержание мономера, определенное посредством SEC, для композиций TRC105, которые встряхивали в течение 24 ч при 150 об/мин, и соответствующих образцов в состоянии покоя.

Все образцы выдерживали при 4°C

Композиция	Поверхностно-активное вещество	Белок	Мономер (покой)	Мономер (стресс)
pH 5, 20 mM ацетат	Нет	25	99,84	99,84
	F68	25	99,83	99,83
	PS80	25	99,81	99,82
pH 5, 20 mM ацетат	Нет	50	99,82	99,83
	F68	50	99,82	99,82
	PS80	50	99,81	99,83
pH 5,5, 20 mM His	Нет	25	99,75	99,76
	F68	25	99,74	99,76
	PS80	25	99,76	99,77
pH 5,5, 20 mM His	Нет	50	99,77	99,75
	F68	50	99,76	99,75
	PS80	50	99,76	99,77

Ощутимая потеря мономера при встряхивании отсутствует, причем все композиции демонстрируют более чем 99,7% мономера и отсутствие значимого отличия от контроля, находящегося в состоянии покоя (табл. 8). Добавление поверхностно-активного вещества, такого как Pluronic F-68 или полисорбат 80, по-видимому, не улучшает или не вредит стабильности при встряхивании.

Исследование F/T.

Второе исследование, проверяющее чувствительность TRC105 к напряжению на границе раздела фаз, включало воздействие повторных циклов замораживания-оттаивания. Это не только дает информацию о повреждении на границах раздела фаз (подобных границе лед-вода), но и обеспечивает необходимую информацию о том, можно ли замораживать образцы TRC105 для последующего анализа или во время перевозки.

Таблица 9. Содержание мономера, определенное посредством SEC, для композиций TRC105, подвергнутых 0, 3 и 5 циклам F/T

Композиция	Поверхностно-активное вещество	Белок мг/мл	0 циклов	3 цикла	5 циклов
pH 5, 20 mM ацетат	Нет	25	99,86	99,83	99,82
	F68	25	99,84	99,81	99,82
	PS80	25	99,84	99,83	99,80
pH 5, 20 mM ацетат	Нет	50	99,81	99,64	99,80
	F68	50	99,81	99,68	99,81
	PS80	50	99,82	99,65	99,80
pH 5,5, 20 mM His	Нет	25	99,79	99,74	99,72
	F68	25	99,79	99,75	99,73
	PS80	25	99,76	99,74	99,74
pH 5,5, 20 mM His	Нет	50	99,76	99,79	99,75
	F68	50	99,75	99,82	99,73
	PS80	50	99,75	99,79	99,73

Фактически отсутствует изменение содержания мономера при повторном циклическом воздействии F/T (табл. 9). Неожиданно, добавление поверхностно-активного вещества, такого как Pluronic F-68 или полисорбат 80, не изменяло стабильность при повторном циклическом воздействии F/T. Наряду с данными по встряхиванию нет указания, что TRC105 является поверхностно активным в такой степени, что может вызывать проблему повреждения на границе раздела фаз. Таким образом, для жидкой композиции не требуется поверхностно-активное вещество.

#### Краткое изложение

Провели исследования по скринингу композиций на TRC105 при концентрациях белка вплоть до 50 мг/мл. Данный белок является достаточно стабильным, демонстрируя лишь небольшие снижения содержания мономера, определенные посредством SEC, даже после хранения при 40°C в течение четырех недель. Посредством SEC совсем не наблюдали фрагментацию. Тем временем, анализ cIEF продемонстрировал, что наблюдались лишь маленькие изменения общей pI, свидетельствуя о минимальном дезамидировании в рассматриваемом интервале pH (от 4,0 до 5,5). Не было доказательства чувствительности к повреждению на границе раздела фаз, указывая на то, что в жидких композициях TRC105 не требуется поверхностно-активное вещество.

В лучших композициях использовался ацетатный буфер с pH 4,0 или гистидиновый буфер с pH 5,5, наряду с сорбитом или трегалозой в качестве модификатора тоничности и стабилизатора.

Пример 10. Оценка долговременной стабильности композиций TRC105.

Оценку долговременной стабильности проводили для того, чтобы подтвердить результаты исследования 1 и исследования 2. Образцы композиций, представленных в табл. 10, хранили при 5 и 25°C.

Таблица 10. Композиции для подтверждающего исследования

Номер композиции	Композиция	[белок]
F01	pH 5,5, 20 mM гистидин, 240 mM трегалоза	25 мг/мл
F02	pH 5,5, 20 mM гистидин, 240 mM сорбит	25 мг/мл
F03	pH 4,0, 20 mM ацетат, 240 mM сорбит	25 мг/мл
F04	pH 5,5, 20 mM гистидин, 240 mM трегалоза	50 мг/мл
F05	pH 4,0, 20 mM ацетат, 240 mM трегалоза	50 мг/мл
F06	pH 5,5, 20 mM гистидин, 240 mM трегалоза	100 мг/мл
F07	pH 4,0, 20 mM ацетат, 240 mM трегалоза	100 мг/мл

#### Результаты и обсуждение

Семь тестируемых композиций оценивали на протяжении одного года при 5°C и 6 месяцев при 25°C. При 5°C все композиции работали хорошо. По внешнему виду все образцы во все моменты времени в данном исследовании были прозрачными и бесцветными. В общем, значения pH во всех новых ком-

позициях на протяжении всего исследования оставались постоянными (см. табл. 11 и 12). Значения были слегка выше, чем целевые, на 0,1-0,2 единицы, но оставались стабильными. Значения концентрации для новых композиций, определенные с помощью в УФ, оставались постоянными в пределах примерно 3-4% отклонения от исходных намеченных значений, независимо от концентрации (см. табл. 11 и 12). Данные значения значимо не изменялись по ходу исследования. Имела место минимальная потеря мономера, определенная посредством SEC при 5°C (см. табл. 13), и минимальные количества химической деградации, определенные посредством cIEF (см. табл. 15 и 16). В то время как имело место некоторое варьирование результатов ELISA по связыванию CD105, за исключением первоначальных результатов для F05, все значения находились в границах критерия приемлемости от 50 до 150% по сравнению со значением эталонного стандарта, что согласуется с результатами этапа разработки анализа ELISA (см. табл. 17). Результаты тестирования CE-SDS (капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия) показали то, что образцы были сравнимыми с эталонным веществом при 5°C на протяжении одного года (данные не показаны).

В то время как образцы, которые хранили при 5°C, были, по существу, неизменными, параметры композиции имели влияние на стабильность для образцов, которые хранили при 25°C. Примечательнее всего то, что композиции, содержащие систему на основе ацетатного буфера (F03, F05, F07), демонстрировали большие снижения процента мономера, чем композиции, содержащие гистидиновый буфер (F01, F02, F04 и F06) (см. табл. 14). Тем временем, изменения концентрации белка, по-видимому, имеют небольшой эффект или не имеют эффекта. Две композиции с концентрацией 100 мг/мл (F06, F07) являются сравнимыми с их аналогами с концентрацией 50 мг/мл (F04, F05) в показателях их профилей SEC и профилей cIEF.

Таблица 11. pH и концентрации в мг/мл, определенные в УФ, при 5°C

Композиция	Исходные		3 месяца		6 месяцев		12 месяцев	
	pH	конц.	pH	конц.	pH	конц.	pH	конц.
F01	5,6	25	5,6	24	5,6	27	5,6	24
F02	5,6	24	5,5	23	5,6	25	5,6	25
F03	4,2	25	4,2	25	4,3	27	4,2	26
F04	5,6	50	5,6	51	5,6	54	5,5	52
F05	4,2	50	4,3	52	4,3	54	4,2	52
F06	5,6	98	5,7	99	5,7	104	5,6	105
F07	4,3	99	4,4	102	4,4	108	4,3	102

Таблица 12. pH и концентрации в мг/мл, определенные в УФ, при 25°C

Композиция	Исходные		3 месяца		6 месяцев		12 месяцев	
	pH	конц.	pH	конц.	pH	конц.	pH	конц.
F01	н/а	н/а	5,6	25	5,6	27	5,6	26
F02	н/а	н/а	5,6	24	5,6	25	5,6	24
F03	н/а	н/а	4,3	25	4,3	27	4,3	26
F04	н/а	н/а	5,8	50	5,6	53	5,6	51
F05	н/а	н/а	4,3	53	4,3	53	4,3	52
F06	н/а	н/а	5,7	100	5,8	105	5,6	105
F07	н/а	н/а	4,4	109	4,5	104	4,4	103

Таблица 13. Гель-хроматография (SEC) при 5°C

Композиция	% мономера			
	Исходный	3 месяца	6 месяца	12 месяца
F01	99,36	99,36	99,38	99,37
F02	99,37	99,37	99,34	99,37
F03	99,37	99,35	99,31	99,24
F04	99,35	99,33	99,32	99,31
F05	99,38	99,35	99,31	99,24
F06	99,24	99,22	99,19	99,18
F07	99,35	99,29	99,23	99,17

Таблица 14. Гель-хроматография (SEC) при 25°C

Композиция	% мономера		
	Исходный	3 месяца	6 месяцев
F01	99,36	99,27	96,37
F02	99,37	99,28	96,25
F03	99,37	96,02	93,64
F04	99,35	99,18	96,51
F05	99,38	96,07	93,70
F06	99,24	98,99	96,23
F07	99,35	96,02	93,84

Таблица 15. cIEF - средняя pI при 5°C

Композиция	Средняя pI			
	Исходный	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
F01	9,0	8,9	9,0	9,0
F02	8,9	8,9	8,9	9,0
F03	8,9	8,9	9,0	9,1
F04	8,9	8,9	8,9	9,0
F05	8,9	8,9	8,9	9,0
F06	8,9	8,9	8,9	9,0
F07	8,9	8,9	8,9	9,0

Таблица 16. cIEF - средняя pI при 25°C

Композиция	Средняя pI		
	Исходный	3 месяца	6 месяцев
F01	9,0	8,9	9,0
F02	8,9	9,0	8,9
F03	8,9	8,9	8,9
F04	8,9	8,9	8,9
F05	8,9	8,9	8,8
F06	8,9	8,9	8,9
F07	8,9	8,9	8,9

Таблица 17. Связывание CD105, определенное посредством ELISA при 5°C

Композиция	Процент относительной способности связывания CD105		
	Исходное	6 месяцев	12 месяцев
F01	101	94	68
F02	90	90	69
F03	124	Не тестировали	77
F04	123	97	74
F05	179	Не тестировали	96
F06	93	95	115
F07	100	Не тестировали	86

Пример 11. Оценка долговременной стабильности композиции TRC105 в концентрации 4 мг/мл.

Исследования стабильности проводили на TRC105, приготовленном в концентрации 4 мг/мл в 17 мМ фосфатном буфере со 145 мМ хлоридом натрия с рН 7,2 (партия FIN-0536). Доступны данные по стабильности в течение тридцати шести месяцев при рекомендованных условиях хранения (2-8°C), и доступен один месяц данных при ускоренных условиях 25°C/RH (относительная влажность) 60%. Данные по стабильности представлены в таблицах, приведенных ниже. Ни для одного из проведенных тестов не наблюдали значимых изменений. Следовательно, эти исследования показывают, что TRC105, приготовленный в концентрации 4 мг/мл в 17 мМ фосфатном буфере со 145 мМ хлоридом натрия с рН 7,2, является стабильным в течение по меньшей мере 36 месяцев при хранении при 2-8°C.

Таблица 18. Данные по стабильности для TRC105, которое хранили при рекомендованных условиях хранения - 2-8°C

Тест	Исходные	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев
Внешний вид и описание	Прозрачный бесцветный раствор. Минорное количество серых пылеобразных частиц.	Прозрачный бесцветный раствор без наличия видимых частиц.	Прозрачный бесцветный раствор с присутствием минорного количества белых частиц.	Прозрачный бесцветный раствор с присутствием минорного количества белых частиц.
SDS-PAGE, невосстанавливающие условия	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном
SDS-PAGE восстанавливающие условия	98%	96%	97%	98%
IEF	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном
SEC-HPLC	96,62%	96,97 %	96,91 %	96,77 %
Связывание CD105, определенное посредством ELISA	Активность связывания 88% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 110% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 104% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 91% относительно эталонного стандарта
Поглощение УФ(A <sub>280</sub> )	4,3 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл
pH	7,2	7,3	7,2	7,2
Стерильность	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали

Тест	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев	36 месяцев
Внешний вид и описание	Прозрачный бесцветный раствор с небольшим количеством присутствующих белых частиц	Прозрачный бесцветный раствор без присутствия частиц	Прозрачный бесцветный раствор без присутствия частиц	Прозрачный бесцветный раствор без присутствия частиц
SDS-PAGE, невосстанавливающие условия	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном
SDS-PAGE восстанавливающие условия	97%	96%	97%	96%
IEF	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном
SEC-HPLC	96,32%	96,86 %	96,60 %	94,04 %
Связывание CD105, определенное посредством ELISA	Активность связывания 88% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 136% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 88% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 105% относительно эталонного стандарта
Поглощение УФ(A <sub>280</sub> )	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл	4,2 мг/мл
pH	7,2	7,2	7,2	7,3
Стерильность	Не тестировали	Проходит тест	Не тестировали	Проходит тест

Таблица 19. Данные по стабильности для партии FIN-0536, которую хранили в ускоренных условиях - 25°C/RH 60%

Тест	Исходные	1 месяц
Внешний вид и описание	Прозрачный бесцветный раствор. Минорное количество серых пылеобразных частиц.	Прозрачный бесцветный раствор без наличия видимых частиц.
SDS-PAGE, невосстанавливающие условия	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном
SDS-PAGE восстанавливающие условия	98%	96%
IEF	Сравнимо с эталоном	Сравнимо с эталоном
SEC-HPLC	96,62%	96,45%
Связывание определенное посредством ELISA	Активность связывания 88% относительно эталонного стандарта	Активность связывания 91% относительно эталонного стандарта
Поглощение УФ(A <sub>280</sub> )	4,3 мг/мл	4,2 мг/мл
pH	7,2	7,3

Аналитическая методика для SEC-HPLC и УФ является такой же, как описанная в примере 9. Аналитическая методика для ELISA для определения связывания CD105 является такой же, как описанная в примере 3. Аналитические методики для SDS-PAGE при невосстанавливающих условиях, SDS-PAGE при восстанавливающих условиях и IEF описаны ниже.

SDS-PAGE восстановленных белков и пептидов, окрашивание Кумасси.

Идентичность и чистоту оценивают с использованием анализа посредством электрофореза в полиакриламидном геле. Белки разделяют при денатурирующих условиях. Используют готовые 4-12%-ные Bis-Tris гели, содержащие SDS. SDS представляет собой анионный детергент, который взаимодействует с белками с образованием отрицательно заряженных комплексов. Данные комплексы перемещаются через полиакриламидные гели согласно их размеру так, что меньшие белки перемещаются быстрее, чем большие белки. Стандарты, контроли и тестируемые образцы денатурируют и загружают на гель. После завершения разделения гели окрашивают Кумасси синим. Гели сканируют с использованием денситометра изображений.

Относительное количество каждой окрашенной полосы определяют посредством денситометрии для каждой дорожки тестируемого образца. Данные количества выражают в виде процентной доли от общего количества для всех полос, полученного для данной дорожки. Значения молекулярной массы (кДа) полос тестируемых образцов определяют на основе сравнения с маркерами молекулярной массы.

SDS-PAGE восстановленных белков, окрашивание Кумасси.

Способ SDS-PAGE для восстановленных белков является таким же, как описанный в разделе 1.3.2 (выше) для невосстановленных образцов, с добавлением стадии восстановления (для расщепления меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей с высвобождением субъединиц белка, а также других агрегатов). Для восстановления белков к образцам и эталонам добавляют дитиотреитол (50 мМ) перед нагреванием при 85°C в течение пяти минут. При разделении восстановленных белков в буфер для анализа

добавляют антиоксидант.

Горизонтальное изоэлектрическое фокусирование (IEF).

Для разделения белков используют изменяющийся заряд на белках при приложении электрической силы. Устанавливается градиент pH между катодом и анодом, причем катод находится при более высоком значении pH. Поскольку белки имеют амфотерные свойства, они будут обладать положительным значением заряда при значениях pH ниже их pI и отрицательным значением заряда при значениях pH выше их pI. Под влиянием электрической силы устанавливается градиент pH, и белки будут перемещаться и фокусироваться в их изоэлектрической точке. Данная методика включает применение изоэлектрического фокусирования образцов белка с использованием готовых гелей в горизонтальном формате. После электрофореза гели окрашивают Кумасси. Площадь каждой полосы определяют посредством денситометрии для дорожки каждого образца. Площадь полос рассчитывают как процентную долю от площади всех полос. Для каждой полосы также определяют значения pI и Rf.

Пример 12. Клиническое испытание для колоректального рака.

В данном примере описано рандомизированное, слепое, многоцентровое исследование фазы II с контролем в виде плацебо, разработанное для предоставления предварительной оценки безопасности и эффективности антитела против CD105 у пациентов с колоректальным раком. В исследование включают приблизительно от примерно 100 до примерно 800 пациентов, причем от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе лечения, и от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе плацебо. Данное испытание будет заключаться в введении внутривенных повторных доз антитела против CD105 в дозировке от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг или плацебо каждые две недели в течение 6-10 циклов. Во всех группах можно использовать химиотерапию. Во всех группах можно использовать ингибитор VEGF. Временные рамки исследования составляют примерно 6 месяцев - примерно 5 лет с непрерывной терапией для респондеров, как указано в конце исходного исследования. Дополнительными мерами результата являются следующие.

Первичная мера результата: общая частота ответа. Одной целью данного исследования является демонстрация увеличения общей частоты ответа в результате лечения антителом против CD105 по сравнению с контрольным IgG.

Вторичные меры результата, которые можно оценивать, включают продолжительность ответа, время до прогрессирования опухоли, общее выживание, серьезные и несерьезные нежелательные явления. Например, лечение может предупреждать прогрессирование заболевания (т.е. стаз) или может приводить к улучшению. Альтернативно или дополнительно, можно измерять другие целевые показатели в отношении одного или более чем одного из следующего: пониженная опухолевая масса, пониженная неоваскуляризация, ослабленные побочные эффекты, ослабленные вредные реакции и/или улучшенное соблюдение пациентом схемы и режима лечения.

Пример 13. Клиническое испытание для рака почки.

В данном примере описано рандомизированное, слепое, многоцентровое исследование фазы II с контролем в виде плацебо, разработанное для предоставления предварительной оценки безопасности и эффективности антитела против CD105 у пациентов с почечно-клеточным раком (раком почки). В исследование включают приблизительно от примерно 100 до примерно 800 пациентов, причем от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе лечения, и от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе плацебо. Данное испытание будет заключаться в введении внутривенных повторных доз антитела против CD105 в дозировке от примерно 0,1 до примерно 30 мг/кг или плацебо каждые одну-три недели в течение 3-6 циклов или пока происходит прогрессирование. В обеих группах обработки также можно использовать интерферон. В обеих группах обработки можно использовать ингибитор VEGF. Временные рамки исследования составляют примерно 6 месяцев - примерно 5 лет с непрерывной терапией для респондеров, как указано в конце исходного исследования. Дополнительными мерами результата являются следующие.

Первичная мера результата: выживаемость без прогрессирования заболевания. Одной целью исследования является демонстрация увеличения выживаемости без прогрессирования заболевания после обработки антителом против CD105 по сравнению с плацебо.

Вторичные меры результата, которые можно оценивать, включают продолжительность ответа, время до прогрессирования опухоли, общее выживание, серьезные и несерьезные нежелательные явления. Например, лечение может предупреждать прогрессирование заболевания (т.е. стаз) или может приводить к улучшению. Альтернативно или дополнительно, можно измерять другие целевые показатели в отношении одного или более чем одного из следующего: пониженная опухолевая масса, пониженная неоваскуляризация, ослабленные побочные эффекты, ослабленные вредные реакции и/или улучшенное соблюдение пациентом схемы и режима лечения.

Пример 14. Клиническое испытание для печеночно-клеточного рака.

В данном примере описано рандомизированное, слепое, многоцентровое исследование фазы II с контролем в виде плацебо, разработанное для предоставления предварительной оценки безопасности и эффективности антитела против CD105 у пациентов с печеночно-клеточным раком (раком печени). В исследование включают приблизительно от примерно 100 до примерно 800 пациентов, причем от при-

мерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе лечения, и от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе плацебо. В обеих группах можно использовать ингибитор VEGF. Данное испытание будет заключаться в введении внутривенных повторных доз антитела против CD105 в дозировке от примерно 0,1 до примерно 30 мг/кг или плацебо каждые одну-три недели или пока происходит прогрессирование. Временные рамки исследования составляют примерно 6 месяцев - примерно 5 лет с непрерывной терапией для респондеров, как указано в конце исходного исследования. Дополнительными мерами результата являются следующие.

Первичные меры результата: выживаемость без прогрессирования заболевания. Одной целью исследования является демонстрация увеличения выживаемости без прогрессирования заболевания после обработки антителом против CD105 по сравнению с плацебо.

Вторичные меры результата, которые можно оценивать, включают продолжительность ответа, время до прогрессирования опухоли, общее выживание, серьезные и несерьезные нежелательные явления. Например, лечение может предупреждать прогрессирование заболевания (т.е. стаз) или может приводить к улучшению. Альтернативно или дополнительно, можно измерять другие целевые показатели в отношении одного или более чем одного из следующего: пониженная опухолевая масса, пониженная неоваскуляризация, ослабленные побочные эффекты, ослабленные вредные реакции и/или улучшенное соблюдение пациентом схемы и режима лечения.

Пример 15. Клиническое испытание для рака яичника.

В данном примере описано рандомизированное, слепое, многоцентровое исследование фазы II с контролем в виде плацебо, разработанное для предоставления предварительной оценки безопасности и эффективности антитела против CD105 у пациентов с раком яичника. В исследование включают приблизительно от примерно 100 до примерно 800 пациентов, причем от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе лечения, и от примерно 50 до примерно 400 пациентов относят к группе плацебо. Данное испытание будет заключаться в введении внутривенных повторных доз антитела против CD105 в дозировке от примерно 0,1 до примерно 30 мг/кг или плацебо каждые одну-три недели в течение 5 циклов. В обеих группах обработки также можно использовать химиотерапию. В обеих группах обработки можно использовать ингибитор VEGF. Временные рамки исследования составляют примерно 6 месяцев - примерно 5 лет с непрерывной терапией для респондеров, как указано в конце исходного исследования. Дополнительными мерами результата являются следующие.

Первичная мера результата: выживаемость без прогрессирования заболевания. Одной целью исследования является демонстрация увеличения выживаемости без прогрессирования заболевания после обработки антителом против CD105 по сравнению с плацебо.

Вторичные меры результата, которые можно оценивать, включают продолжительность ответа, время до прогрессирования опухоли, общее выживание, серьезные и несерьезные нежелательные явления. Например, лечение может предупреждать прогрессирование заболевания (т.е. стаз) или может приводить к улучшению. Альтернативно или дополнительно, можно измерять другие целевые показатели в отношении одного или более чем одного из следующего: пониженная опухолевая масса, пониженная неоваскуляризация, ослабленные побочные эффекты, ослабленные вредные реакции и/или улучшенное соблюдение пациентом схемы и режима лечения.

Пример 16. Лечение возрастной дегенерации желтого пятна.

Первое исследование.

Пациентов, демонстрирующих возрастную дегенерацию желтого пятна, лечат интравитреальной инъекцией антитела против CD105 или контрольного антитела для уменьшения или предупреждения развития неоваскуляризации, макулярного заболевания и повреждения сетчатки.

В качестве первой стадии лечения пациенты должны получать полное офтальмологическое обследование для установления исходного уровня состояния здоровья глаз. Офтальмологическое обследование включает непрямую офтальмоскопию, биомикроскопию посредством щелевой лампы, обследование периферической части сетчатки, измерения внутриглазного давления, симптоматику остроты зрения (без вспомогательных средств и с наилучшей коррекцией), фотографию глазного дна, ангиографию с флуоресцеином, оптическую когерентную томографию, электроретинографию и измерения в режиме А.

После предварительного обследования в пораженный глаз пациента, демонстрирующего AMD, осуществляли интравитреальную инъекцию, как описано выше. При поражении обоих глаз их можно лечить раздельно. В глаз, подлежащий лечению, инъецируют офтальмологический раствор.

После лечения глаза пациента следует обследовать в сутки один (1), два (2), семь (7), пятнадцать (15), тридцать (30) и шестьдесят (60) и затем каждый месяц в течение 2 лет. Из-за возможности рецидива пациенты должны затем возвращаться для периодических обследований на ежемесячной основе. В каждые сутки обследования у пациента отслеживают разжижение стекловидного тела. Кроме того, у пациентов отслеживают заднее отслоение стекловидного тела с использованием не прямой офтальмоскопии с использованием депрессии склеры. Наконец, непрерывно отслеживают степень AMD, демонстрируемой пациентами, посредством периодических обследований сетчатки, оптической когерентной томографии и ангиограмм с флуоресцеином для отслеживания присутствия жидкости под сетчаткой, крови, экссудатов, отслойки RPE, кистозных изменений сетчатки или присутствия серовато-зеленой субретинальной неова-

скулярной мембраны. Дополнительные лечения могут потребоваться при наблюдении признаков повторно происходящей неоваскуляризации. Дополнительные лечения можно давать на еженедельной или ежемесячной основе. В предпочтительном воплощении после исходного лечения следуют последующие лечения, разделенные интервалом 1-6 месяцев.

Второе исследование.

Цель: продемонстрировать эффективность интравитреальных антител против CD105 для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна (AMD). У всех пациентов можно использовать ингибитор VEGF.

Способы: от 50 до 500 пациентов (от 50 до 500 глаз) с субфовеальной хориоидальной неоваскуляризацией (CNV), возникающей в результате AMD, будут участвовать в исследовании в одобренном месте.

Критериями для повторной инъекции является присутствие жидкости в желтом пятне, увеличенная толщина центральной области сетчатки (CRT) по меньшей мере на 100 мкм, снижение остроты зрения по меньшей мере на 5 букв, ассоциированная с увеличением количества жидкости в желтом пятне, новая классическая CNV или новое кровоизлияние в желтом пятне. Главной мерой результата является доля глаз со снижением остроты зрения меньше чем 15 букв через 12 месяцев. Измерение остроты зрения с наилучшей коррекцией и клиническое исследование глаз проводят в неделю 1, месяц 1 и затем ежемесячно в течение 5-12 месяцев.

Среднюю остроту зрения и среднюю CRT измеряют в сравнении с исходным уровнем. Отмечают глазные и/или системные побочные эффекты.

Пример 17. Последовательности гуманизированных-деиммунизированных антител.

Выделенное гуманизированное деиммунизированное антитело против CD105 может содержать вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 12.

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

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

Другие неограничивающие примеры гуманизированных-деиммунизированных тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16, но не ограничиваются ими.

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

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

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

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

**SEQ ID NO: 16:** Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val  
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala  
Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu  
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg  
Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Другие неограничивающие примеры гуманизованных-деиммунизованных легких цепей вклю-  
чают SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23, но не ограничиваются ими.

**SEQ ID NO: 17:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

**SEQ ID NO: 18:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

**SEQ ID NO: 19:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

**SEQ ID NO: 20:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

**SEQ ID NO: 21:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

**SEQ ID NO: 22:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

**SEQ ID NO: 23:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
Ile Lys

Аспекты описанных здесь воплощений могут быть реализованы в других формах или осуществле-  
ны другими способами без отступления от их сущности или существенных характеристик. Настоящее  
описание, следовательно, во всех аспектах следует рассматривать как иллюстративное и не ограничи-  
вающее, и подразумевается, что в нем охвачены все изменения, которые попадают в пределы значения и  
интервала эквивалентности.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ТРАКОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.

<120> КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 35882-714.601

<140>

<141>

<150> 61/697,111

<151> 2012-09-05

<160> 23

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 1

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 2

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

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

## 029214

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 3

<211> 118

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 4

<211> 330

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 4

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

## 029214

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn



<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 8

Asp Ala Trp Met Asp  
1 5

<210> 9

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 9

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

Val Lys Gly

<210> 10

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 10

Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser  
1 5

<210> 11

<211> 118

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 11

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

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

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



## 029214

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 13

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 14

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

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

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

Gly Glu Ile Arg Ser Gln Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu



&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 16

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 17

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

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

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

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

## 029214

50

55

60

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

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

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

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 18

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

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

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 19

029214

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептид

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 21

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

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

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 22

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, содержащая от примерно 1 до примерно 100 мг/мл антитела против CD105, вплоть до примерно 100 мМ буферизующего агента, вплоть до примерно 1М полиола, и имеющая рН от примерно 4,0 до примерно 5,5.

2. Композиция по п.1, в которой указанный буферизующий агент представляет собой гистидин.

3. Композиция по п.1, в которой буферизующий агент представляет собой ацетат и рН составляет примерно 4.

4. Композиция по п.1, в которой буферизующий агент представляет собой гистидин и рН состав-

ляют примерно 5,5.

5. Композиция по п.1, в которой указанное антитело против CD105 содержит переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, константную область легкой цепи ( $C_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 3, и константную область ( $C_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4.

6. Композиция по п.1, в которой указанное антитело против CD105 содержит CDR1 (определяющая комплементарность область 1)  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 5, CDR2  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 6, CDR3  $V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 7, CDR1  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 8, CDR2  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 9, и CDR3  $V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 10.

7. Композиция по п.1, содержащая примерно 25, примерно 50 или примерно 100 мг/мл антитела против CD105.

8. Композиция по п.1, в которой указанный забуферивающий агент представляет собой гистидин или ацетат.

9. Композиция по п.8, содержащая примерно 20 мМ гистидин или ацетат.

10. Композиция по п.1, изготовленная в форме для интравитреального или внутривенного введения.

11. Композиция по п.1, дополнительно содержащая приемлемый носитель или эксципиент.

12. Композиция по п.11, в которой указанный носитель или эксципиент представляет собой фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

13. Композиция по п.1, которая является изотоничной или гипертоничной.

14. Композиция по п.1, где количество полиола меньше чем 300 мМ и данная композиция сделана изотоничной с использованием соли.

15. Композиция по п.1, в которой полиол представляет собой сахар.

16. Композиция по п.15, в которой указанный сахар представляет собой невосстанавливающий сахар.

17. Композиция по п.16, в которой невосстанавливающий сахар представляет собой трегалозу или сахарозу.

18. Композиция по п.15, в которой сахар представляет собой сорбит.

19. Композиция по п.1, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество.

20. Композиция по п.19, в которой поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 80 или Pluronic® F68.

21. Композиция по п.1, где заболевание, связанное с ангиогенезом, представляет собой рак, в том числе метастазирующий.

22. Композиция по п.21, где рак представляет собой солидную опухоль.

23. Композиция по п.21, где рак имеет эпителиальное происхождение.

24. Композиция по п.21, где рак представляет собой рак легкого, меланому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак матки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, саркому, миелому, рак мозга или лимфому.

25. Композиция по п.1, где указанное заболевание, связанное с ангиогенезом, представляет собой офтальмологическое состояние.

26. Композиция по п.25, где офтальмологическое состояние представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию или хориоидальную неоваскуляризацию.

27. Композиция по п.26, где указанная возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) представляет собой влажную AMD или сухую AMD.

28. Предварительно заполненный шприц, подходящий для внутривенного введения, содержащий композицию по любому из пп.1-27.

29. Предварительно заполненный шприц, подходящий для интравитреального введения, содержащий композицию по любому из пп.1-27, где композиция содержит примерно 25 или примерно 50 мг/мл анти-CD105 антитела.

30. Применение композиции по любому из пп.1-27 в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом.

31. Применение по п.30, где заболевание, связанное с ангиогенезом, представляет собой рак, в том числе метастазирующий.

32. Применение по п.31, где рак представляет собой солидную опухоль.

33. Применение по п.31, где рак имеет эпителиальное происхождение.

34. Применение по п.31, где рак представляет собой рак легкого, меланому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак матки, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, саркому, миелому, рак мозга или лимфому.

35. Применение по п.30, где указанное заболевание, связанное с ангиогенезом, представляет собой офтальмологическое состояние.

36. Применение по п.35, где офтальмологическое состояние представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию или хороидальную неоваскуляризацию.

37. Применение по п.36, где указанная возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) представляет собой влажную AMD или сухую AMD.

**A. V<sub>L</sub> TRC105: CDR подчеркнуты**

QIVLSQSPAILASASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVVPRFS  
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 1)

**Б. C<sub>L</sub> TRC105:**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

**В. V<sub>H</sub> TRC105: CDR подчеркнуты**

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKASNHATYY  
AESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTRWRRFFDSWGQTTLTVSS

(SEQ ID NO: 3)

**Г. C<sub>γ1</sub> TRC105**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL  
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

**Д.** CDR1 VL: RASSSVSYM (SEQ ID NO: 5)

**Е.** CDR2 VL: ATSNLAS (SEQ ID NO: 6)

**Ж.** CDR3 VL: QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 7)

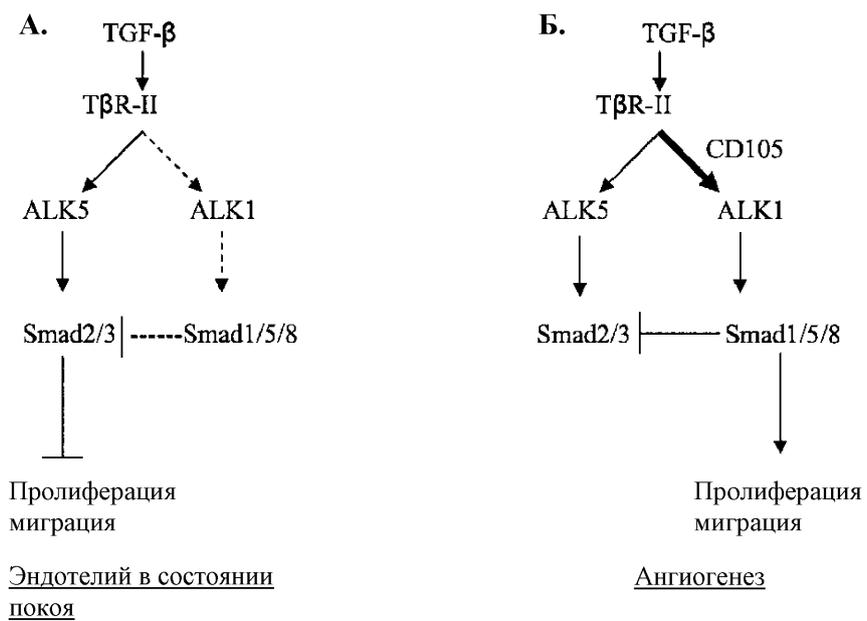
**З.** CDR1 VH: DAWMD (SEQ ID NO: 8)

**И.** CDR2 VH: EIRSKASNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 9)

**Й.** CDR3 VH: WRRFFDS (SEQ ID NO: 10)

Фиг. 1

Модель регуляции ангиогенеза посредством CD105 (эндоглин)



Фиг. 2

