



(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61K 35/00* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2008132146/10, 04.01.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.01.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

05.01.2006 US 60/756,889**20.01.2006 US 60/760,892**(43) Дата публикации заявки: **10.02.2010** Бюл. № 4(45) Опубликовано: **10.05.2012** Бюл. № 13(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **WO/2004/024773, 25.03.2004.**

WO/2005/090406, 29.09.2005. WO/1995/002706, 26.01.1995. BENNETT BD, ET AL. Cloning and characterization of HTK, a novel transmembrane tyrosine kinase of the EPH subfamily. J Biol Chem. 1994 May 13; 269(19): 14211-14218, реферат. TAKAI N, ET AL. Expression of receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 is (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **05.08.2008**(86) Заявка РСТ:
US 2007/060115 (04.01.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/130697 (15.11.2007)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

ВУ Ян (US),**ЯНЬ Минхонг (US)**

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ EphV4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии и представляет собой варианты антител против EphV4. Также представлены полинуклеотид, кодирующий антитело, экспрессионный вектор, клетка-хозяин, композиции, содержащие антитело, способы

получения антитела, способ обнаружения EphV4, способ диагностики нарушения, ассоциированного с экспрессией EphV4, а также применение антитела для приготовления лекарственного средства. Изобретение может эффективно использоваться для диагностики и лечения

Клон, №	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
30.35	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.1D2	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D8	G	F	S	I	S	N	Y	Y	L	H
30.35.2D12	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D13	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H

Клон, №	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
30.35	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.1D2	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D8	G	G	I	Y	L	Y	G	S	S	S	E	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D12	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	R	G	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D13	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G

Клон, №	H3																
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102
30.35	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.1D2	A	R	S	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D8	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D12	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D13	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y

Клон, №	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
30.35	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.1D2	R	A	S	Q	D	S	E	I	F	L	A
30.35.2D8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.2D12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.2D13	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

Клон, №	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
30.35	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.1D2	S	A	S	N	L	E	S
30.35.2D8	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D12	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D13	S	A	S	F	L	Y	S

Клон, №	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
30.35	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
30.35.1D2	Q	Q	S	N	A	V	P	L	T
30.35.2D8	Q	E	S	T	T	T	P	P	T
30.35.2D12	Q	K	S	E	T	I	P	P	S
30.35.2D13	Q	Q	T	A	Q	T	P	E	T

Фиг. 1

(56) (продолжение):

associated with malignant potential in endometrial cancer. Oncol Rep. 2001 May-Jun; 8(3): 567-573, реферат.
РОЙТ А. Иммунология. - М.: Мир, 2000, с.97-113.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61K 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008132146/10, 04.01.2007**(24) Effective date for property rights:
04.01.2007

Priority:

(30) Convention priority:

05.01.2006 US 60/756,889**20.01.2006 US 60/760,892**(43) Application published: **10.02.2010 Bull. 4**(45) Date of publication: **10.05.2012 Bull. 13**(85) Commencement of national phase: **05.08.2008**

(86) PCT application:

US 2007/060115 (04.01.2007)

(87) PCT publication:

WO 2007/130697 (15.11.2007)

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

VU Jan (US),**JaN' Minkhong (US)**

(73) Proprietor(s):

DZhENEN TEK, INK. (US)**(54) ANTI-EphB4 ANTIBODIES AND METHODS OF USING SAID ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention discloses a polynucleotide encoding the antibody, an expression vector, a host cell, compositions containing the antibody, methods of producing the antibody, a method of detecting EphB4, a method of diagnosing disorders associated with EphB4 expression, as well as use of the antibody to produce a drug.

EFFECT: invention can be effectively used to diagnose and treat diseases associated with EphB4 expression.

36 cl, 8 dwg, 3 tbl, 3 ex

RU 2450020 C2

RU 2450020 C2

Клон, №	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
30.35	G	F	T	I	S	G	V	Y	I	H
30.35.1D2	G	F	T	I	S	G	V	Y	I	H
30.35.2D8	G	F	S	I	S	N	Y	Y	I	H
30.35.2D12	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D13	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H

Клон, №	H2														
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
30.35	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S
30.35.1D2	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S
30.35.2D8	G	G	I	Y	L	Y	G	S	S	S	E	Y	A	D	S
30.35.2D12	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	R	G	Y	A	D	S
30.35.2D13	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S

Клон, №	H3											
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D
30.35	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D
30.35.1D2	A	R	S	S	G	L	R	L	G	G	L	D
30.35.2D8	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D
30.35.2D12	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D
30.35.2D13	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D

Клон, №	L1							
	24	25	26	27	28	29	30	31
30.35	R	A	S	Q	D	V	S	T
30.35.1D2	R	A	S	Q	D	S	E	I
30.35.2D8	R	A	S	Q	D	V	S	T
30.35.2D12	R	A	S	Q	D	V	S	T
30.35.2D13	R	A	S	Q	D	V	S	T

Клон, №	L2					
	50	51	52	53	54	55
30.35	S	A	S	F	L	Y
30.35.1D2	S	A	S	N	L	E
30.35.2D8	S	A	S	F	L	Y
30.35.2D12	S	A	S	F	L	Y
30.35.2D13	S	A	S	F	L	Y

Клон, №	L3						
	89	90	91	92	93	94	95
30.35	Q	Q	S	Y	T	T	P
30.35.1D2	Q	Q	S	N	A	V	P
30.35.2D8	Q	E	S	T	T	T	P
30.35.2D12	Q	K	S	E	T	I	P
30.35.2D13	Q	Q	T	A	Q	T	P

Фиг. 1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка испрашивает приоритет согласно § 119 раздела 35 свода законов США предварительной заявки на патент США № 60/756889, поданной 5 января 2006 г., и предварительной заявки на патент США № 60/760892, поданной 20 января 2006 г.,
5 полное содержание которых таким образом включено посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится в основном к областям молекулярной биологии. Более конкретно настоящее изобретение касается антител против EphB4 и их
10 применения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для многих физиологических и патологических процессов фундаментальным требованием является развитие обеспечения сосудами. Для активно растущих тканей, таких как эмбрионы и опухоли, требуется адекватное обеспечение кровью. Они
15 удовлетворяют эту потребность с помощью продуцирования проангиогенных факторов, которые усиливают образование новых кровеносных сосудов через процесс, называемый ангиогенезом. Образование сосудистых трубок является сложным, но организованным биологическим событием, в которое вовлечены все или многие из
20 следующих стадий: а) эндотелиальные клетки (ЕС) пролиферируют из существующих ЕС или дифференцируются из клеток-предшественников; б) ЕС мигрируют и соединяются с образованием структур, подобных тяжам; с) сосудистые тяжи затем подвергаются процессу развития трубок с образованием сосудов с центральным просветом; д) от существующих тяжей или сосудов отходят отростки с образованием
25 вторичных сосудов; е) недифференцированное сосудистое сплетение подвергается далее реконструкции и восстановлению формы; и ф) периендотелиальные клетки привлекаются к обшивке эндотелиальных трубок, что обеспечивает поддержание и модулируемые функции сосудов; причем такие клетки включают перициты для
30 небольших капилляров, гладкомышечные клетки для более больших сосудов и миокардиальные клетки в сердце (Hanahan, Science 277: 48-50 (1997); Hogan & Kolodziej, Nat. Rev. Genet. 3: 513-23 (2002); Lubarsky & Krasnow, Cell 112: 19-28 (2003)).

В настоящее время уже хорошо известно, что ангиогенез вовлечен в патогенез ряда нарушений. Они включают солидные опухоли и метастаз, атеросклероз,
35 ретролентальную фиброплазию, гемангиомы, хроническое воспаление, внутриглазные неоваскулярные поражения, такие как пролиферативные ретинопатии, например диабетическая ретинопатия, связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD), неоваскулярная глаукома, иммунное отторжение трансплантированной ткани
40 роговицы и других тканей, ревматоидный артрит и псориаз (Folkman et al., J. Biol. Chem. 267: 10931-34 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39 (1991); и Garner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710).

В случае роста опухолей ангиогенез, по-видимому, является решающим для
45 перехода от гиперплазии к неоплазии и для обеспечения питания для роста и метастазирования опухоли (Folkman et al., Nature 339: 58 (1989)). Неоваскуляризация позволяет опухолевым клеткам приобретать преимущества роста и автономность пролиферации по сравнению с нормальными клетками. Опухоль обычно начинается в
50 виде одной аберрантной клетки, которая может пролиферировать только до размера нескольких кубических миллиметров благодаря удаленности от имеющихся капиллярных русел, и она может оставаться «скрытой» без дальнейшего роста и распространения в течение длительного периода времени. Некоторые опухолевые

клетки затем переключаются на ангиогенный фенотип с активацией эндотелиальных клеток, которые пролиферируют и созревают в новые капиллярные кровеносные сосуды. Эти вновь образованные кровеносные сосуды не только делают возможным непрерывный рост первичной опухоли, но также распространение и реколонизацию метастатических опухолевых клеток. Соответственно, наблюдалась корреляция между плотностью микрососудов в отделах опухолей и выживанием пациента при раке молочной железы, а также при некоторых других опухолях (Weidner et al., *N. Engl. J. Med.* 324 1-6 (1991); Horak et al., *Lancet* 340: 1120-24 (1992); Macchiarini et al., *Lancet* 340: 145-46 (1992)). Точные механизмы, контролирующие ангиогенное переключение, недостаточно поняты, но полагают, что образование новых сосудов в массе опухоли является результатом сальдо множества ангиогенных стимуляторов и ингибиторов (Folkman, *Nat. Med.* 1(1): 27-31 (1995)).

Процесс развития сосудов плотно регулируется. На сегодняшний день продемонстрировано, что значительное число молекул, главным образом секретируемые факторы, продуцируемые окружающими клетками, регулируют дифференциацию, пролиферацию, миграцию и соединение в структуры, подобные тням, ЕС. Например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) был идентифицирован в качестве основного фактора, вовлеченного в стимуляцию развития кровеносных сосудов и индукцию проницаемости сосудов (Ferrara et al., *Endocr. Rev.* 18: 4-25 (1997)). Обнаружение, что утрата даже одной аллели VEGF приводит к летальности эмбриона, указывает на незаменимую роль, которую этот фактор играет в развитии и дифференциации сосудистой системы. Более того, показано, что VEGF является основным медиатором образования новых сосудов, связанного с опухолями и внутриглазными поражениями (Ferrara et al., *Endocr. Rev.*, см. выше). мРНК VEGF сверхэкспрессируется в большинстве проверенных опухолей человека (Berkman et al., *J. Clin. Invest.* 91: 153-59 (1993); Brown et al., *Human Pathol.* 26: 86-91 (1995); Brown et al., *Cancer Res.* 53: 4727-35 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer* 73: 931-34 (1996); Dvorak et al., *Am. J. Pathol.* 146: 1029-39 (1995)).

Также уровни концентраций VEGF в глазных жидкостях сильно коррелируют с наличием активной пролиферации кровеносных сосудов у больных диабетической и другими связанными с ишемией ретинопатиями (Aiello et al., *N. Engl. J. Med.* 331: 1480-87 (1994)). Кроме того, в исследованиях продемонстрировано местоположение VEGF в оболочках новых сосудов в сосудистой оболочке глаза у пациентов, пораженных AMD (Lopez et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 855-68 (1996)).

Нейтрализующие антитела против VEGF подавляют рост множества линий опухолевых клеток человека у бестимусных мышей (Kim et al., *Nature* 362: 841-44 (1993); Warren et al., *J. Clin. Invest.* 95: 1789-97 (1995); Borgstrom et al., *Cancer Res.* 56: 4032-39 (1996); Melnyk et al., *Cancer Res.* 56: 921-24 (1996)), а также ингибируют развитие кровеносных сосудов внутри глаза в моделях ишемических ретинальных нарушений (Adamis et al., *Arch. Ophthalmol.* 114: 66-71 (1996)). Следовательно, моноклональные антитела против VEGF или другие ингибиторы действия VEGF являются многообещающими кандидатами для лечения опухолей и различных внутриглазных неоваскулярных поражений. Такие антитела описаны, например, в EP 817648, опубликованном 14 января 1998 г., и в заявках WO 98/45331 и WO 98/45332, обе из которых опубликованы 15 октября 1998 г. Одно из антител против VEGF, бевацизумаб, разрешено Управлением по контролю за продуктами и медикаментами для использования в комбинации с химиотерапевтической программой для лечения метастатического рака ободочной и прямой кишки (CRC). Бевацизумаб исследуется во

многих проводящихся клинических испытаниях для лечения различных признаков рака.

Рецептор EphB4 ("EphB4" или "EphB4R") является членом семейства рецепторов eph, которое является самым большим семейством тирозинкиназных рецепторов в геноме человека (обзор приведен Dodelet, Oncogene 19: 5614-5619, 2000). Тирозинкиназы рецепторов eph человека распределяют по идентичности последовательностей на класс А и класс В с соответствующими лигандами А-типа и В-типа, на которые приводятся ссылки в виде эфринов. Передача сигнала может происходить в прямом направлении, когда тирозинкиназа рецептора активируется с помощью лиганда, и в обратном направлении, когда лиганды трансмембранных эфринов-В активируются при взаимодействии с рецепторами. Взаимодействия лиганд - рецептор Eph вовлечены в широкий ряд биологических функций, включающих направление аксонов, образование границ тканей, образование и развитие сосудов и подвижность клеток (Kullander et al. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3: 475-486, 2002; Cheng et al. Cytokine Growth Factor Rev., 13: 75-85, 2002; Coulthand et al. Int. J. Dev. Biol., 46: 375-384, 2004). EphB4 связывает лиганды, такие как эфрин-В1, эфрин-В2 и эфрин-В3. Рецептор EphB4 имеет экстраклеточный район с богатым цистеином мотивом, тянущийся через его аминоконцевую половину, за которым следуют два мотива фибронектина типа II. Существуют внутриклеточный домен, имеющий признаки консервативного киназного района, и трансмембранный домен.

Ясно, что продолжает существовать потребность в агентах, имеющих клинические признаки, которые являются оптимальными для разработки терапевтических агентов. Описанное здесь изобретение удовлетворяет эту потребность и обеспечивает другие преимущества.

Все приведенные здесь ссылки, в том числе заявки на патенты и публикации, полностью включены посредством ссылки.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение отчасти основано на идентификации множества связывающих EphB4 агентов (таких как иммуноконъюгаты, антитела и их фрагменты). EphB4 представляет важную и полезную терапевтическую мишень, и настоящим изобретением обеспечиваются композиции и способы, основанные на связывании EphB4. Связывающие EphB4 агенты настоящего изобретения, описанные здесь, обеспечивают важные терапевтические и диагностические агенты, используемые в нацеливании на патологические состояния, ассоциируемые с экспрессией и/или активностью путей EphB4 - лиганд EphB4. Соответственно, настоящим изобретением обеспечиваются способы, композиции, наборы и изделия производства, связанные со связыванием EphB4.

Настоящим изобретением обеспечиваются антитела, которые связываются (например, специфически связываются) с EphB4.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело против EphB4, причем полноразмерная IgG-форма антитела специфически связывает EphB4 человека с аффинностью связывания, составляющей 50 пМ или меньше. Как хорошо установлено в данной области, аффинность связывания лиганда с его рецептором можно определить, используя какой-либо из множества анализов, и выразить в терминах множества количественных величин. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения аффинность связывания выражается в виде величин Kd и отражает присущую аффинность связывания (например, с минимизированными эффектами авидности). Как правило и предпочтительно,

аффинность связывания измеряют *in vitro*, или в бесклеточной, или в связанной с клетками установке. Для измерения аффинности связывания можно использовать любое число анализов, известных в данной области, в том числе тех, которые здесь описаны, включающих, например, *Biacore*, радиоиммуноанализы (RIA) и ELISA

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело, которое связывается с лигандсвязывающим районом EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выделенное антитело связывается с полипептидом, включающим, состоящим и по существу состоящим из экстраклеточного домена EphB4.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело против EphB4, которое конкурирует с лигандом EphB4 за связывание EphB4.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело против EphB4, которое ингибирует, уменьшает и/или блокирует активность EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибируется, уменьшается и/или блокируется аутофосфорилирование EphB4.

В одном аспекте антитело против EphB4 настоящего изобретения включает

(а) по крайней мере одну, две, три, четыре или пять последовательностей гипервариабельных участков (HVR), выбираемых из группы, состоящей из

(i) HVR-L1, включающего последовательность A1-A11, где A1-A11 представляет собой RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 9),

(ii) HVR-L2, включающего последовательность B1-B7, где B1-B7 представляет собой SASFLYS (SEQ ID NO: 11),

(iii) HVR-L3, включающего последовательность C1-C9, где C1-C9 представляет собой QESTTTPPT (SEQ ID NO: 15),

(iv) HVR-H1, включающего последовательность D1-D10, где D1-D10 представляет собой GFSISNYYLH (SEQ ID NO: 2),

(v) HVR-H2, включающего последовательность E1-E18, где E1-E18 представляет собой GGIYLYGSSEYADSVKG (SEQ ID NO: 4), и

(vi) HVR-H3, включающего последовательность F1-F17, где F1-F17 представляет собой ARGSGRLGGLDYAMDY (SEQ ID NO: 7), и

(b) по крайней мере один вариант HVR, где последовательность варианта HVR включает модификацию по крайней мере одного остатка последовательности, изображенной в SEQ ID NO: 1-17.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее один, два, три, четыре, пять или шесть HVR, причем каждый HVR включает, состоит или по существу состоит из последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, и где SEQ ID NO: 9 или 10 соответствуют HVR-L1, SEQ ID NO: 11 или 12 соответствуют HVR-L2, SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16 или 17 соответствуют HVR-L3, SEQ ID NO: 1 или 2 соответствуют HVR-H1, SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6 соответствуют HVR-H2 и SEQ ID NO: 7 или 8 соответствуют HVR-H3.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем каждый по порядку включает SEQ ID NO: 9, 11, 13, 1, 3, 7.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем каждый по порядку включает SEQ ID NO: 10, 12, 14, 1, 3, 8.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего

изобретения включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем каждый по порядку включает SEQ ID NO: 9, 11, 15, 2, 4, 7.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем
5 каждый по порядку включает SEQ ID NO: 9, 11, 16, 1, 5, 7.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем каждый по порядку включает SEQ ID NO: 9, 11, 17, 1, 6, 7.

10 Варианты HVR в антителе настоящего изобретения могут иметь модификации одного или нескольких (например, двух, трех, четырех, пяти или более) остатков в пределах HVR.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант HVR-L1 включает 1-5 (1, 2, 3, 4 или 5) замен в любой комбинации следующих положений: A6 (V
15 или S), A7 (S или E), A8 (T или I), A9 (A или F) и A10 (V или L).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант HVR-L2 включает 1-2 (1 или 2) замен в любой комбинации следующих положений: B4 (F или N)
и B6 (Y или E).

20 В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант HVR-L3 включает 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) замен в любой комбинации следующих положений: C2 (Q, E или K), C3 (S или T), C4 (Y, N, T, E или A), C5 (T, A или Q), C6 (T, V или I), C8 (P, L или E) и C9 (T или S).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант HVR-H1
25 включает 1-3 (1, 2 или 3) замен в любой комбинации следующих положений: D3 (T или S), D6 (G или N) и D9 (I или L).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант HVR-H2 включает 1-5 (1, 2, 3, 4 или 5) замен в любой комбинации следующих положений: E5 (P
30 или L), E7 (S или G), E8 (G или S), E10 (T, S или R) и E11 (D, E или G).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант HVR-H3 включает 1 замену в следующем положении: F3 (G или S). Буква(ы) в скобках после
каждого положения указывает иллюстративное замещение (т.е. замену)
аминокислоты; как очевидно для квалифицированного в данной области специалиста,
35 пригодность других аминокислот в качестве аминокислот-замещений в описанном
здесь контексте может быть рутинным образом определена с использованием
методов, хорошо известных в данной области и/или описанных здесь.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее
40 участок HVR-H1, включающий последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. В одном
аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее участок HVR-
H2, включающий последовательность SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6. В одном аспекте
настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее участок HVR-H3,
включающий последовательность SEQ ID NO: 7 или 8. В одном варианте
45 осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее
участок HVR-L1, включающий последовательность SEQ ID NO: 9 или 10. В одном
варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело,
включающее участок HVR-L2, включающий последовательность SEQ ID NO: 11
или 12. В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается
50 антитело, включающее участок HVR-L3, включающий последовательность SEQ ID NO:
13, 14, 15, 16 или 17.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее

по крайней мере одну, по крайней мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность HVR-H1, включающую последовательности SEQ ID NO: 2;
- (ii) последовательность HVR-H2, включающую последовательности SEQ ID NO: 4;
- (iii) последовательность HVR-H3, включающую последовательности SEQ ID NO: 7.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, включающее по крайней мере одну, по крайней мере две или все три из следующих последовательностей:

- (i) последовательность HVR-L1, включающую последовательности SEQ ID NO: 9;
- (ii) последовательность HVR-L2, включающую последовательности SEQ ID NO: 11;
- (iii) последовательность HVR-L3, включающую последовательности SEQ ID NO: 15.

Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-17 пронумерованы относительно отдельных HVR (т.е. H1, H2 или H3), как указано на фиг. 1, при этом нумерация согласуется с системой нумерации по Kabat, как описано ниже.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются антитела, включающие последовательности HVR тяжелой цепи, как изображено на фиг. 1.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются антитела, включающие последовательности HVR легкой цепи, как изображено на фиг. 1.

Некоторые варианты антител настоящего изобретения включают вариабельную область легкой цепи гуманизированного антитела 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, США) (на которое также ссылаются в патенте США № 6407213 и Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93), изображенную SEQ ID NO: 18 ниже:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 18)
(остатки HVR подчеркнуты).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи huMAb4D5-8 модифицирована в одном или нескольких положениях 30, 66 и 91 (Asn, Arg и His, указанные жирным/курсивом выше, соответственно). В одном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированная последовательность huMAb4D5-8 включает Ser в положении 30, Gly в положении 66 и/или Ser в положении 91. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность, изображенную SEQ ID NO: 52 ниже:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 52)
(остатки HVR подчеркнуты)

Замененные остатки относительно huMAb4D5-8 отмечены жирным/курсивом выше.

Антитела настоящего изобретения могут включать любую подходящую последовательность каркасной области вариабельной области при условии, что активность связывания с EphB4 по существу сохраняется. Например, в некоторых

вариантах осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения включают консенсусную последовательность каркасной области тяжелой цепи подгруппы III человека. В одном варианте этих антител консенсусная последовательность каркасной области включает замену в положении 71, 73 и/или 78. В других вариантах этих антител положение 71 представляет собой А, 73 - Т и/или 78 - А. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела включают последовательности каркасных областей варибельной области тяжелой цепи huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, США) (на которое также ссылаются в патентах США № 6407213 и 5821337 и Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93). В одном варианте осуществления настоящего изобретения эти антитела, кроме того, включают консенсусную последовательность каркасной области легкой цепи кI человека. В одном варианте осуществления настоящего изобретения эти антитела включают последовательности HVR легкой цепи huMAb4D5-8, как описано в патентах США № 6407213 и 5821337. В одном варианте осуществления настоящего изобретения эти антитела включают последовательности варибельных областей легкой цепи huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, США) (на которое также ссылаются в патентах США № 6407213 и 5821337 и Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает варибельную область тяжелой цепи, причем последовательность каркасной области включает последовательность SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 и/или 37, и последовательностями HVR-H1, -H2 и -H3 являются SEQ ID NO: 9, 11 и/или 15 соответственно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает варибельную область легкой цепи, причем последовательность каркасной области включает последовательность SEQ ID NO: 38, 39, 40 и/или 41, и последовательностями HVR-L1, -L2 и -L3 являются SEQ ID NO: 2, 4 и/или 7 соответственно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает варибельную область тяжелой цепи, причем последовательность каркасной области включает последовательность SEQ ID NO: 46, 47, 48 и/или 49, и последовательностями HVR-H1, -H2 и -H3 являются SEQ ID NO: 2, 4 и/или 7 соответственно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает варибельную область легкой цепи, причем последовательность каркасной области включает последовательность SEQ ID NO: 42, 43, 44 и/или 45, и последовательностями HVR-L1, -L2 и -L3 являются SEQ ID NO: 9, 11 и/или 15 соответственно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает варибельную область тяжелой цепи, причем последовательность каркасной области включает последовательность SEQ ID NO: 46, 47, 51 и 49, и последовательностями HVR-H1, -H2 и -H3 являются SEQ ID NO: 2, 4 и/или 7 соответственно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает варибельную область легкой цепи, причем последовательность каркасной области включает последовательность SEQ ID NO: 42, 43, 50 и 45, и последовательностями HVR-L1, -L2 и -L3 являются SEQ ID NO: 9, 11 и/или 15 соответственно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения является антителом с созревшей аффинностью для получения желаемой

аффинности связывания мишени. В одном примере антитело с созревшей аффинностью настоящего изобретения включает замену по крайней мере одной или нескольких аминокислот в положениях H28, H31, H34, H52a, H54, H55, H57, H58, H95, L29, L30, L31, L32, L33, L53, L55, L90, L91, L92, L93, L94, L96 или L97. В одном примере
 5 антитело с созревшей аффинностью настоящего изобретения включает одну или несколько из следующих замен: (а) в тяжелой цепи, T28S, G31N, I34L, P52aL, S54G, G55S, T57S или R, D58, E или G, G95S, или (b) в легкой цепи, V29S, S30E, T31I, A32F, V33L, F53N, Y55E, Q90E или K, S91T, Y92N, T, E или A, T93V или I, T94V или I, P96L
 10 или E, или T97S.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 53. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область
 15 легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 54. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 53, и вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID
 20 NO: 54.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 55. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область
 25 легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 56. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 55, и вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID
 30 NO: 56.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 57. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область
 35 легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 58. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID
 40 NO: 58.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 59. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область
 45 легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 60. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID
 50 NO: 60.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 61. В одном варианте осуществления настоящего

изобретения антитело настоящего изобретения включает переменную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 62. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 61, и переменную область легкой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO: 62.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое конкурирует с любым из вышеупомянутых антител за связывание с EphB4. В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом EphB4, что и вышеупомянутые антитела.

Как известно в данной области и описано более подробно здесь ниже, положение аминокислоты/граница, определяющее гиперпеременную область антитела, может варьировать в зависимости от контекста и различных определений, известных в данной области (как описано ниже). Некоторые положения в пределах переменной области могут рассматриваться в качестве гибридных гиперпеременных положений, поскольку можно считать, что эти положения находятся в пределах гиперпеременного участка согласно одному набору критериев, в то время как согласно отличному набору критериев можно считать, что они находятся вне гиперпеременного участка. Одно или несколько из этих положений можно также обнаружить в удлиненных гиперпеременных участках (дополнительно определенных ниже).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело является поликлональным антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело выбирают из группы, состоящей из химерного антитела, антитела с созревшей аффинностью, гуманизированного антитела и антитела человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ или scFv.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело является химерным антителом, например антителом, включающим антигенсвязывающие последовательности не являющегося человеком донора, пересаженные в гетерологичную нечеловеческую, человеческую или гуманизированную последовательность (например, последовательности каркасных областей и/или константных областей). В одном варианте осуществления настоящего изобретения не являющимся человеком донором является мышь. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающая последовательность является синтетической, например полученной с помощью мутагенеза (например, скринирования фагового дисплея и т.п.). В одном варианте осуществления настоящего изобретения химерное антитело настоящего изобретения имеет мышиные V-области и человеческую C-область. В одном варианте осуществления настоящего изобретения V-область легкой цепи мышиных слита с легкой цепью каппа человека. В одном варианте осуществления настоящего изобретения V-область тяжелой цепи мышиных слита с C-областью IgG1 человека.

Гуманизированные антитела настоящего изобретения включают антитела, которые имеют аминокислотные замены в FR, и варианты с созревшей аффинностью с заменами в пересаженных CDR. Замещаемые аминокислоты в CDR или FR не

ограничиваются аминокислотами, присутствующими в донорском или реципиентном антителе. В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения, кроме того, включают замены аминокислотных остатков Fc-фрагмента, что приводит к увеличению эффекторной функции, в том числе

5 увеличению функции CDC (комплементзависимой цитотоксичности) и/или ADCC (антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности) и цитолиза В-клетками. Другие антитела настоящего изобретения включают антитела, имеющие специфические изменения, увеличивающие стабильность. В других вариантах

10 осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения включают изменения аминокислотных остатков Fc-фрагмента, которые приводят к снижению эффекторной функции, например снижению функции CDC и/или ADCC и/или снижению цитолиза В-клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения характеризуются снижением

15 связывания (например, отсутствием связывания) с фактором комплемента человека C1q и/или рецептором Fc человека на природных киллерах (NK). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения характеризуются снижением связывания (например, отсутствием связывания) с FcγRI, FcγRIIA и/или FcγRIIIA. В некоторых вариантах осуществления

20 настоящего изобретения антитела настоящего изобретения являются классом IgG (например, IgG1 или IgG4) и включают по крайней мере одну мутацию в E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 и/или P329 (нумерации в соответствии с EU-индексом). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела включают мутацию L234A/L235A или D265A/N297A.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются анти-EphB4 полипептиды, включающие любую из антигенсвязывающих последовательностей, предоставленных здесь, причем анти-EphB4 полипептиды специфически связываются

30 с EphB4.

Антитела настоящего изобретения связывают (например, специфически связывают) EphB4 и в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения могут модулировать один или несколько аспектов ассоциируемых с EphB4 эффектов, включающих, но без ограничения, активацию EphB4, молекулярную передачу сигнала

35 в прямом направлении от EphB4, активацию лиганда EphB4, молекулярную передачу сигнала в прямом направлении от лиганда EphB4, нарушение связывания лиганда (например, эфрина-B1, эфрина-B2 и/или эфрина-B3) с EphB4, фосфорилирования EphB4, и/или образования мультимеров EphB4, и/или фосфорилирования лиганда EphB4,

40 и/или нарушение любого биологически значимого биологического пути EphB4 и/или лиганда EphB4, ингибирование развития кровеносных сосудов, и/или лечение, и/или предотвращение опухоли, нарушения пролиферации клеток или рака, и/или лечение или предотвращение нарушения, ассоциируемого с экспрессией и/или активностью EphB4 (например, увеличенной экспрессией и/или активностью EphB4). В

45 некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения специфически связывается с EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело специфически связывается с экстраклеточным доменом (ECD) EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело специфически связывается с полипептидом, состоящим или по существу состоящим из экстраклеточного домена EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело специфически связывает EphB4 с Kd, составляющей 50 пМ или меньше. В некоторых вариантах

50

осуществления настоящего изобретения антитело уменьшает, ингибируют и/или блокируют активность EphB4 in vivo и/или in vitro. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения уменьшает, ингибируют и/или блокируют аутофосфорилирование EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело конкурирует за связывание с лигандом EphB4 (уменьшает и/или блокирует связывание лиганда EphB4 с EphB4).

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение антитела настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или нейродегенеративное заболевание.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение антитела настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для ингибирования развития кровеносных сосудов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения и носитель. В одном варианте осуществления настоящего изобретения носитель является фармацевтически приемлемым.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против EphB4 настоящего изобретения.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются векторы, включающие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются композиции, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот настоящего изобретения и носитель. В одном варианте осуществления настоящего изобретения носитель является фармацевтически приемлемым.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются клетки-хозяева, включающие нуклеиновую кислоту или вектор настоящего изобретения. Вектор может быть любого типа, например рекомбинантным вектором, таким как экспрессирующий вектор. Можно использовать любую из множества клеток-хозяев. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин является прокариотической клеткой, например E.coli. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин является эукариотической клеткой, например клеткой млекопитающего, такой как клетка яичника китайского хомячка (СНО).

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы получения антитела настоящего изобретения. Например, настоящим изобретением обеспечиваются способы получения антитела против EphB4 (которое, как здесь определено, имеет полную длину) и его фрагментов или иммуноконъюгатов, при этом указанный способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора настоящего изобретения, кодирующего указанное антитело (или его фрагмент) и извлечение указанного антитела.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается изделие производства, включающее контейнер и композицию, содержащуюся внутри контейнера, причем композиция содержит одно или несколько антител против EphB4 настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция содержит нуклеиновую кислоту настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая антитело, содержит,

кроме того, носитель, который в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления настоящего изобретения изделие производства настоящего изобретения содержит, кроме того, инструкции в отношении введения композиции (например, антитела) субъекту (например, инструкции для любого из описанных здесь способов).

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается набор, содержащий первый контейнер, содержащий композицию, содержащую одно или несколько антител против EphB4 настоящего изобретения, и второй контейнер, содержащий буфер. В одном варианте осуществления настоящего изобретения буфер является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая антитело, содержит, кроме того, носитель, который в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения является фармацевтически приемлемым. В одном варианте осуществления настоящего изобретения набор содержит, кроме того, инструкции в отношении введения композиции (например, антитела) субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение антитела против EphB4 настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение нуклеиновой кислоты настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение вектора настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение клетки-хозяина настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение изделия

производства настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или
5 нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение набора
10 настоящего изобретения для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является невропатия или
15 нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов.

Настоящим изобретением обеспечиваются способы и композиции, применимые для модуляции болезненных состояний, ассоциируемых с экспрессией и/или
20 активностью EphB4, например увеличенной или сниженной экспрессией и/или активностью или нежелательной экспрессией и/или активностью.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения или предотвращения опухоли, рака и/или нарушения пролиферации клеток, ассоциируемых с увеличением экспрессии и/или активности EphB4, включающие
25 введение эффективного количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы уничтожения клетки (такой как раковая или опухолевая клетка), включающие введение
30 эффективного количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы уменьшения, ингибирования, блокирования или предотвращения роста опухоли или рака, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4
35 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения или предотвращения невропатии или нейродегенеративного заболевания или восстановления поврежденной нервной клетки, включающие введение эффективного
40 количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы повышения развития, пролиферации, сохранности или регенерации нейронов, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком
45 лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы ингибирования развития кровеносных сосудов, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения патологического состояния, ассоциируемого с развитием кровеносных сосудов, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4
50 нуждающемуся в таком лечении субъекту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения патологическим состоянием, ассоциируемым с развитием

кровеносных сосудов, является опухоль, рак и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения патологическим состоянием, ассоциируемым с развитием кровеносных сосудов, является внутриглазное неоваскулярное поражение.

Способы настоящего изобретения можно использовать для оказания влияния на любое подходящее патологическое состояние. Примеры нарушений описаны здесь и включают рак, выбираемый из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легкого, нейробластом, меланомы, рака молочной железы, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки (CRC) и печеночно-клеточной карциномы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения клеткой, на которую нацеливаются в способе настоящего изобретения, является раковая клетка. Например, раковую клетку можно выбрать из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, клетки рака ободочной и прямой кишки, клетки рака легкого, клетки папиллярной карциномы, клетки рака ободочной кишки, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака яичника, клетки цервикального рака, клетки рака центральной нервной системы, клетки остеогенной саркомы, клетка рака почки, клетки печеночно-клеточной карциномы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака желудка, клетки сквамозной карциномы головы и шеи, клетки меланомы, клетки лейкоза и клетки аденомы ободочной кишки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клеткой, на которую нацеливаются в способе настоящего изобретения, является гиперпролиферирующая и/или гиперпластическая клетка. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клеткой, на которую нацеливаются в способе настоящего изобретения, является диспластическая клетка. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения клеткой, на которую нацеливаются в способе настоящего изобретения, является метастатическая клетка.

Способы настоящего изобретения могут, кроме того, включать дополнительные стадии лечения. Например, в одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает стадию, на которой целевую клетку и/или ткань (например, раковую клетку) подвергают воздействию облучением или химиотерапевтическим агентом.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4 в комбинации с эффективным количеством другого терапевтического агента (такого как антиангиогенный агент (агент против развития кровеносных сосудов)). Например, антитело(а) против EphB4 используют в комбинации с противораковым агентом или антиангиогенным агентом для лечения различных неопластических или не являющихся неопластическими состояний. В одном варианте осуществления настоящего изобретения неопластическое или не являющееся неопластическим состояние представляет собой патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения другим терапевтическим агентом является антиангиогенный агент, антинеопластический агент и/или химиотерапевтический агент.

Антитело против EphB4 можно вводить последовательно или в комбинации с другим терапевтическим агентом, который эффективен для этих целей, или в одной и той же композиции, или в виде отдельных композиций. Введение антитела против EphB4 и другого терапевтического агента (например, противоракового агента, антиангиогенного агента) можно осуществлять одновременно, например, в виде одной композиции или в виде двух или более отдельных композиций, используя одни и

те же или различные пути введения. Альтернативно или дополнительно, введение можно осуществить последовательно, в любом порядке. Альтернативно или дополнительно, стадии можно выполнить в виде комбинации последовательного и одновременного введения, в любом порядке. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения интервалы между введениями двух или более композиций могут находиться в диапазоне минуты-дни, недели-месяцы. Например, сначала можно ввести противораковый агент, а затем антитело против EphB4. Однако также предусматривается одновременное введение или введение антитела против EphB4 первым. Соответственно, в одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы, включающие введение антитела против EphB4 с последующим введением антиангиогенного агента (такого как антитело против VEGF, например бевацизумаба). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения интервалы между введениями двух или более композиций могут находиться в диапазоне минуты-дни, недели-месяцы.

В определенных аспектах настоящим изобретением обеспечивается способ лечения нарушения (такого как опухоль, рак и/или нарушение пролиферации клеток) путем введения эффективных количеств антитела против EphB4 и/или ингибитора(ов) развития кровеносных сосудов и одного или нескольких химиотерапевтических агентов. В комбинированных способах лечения настоящего изобретения можно использовать ряд химиотерапевтических агентов. Примеры и неограничивающий перечень предусмотренных химиотерапевтических агентов приведены здесь в разделе «Определения». Введение антитела против EphB4 и химиотерапевтического агента можно осуществлять одновременно, например, в виде одной композиции или в виде двух или более отдельных композиций, используя одни и те же или различные пути введения. Альтернативно или дополнительно, введение можно осуществить последовательно, в любом порядке. Альтернативно или дополнительно, стадии можно выполнить в виде комбинации последовательного и одновременного введения, в любом порядке. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения интервалы между введениями двух или более композиций могут находиться в диапазоне минуты-дни, недели-месяцы. Например, сначала можно ввести химиотерапевтический агент, а затем антитело против EphB4. Однако также предусматривается одновременное введение или введение антитела против EphB4 первым. Соответственно, в одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы, включающие введение антитела против EphB4 с последующим введением химиотерапевтического агента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения интервалы между введениями двух или более композиций могут находиться в диапазоне минуты-дни, недели-месяцы.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы увеличения эффективности антиангиогенного агента у субъекта, имеющего патологическое состояние, ассоциируемое с развитием кровеносных сосудов, включающие введение субъекту эффективного количества антитела против EphB4 в комбинации с антиангиогенным агентом, увеличивая тем самым ингибиторную активность указанного антиангиогенного агента.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы обнаружения EphB4, включающие обнаружение в образце комплекса EphB4 - антитело против EphB4. Используемый здесь термин «обнаружение» включает качественное и/или количественное обнаружение (измерение уровней) с или без ссылки на контроль.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы

диагностирования нарушения, ассоциируемого с экспрессией и/или активностью EphB4, включающие обнаружение комплекса EphB4 - антитело против EphB4 в биологическом образце от субъекта, у которого имеется и подозревается наличие указанного нарушения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия EphB4 является увеличенной экспрессией или патологической экспрессией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является опухоль, рак и/или нарушение пролиферации клеток.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается любое описанное здесь антитело против EphB4, причем антитело против EphB4 включает определяемую метку.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается комплекс любого описанного здесь антитела против EphB4 и EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комплекс существует *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комплекс включает раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против EphB4 является меченным детектируемой меткой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1: Последовательности петлевых участков HVR тяжелой цепи и легкой цепи антител против EphB4. На фигуре демонстрируются последовательности HVR тяжелой цепи, H1, H2 и H3, и последовательности HVR легкой цепи, L1, L2 и L3.

Последовательности пронумерованы следующим образом: клон 30.35 (HVR-H1 - SEQ ID NO: 1; HVR-H2 - SEQ ID NO: 3; HVR-H3 - SEQ ID NO: 7; HVR-L1 - SEQ ID NO: 9; HVR-L2 - SEQ ID NO: 11; HVR-L3 - SEQ ID NO: 13); клон 30.35.1D2 (HVR-H1 - SEQ ID NO: 1; HVR-H2 - SEQ ID NO: 3; HVR-H3 - SEQ ID NO: 8; HVR-L1 - SEQ ID NO: 10; HVR-L2 - SEQ ID NO: 12; HVR-L3 - SEQ ID NO: 14); клон 30.35.2D8 (HVR-H1 - SEQ ID NO: 2; HVR-H2 - SEQ ID NO: 4; HVR-H3 - SEQ ID NO: 7; HVR-L1 - SEQ ID NO: 9; HVR-L2 - SEQ ID NO: 11; HVR-L3 - SEQ ID NO: 15); клон 30.35.2D12 (HVR-H1 - SEQ ID NO: 1; HVR-H2 - SEQ ID NO: 5; HVR-H3 - SEQ ID NO: 7; HVR-L1 - SEQ ID NO: 9; HVR-L2 - SEQ ID NO: 11; HVR-L3 - SEQ ID NO: 16); и клон 30.35.2D13 (HVR-H1 - SEQ ID NO: 1; HVR-H2 - SEQ ID NO: 6; HVR-H3 - SEQ ID NO: 7; HVR-L1 - SEQ ID NO: 9; HVR-L2 - SEQ ID NO: 11; HVR-L3 - SEQ ID NO: 17).

Положения аминокислот нумеруются в соответствии с системой нумерации по Kabat, как описано ниже.

Фиг. 2A, 2B и 3 представляют приведенные в качестве примеров консенсусные последовательности акцепторных каркасных областей человека, используемые для осуществления на практике настоящего изобретения, со следующими идентификаторами последовательностей.

Консенсусные каркасные области варибельной области тяжелой цепи (VH) (фиг. 2A и 2B)

Консенсусная каркасная область VH подгруппы I человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 19).

Консенсусная каркасная область VH подгруппы I человека минус удлиненные гиперварибельные участки (SEQ ID NO: 20-22).

Консенсусная каркасная область VH подгруппы II человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 23).

Консенсусная каркасная область VH подгруппы II человека минус удлиненные гиперварибельные участки (SEQ ID NO: 24-26).

Консенсусная каркасная область VH подгруппы III человека минус CDR по Kabat

(SEQ ID NO: 27).

Консенсусная каркасная область VH подгруппы III человека минус удлинённые гипервариабельные участки (SEQ ID NO: 28-30).

Акцепторная каркасная область VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 31).

Акцепторная каркасная область VH человека минус удлинённые гипервариабельные участки (SEQ ID NO: 32-33).

Акцепторная 2-каркасная область VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 34).

Акцепторная 2-каркасная область VH человека минус удлинённые гипервариабельные участки (SEQ ID NO: 35-37).

Консенсусные каркасные области переменной области легкой цепи (VL) (фиг. 3)

Консенсусная каркасная область VL каппа подгруппы I человека (SEQ ID NO: 38).

Консенсусная каркасная область VL каппа подгруппы II человека (SEQ ID NO: 39).

Консенсусная каркасная область VL каппа подгруппы III человека (SEQ ID NO: 40).

Консенсусная каркасная область VL каппа подгруппы IV человека (SEQ ID NO: 41).

Фиг. 4 представляет последовательности каркасных областей легкой и тяжелой цепей huMAb4D5-8. Числа в надстрочном индексе/выделенные жирным указывают положения аминокислот в соответствии с Kabat.

Фиг. 5 представляет модифицированные/вариантные последовательности каркасных областей легкой и тяжелой цепей huMAb4D5-8. Числа в надстрочном индексе/выделенные жирным указывают положения аминокислот в соответствии с Kabat.

Фиг. 6 представляет переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи клонов антител 30.35, 30.35.1D2, 30.35.2D8, 30.35.2D12 и 20.25.2D13.

Фиг. 7: Моноклональное антитело против EphB4 блокирует передачу сигнала от рецептора EphB4 в основанном на клетках анализе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящим изобретением здесь обеспечиваются антитела против EphB4, которые применимы, например, для лечения или предотвращения болезненных состояний, ассоциируемых с экспрессией и/или активностью EphB4, например увеличенной экспрессией и/или активностью или нежелательной экспрессией и/или активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения используются для лечения опухоли, рака и/или нарушения пролиферации клеток.

В другом аспекте антитела против EphB4 настоящего изобретения находят применение в качестве реагентов для обнаружения и/или выделения EphB4, таких как обнаружение EphB4 в различных тканях и типе клеток.

Настоящим изобретением, кроме того, обеспечиваются способы получения антител против EphB4 и полинуклеотиды, кодирующие антитела против EphB4.

Общие методы

Методы и процедуры, которые здесь описаны или на которые здесь ссылаются, как правило, полностью понятны квалифицированным в данной области специалистам, и обычно они применяются с использованием общепринятой методологии, такой как широко используемые методологии, описанные Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. Edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds., (2003)); в сериях METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL

CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Определения

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и извлечено и/или отделено от компонента его природного окружения. Компоненты-примеси его природного окружения являются веществами, которые мешают диагностическим или терапевтическим применениям антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковоподобные или небелковоподобные растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело будет очищено (1) до более чем 95% по весу антитела, как определено с помощью метода Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по крайней мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью использования секвенатора, рабочим элементом которого является вращающийся сосуд, или (3) до гомогенности при электрофоре в SDS-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, используя кумасси голубой или предпочтительно окрашивание серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, поскольку по крайней мере один компонент природного окружения антитела не присутствует. Обычно, однако, выделенное антитело получают с помощью по крайней мере одной стадии очистки.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, идентифицированную и отделенную от по крайней мере одной примесной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты находится в форме или окружении, отличных от тех, в которых она обнаруживается в природе. Следовательно, выделенные молекулы нуклеиновых кислот отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в природных клетках. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно экспрессируют антитело, в которых, например, положение молекулы нуклеиновой кислоты в хромосоме отличается от положения в природных клетках.

Термин «нумерация остатков вариабельной области в соответствии с Kabat» или «нумерация положений аминокислот в соответствии с Kabat» и его вариации относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных областей тяжелой цепи или вариабельных областей легкой цепи сложности антител Kabat и др. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Используя эту систему нумерации, действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или CDR вариабельной области или вставки в них. Например, вариабельная область тяжелой цепи может включать одну вставку аминокислоты (остатка 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c в соответствии с Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков в соответствии с Kabat можно определить для данного антитела с помощью выравнивания в районах гомологии последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, пронумерованной в соответствии с Kabat.

Используемое здесь выражение «по существу схожие» или «по существу одни и те же» означает достаточно высокую степень схожести между двумя численными величинами (обычно одной, ассоциируемой с антителом настоящего изобретения, и

другой, ассоциируемой с эталонным/используемым для сравнения антителом), так что квалифицированный в данной области специалист будет считать, что различие между двумя величинами является незначительным или нет биологического и/или статистического различия в контексте биологического свойства, измеряемого с помощью этих величин (например, величин K_d). Различие между указанными двумя величинами предпочтительно составляет менее приблизительно 50%, предпочтительно менее приблизительно 40%, предпочтительно менее приблизительно 30%, предпочтительно менее приблизительно 20%, предпочтительно менее приблизительно 10% в виде функции величины для эталонного/используемого для сравнения антитела.

«Аффинность связывания» обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если только не указано иное, используемый здесь термин «аффинность связывания» относится к присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может быть обычно представлена с помощью константы диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить с помощью обычных способов, известных в данной области, включающих те, которые здесь описаны. Антитела с низкой аффинностью, как правило, связывают антиген медленно и имеют тенденцию к легкой диссоциации, в то время как антитела с высокой аффинностью, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области известно множество способов измерения аффинности связывания, любой из которых можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты описываются далее.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения « K_d » или «величину K_d » определяют с помощью анализа связывания меченного радиоактивным изотопом антигена (RIA), выполняемого с вариантом Fab представляющего интерес антитела и его антигеном, как описано, с помощью следующего анализа, в котором измеряется аффинность связывания в растворе Fab с антигеном путем приведения в равновесие Fab с помощью минимальной концентрации (^{125}I)-меченного антигена в присутствии титрационного ряда немеченого антигена, затем захвата связанного антигена на планшет, покрытый антителом против Fab (Chen et al. (1999), J. Mol. Biol 293: 865-881). Для установки условий анализа микротитрационные планшеты (Dynex) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл захватывающего антитела против Fab (Cappel Labs) в 50 mM карбонате натрия (pH 9,6) и впоследствии блокируют 2% (вес/объем) бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В планшете без адсорбирующего агента (Nunc #269620) 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-антигена смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, согласующего с определением антитела против VEGF, Fab-12, в Presta et al. (1997), Cancer Res. 57: 4593-4599). Представляющий интерес Fab затем инкубируют в течение ночи, однако инкубация может продолжаться в течение более длительного периода (например, 65 часов) для того, что гарантировать достижение равновесия. После этого смесь переносят в захватывающий планшет для инкубации при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Раствор затем удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% Tween-20 в PBS. После высыхания планшетов добавляют 150 мкл/лунку сцинтиллятора (MicroScint-20, Packard) и планшеты считают с помощью счетчика

гамма-квантов Topcount (Packard) в течение 10 минут. Для использования в конкурентных анализах связывания выбирают концентрацию каждого Fab, которая обеспечивает связывание, менее или равное 20% от максимального связывания. В соответствии с другим вариантом осуществления K_d или величину K_d определяют с помощью анализов резонанса на поверхностных плазмонах, используя BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с использованием чипов с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единиц ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore, Inc.) активируют с помощью N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разводят с использованием 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) до инъекции при скорости потока 5 мкл/минуту для получения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена инъецируют 1 М этаноламин для блокирования непрореагировавших групп. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (0,78 нМ - 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% Tween-20 (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/минуту. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием ленгмюровской модели простого связывания в соотношении 1:1 (версия 3,2 программного обеспечения для оценки BIAcore) путем одновременного вычерчивания сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу диссоциации при равновесии (K_d) рассчитывают в виде отношения k_{off}/k_{on} . См., например, Chen Y. et al. (1999), J. Mol. Biol. 293: 865-881. Если скорость ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при вышеуказанном анализе резонанса на поверхностных плазмонах, скорость ассоциации можно определить с помощью метода гашения флуоресценции, с помощью которого определяется увеличение или уменьшение интенсивности флуоресцентного испускания (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм; 16 нм полоса) при 25°C 20 нМ антитела против антигена (формы Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена, что измеряется в спектрометре, таком как спектрофотометр, оснащенный прекращением-поток (Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-Aminco 8000-серии (ThermoSpectronic) с красной кюветой для перемешивания.

«Скорость ассоциации» или « k_{on} » в соответствии с этим изобретением можно также определить с использованием того же самого метода резонанса на поверхностных плазмонах, который описан выше, используя BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с использованием чипов с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единиц ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore, Inc.) активируют с помощью N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разводят с использованием 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) до инъекции при скорости потока 5 мкл/минуту для получения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена инъецируют 1 М этаноламин для блокирования непрореагировавших групп. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (0,78 нМ - 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% Tween-20 (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/минуту. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием ленгмюровской модели простого связывания в соотношении 1:1 (версия 3,2 программного обеспечения для оценки BIAcore) путем одновременного

вычерчивания сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу диссоциации при равновесии (K_d) рассчитывают в виде отношения k_{off}/k_{on} . См., например, Chen Y. et al. (1999), J. Mol. Biol. 293: 865-881. Однако если скорость ассоциации превышает 10^6 $M^{-1} s^{-1}$ при вышеуказанном анализе резонанса на поверхностных плазмонах, скорость ассоциации предпочтительно определяют с помощью метода гашения флуоресценции, с помощью которого определяется увеличение или уменьшение интенсивности флуоресцентного испускания (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм; 16 нм полоса) при 25°C 20 нМ антитела против антигена (формы Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена, что измеряется в спектрометре, таком как спектрофотометр, оснащенный прекращением-поток (Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-Aminco 8000-серии (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

Используемый здесь термин «вектор», как предлагается, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из типов векторов является «плаزمид», которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК-петле, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом векторов является фаговый вектор. Другим типом векторов является вирусный вектор, причем в вирусный геном можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Некоторые векторы (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное начало репликации, и эписомальные векторы млекопитающих) способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую они введены. Другие векторы (например, не являющиеся эписомальными векторы млекопитающих) можно интегрировать в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и они таким образом реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. На такие векторы здесь приводится ссылка в виде «рекомбинантных экспрессирующих векторов» (или просто «рекомбинантных векторов»). В общем экспрессирующие векторы, применяемые в методах рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании термины «плазмид» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмид является наиболее часто используемой формой вектора.

Используемые здесь взаимозаменяемо термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК или РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами или любым субстратом, который может быть встроен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или синтетической реакции. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. При наличии модификации в структуре нуклеотида она может быть осуществлена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно, кроме того, модифицировать после синтеза, например, с помощью конъюгации с меткой. Другие типы модификаций включают, например, «кэп-группы», замены одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогами, модификации межнуклеотидных связей, такие как, например, модификации незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.п.) и заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.п.), модификации, содержащие подвесные составляющие, такие как, например, белки

(например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.п.), модификации интеркалирующими агентами (например, акридином, псораленом и т.п.), модификации, содержащие комплексоны (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.п.), модификации, содержащие алкилирующие агенты, модификации модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.п.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любая гидроксильная группа, обычно присутствующая в сахарах, может быть замещена, например, фосфонатной группой, фосфатной группой, защищена стандартной защитной группой или активирована для приготовления дополнительной связи с дополнительным нуклеотидом, или она может быть конъюгирована с твердой или полутвердой подложкой. 5' и 3' концевая группа ОН может быть фосфорилирована или замещена аминами или составляющими в виде органических кэппирующих групп, включающих 1-20 атомов углерода. Другие гидроксилы можно также подвергнуть дериватизации до стандартных защитных групп. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров в виде рибозы или дезоксирибозы, которые обычно известны в данной области, включающие, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-О-фтор- или 2'-О-азидорибозу, аналоги сахаров в виде углеродных циклов, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, сахара в виде пираноз, сахара в виде фураноз, седогептулозы, ациклические аналоги и основные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть замещены альтернативными связующими группами. Эти альтернативные связующие группы включают, но без ограничения, варианты осуществления, в которых фосфат замещен P(O)S («тиоатом»), P(S)S («дитиоатом»), (O)NR₂ («амидатом»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталем»), в которых R или R' независимо представляют собой Н или замещенный или незамещенный алкил (1-20 С), необязательно содержащий эфирную (-О-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не требуется, чтобы все связи в полинуклеотиде были идентичными. Предшествующее описание применимо ко всем полинуклеотидам, на которые здесь приводится ссылка, в том числе РНК и ДНК.

Используемый здесь термин «олигонуклеотид» обычно относится к коротким, обычно одноцепочечным, обычно синтетическим полинуклеотидам, длина которых составляет, как правило, но необязательно, менее приблизительно 200 нуклеотидов. Термины «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» не являются взаимно исключаящими. Приведенное выше описание полинуклеотидов одинаково и полностью применимо к олигонуклеотидам.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к пептидной или полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в отобранной для испытания последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для получения максимального процента идентичности последовательности и неприятия во внимание любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения идентичности аминокислотной последовательности можно получить различными способами, которыми обладает данная область техники, например используя публично доступное компьютерное программное обеспечение, такое как программное обеспечение BLAST, BALST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR).

Квалифицированные в данной области специалисты могут определить соответствующие параметры измерения выравнивания, включающие любые алгоритмы, необходимые для получения максимального выравнивания на протяжении полной длины сравниваемых последовательностей. Для целей настоящего изобретения, однако, значения % идентичности аминокислотной последовательности получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., и текст был подан с документацией для пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, Washington D. C., 20559, где он зарегистрирован под № регистрации авторских прав США - TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна через Genentech, Inc., South San Francisco, California. Программу ALIGN-2 следует транслировать при использовании на операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей установлены программой ALIGN-2 и не меняются.

В ситуациях, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности данной аминокислотной последовательности А данной аминокислотной последовательности В (что можно альтернативно перефразировать как данная аминокислотная последовательность А, идентичная аминокислотной последовательности В на некий %) рассчитывают следующим образом:

100 раз дроби X/Y ,

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных в качестве идентичных сопоставлений программой ALIGN-2 выравнивания последовательностей А и В, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в В. Понятно, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А аминокислотной последовательности В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В последовательности А.

Если только специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотной последовательности, используемые здесь, получают, как описывается в непосредственно предшествующем параграфе с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Используемый здесь термин «EphB4» (взаимозаменяемо обозначаемый «EphB4R») относится, если только специально или в контексте не указано иное, к любому встречающемуся в природе полипептиду EphB4 или его варианту (или встречающемуся в природе, или синтетическому). Термином «встречающаяся в природе последовательность» специально охватываются встречающиеся в природе усеченные или секретируемые формы (например, последовательность экстраклеточного домена), встречающиеся в природе варианты формы (например, подвергнутые альтернативному сплайсингу формы) и встречающиеся в природе аллельные варианты. Термин «EphB4 дикого типа» обычно относится к полипептиду, включающему аминокислотную последовательность встречающегося в природе белка EphB4. Термин «последовательность EphB4 дикого типа» обычно относится к аминокислотной последовательности, обнаруживаемой во встречающемся в природе EphB4.

Термины «антитело» и «иммуноглобулин» используются взаимозаменяемо в самом широком значении и включают моноклональные антитела (например,

полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, если они проявляют желаемую биологическую активность) и могут включать определенные фрагменты антител (более подробно описанные
 5 здесь). Антитело может быть антителом человека, гуманизированным и/или с созревшей аффинностью.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что последовательности определенных частей вариабельных областей сильно отличаются среди антител и
 10 используются для связывания и определения специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность не распределена равномерно по вариабельным областям антитела. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых определяющими комплементарность участками (CDR) или гипервариабельными участками вариабельных областей как
 15 легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высоко консервативные части вариабельных областей называются каркасными областями (FR). Вариабельные области встречающихся в природе тяжелых и легких цепей включают, каждая, четыре FR, в значительной степени принимающие β -складчатую конформацию, соединенные
 20 тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях отчасти образующие β -складчатую структуру. CDR каждой цепи удерживаются вместе на близком расстоянии с помощью FR и вместе с CDR другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител (см., Kabat et al., Sequences of
 25 Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные области не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности.

В результате расщепления антител папаином получают два идентичных
 30 антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами “Fab”, каждый с единственным антигенсвязывающим сайтом, и остаточный фрагмент “Fc”, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент “F(ab')₂”, имеющий два антигенсвязывающих сайта и все еще способный образовывать поперечные связи с антигеном.

“Fv” является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный
 35 узнающий антиген и антигенсвязывающий сайт. В двухцепочечных разновидностях Fv этот фрагмент состоит из димера одной вариабельной области тяжелой цепи и одной вариабельной области легкой цепи в тесной, нековалентной связи. В одноцепочечных
 40 разновидностях Fv одна вариабельная область тяжелой цепи и одна вариабельная область легкой цепи могут быть ковалентно связаны с помощью гибкого пептидного линкера, так что легкая и тяжелая цепи могут ассоциироваться в «димерную» структуру, аналогичную структуре в двухцепочечных разновидностях Fv. Фрагмент находится в такой конфигурации, что три CDR каждой вариабельной области
 45 взаимодействуют с определением антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. Вместе шесть гипервариабельных участков придают антителу специфичность в отношении связывания антигена. Однако даже единственная вариабельная область (или половина Fv, включающая только три CDR, специфичных
 50 в отношении антигена) обладает способностью узнавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем полный связывающий сайт.

Фрагмент Fab также содержит константную область легкой цепи и первую константную область (CH1) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от

фрагментов Fab добавочным содержанием небольшого числа остатков с С-конца СН1-области тяжелой цепи, в том числе одного или нескольких цистеинов от шарнирной области антитела. Здесь Fab'-SH является обозначением Fab', в котором остаток (остатки) цистеина константных областей несут свободную тиольную группу.

Фрагменты антитела F(ab')₂ первоначально были получены в виде пары фрагментов Fab', имеющих шарнирные цистеины между собой. Также известны другие химические взаимодействия фрагментов антител.

«Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко отличимых типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ) на основе аминокислотных последовательностей их константных областей.

В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей иммуноглобулины можно отнести к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM - и некоторые из них можно, кроме того, подразделить на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные области тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называют α, δ, ε, γ и μ соответственно. Субъединичные структуры и пространственные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Фрагменты антител» включают только часть интактного антитела, причем эта часть предпочтительно сохраняет по крайней мере одну, предпочтительно большинство или все из функций, как правило, ассоциируемых с этой частью при ее присутствии в интактном антителе. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент антитела включает антигенсвязывающий сайт интактного антитела и, таким образом, сохраняет способность связывать антиген. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент антитела, например фрагмент, включающий фрагмент Fc, сохраняет по крайней мере одну биологическую функцию, как правило, ассоциируемую с фрагментом Fc при его присутствии в интактном антителе, такую как связывание FcRn, модулирование периода полураспада антитела, функции ADCC и связывание комплемента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент антитела является одновалентным антителом, имеющим период полураспада *in vivo*, по существу схожий с периодом полураспада интактного антитела. Например, такой фрагмент антитела может включать одно антигенсвязывающее плечо, связанное с последовательностью Fc, способной придавать фрагменту стабильность *in vivo*.

При использовании здесь термин «гипервариабельный участок», «HVR» или «HV» относится к участкам вариабельной области антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определяемые петли. Как правило, антитела включают шесть гипервариабельных участков; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Используется ряд определений границ гипервариабельных участков, и он включен сюда. Определяющие комплементарность участки (CDR) по Kabat основаны на вариабельности последовательности и являются наиболее часто используемыми (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Вместо этого Chothia ссылается на местоположение структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)).

Гипервариабельные участки AbM представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антитела AbM Oxford Molecular. «Контактные» гипервариабельные участки основаны на анализе имеющихся сложных кристаллических структур.

Остатки каждого из этих гипервариабельных участков отмечены ниже.

	Петля Kabat	AbM	Chothia	Контактные
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
		(Нумерация по Kabat)		
H1	H31-H35B	H26-H35	H26-H32	H30-H35
		(Нумерация по Chothia)		
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Гипервариабельные участки могут включать следующие «удлиненные гипервариабельные участки»: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельной области легкой цепи (VL) и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в вариабельной области тяжелой цепи (VH). Остатки вариабельной области нумеруются в соответствии с Kabat et al., см. выше, для каждого из этих определений.

Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой остатки вариабельной области, отличные от остатков гипервариабельного участка, определенного здесь.

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, крысиных) антител являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из нечеловеческого иммуноглобулина. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены остатками из гипервариабельного участка иммуноглобулинов не являющихся человеком видов (донорского антитела), таких как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющих желаемую специфичность, аффинность и качество. В некоторых случаях остатки каркасных областей (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, не обнаруживаемые в реципиентном антителе или донорском антителе. Такие модификации осуществляют для дальнейшего улучшения характеристики антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по существу все из по крайней мере одного и обычно двух вариабельных областей, в которых все или по существу все из гипервариабельных петлевых фрагментов соответствуют таковым из нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все из FR являются FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать по крайней мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно Fc иммуноглобулина человека. В отношении дальнейших подробностей см. Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-586 (1992). См. также следующие обзорные статьи и приведенные в них ссылки: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

«Химерные» антитела (иммуноглобулины) имеют часть тяжелой и/или легкой цепи, идентичную или гомологичную соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи (ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также включают фрагменты таких антител при условии, что проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Гуманизированное антитело, как здесь используется, представляет собой субпопуляцию химерных антител.

Фрагменты антител «одноцепочечные Fv» или «scFv» включают области VH и VL антитела, причем эти области присутствуют в одной полипептидной цепи. Предпочтительно полипептид Fv, кроме того, включает полипептидный линкер между областями VH и VL, который предоставляет возможность scFv образовывать требуемую для связывания антигена структуру. В отношении обзора scFv см. Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Антиген представляет собой предопределенный антиген, с которым избирательно связывается антитело. Целевым антигеном может быть полипептид, углевод, нуклеиновая кислота, липид, гаптен или другое встречающееся в природе или синтетическое соединение. Предпочтительно целевым антигеном является полипептид.

Термин «диатела» относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, включающим вариабельную область тяжелой цепи (VH), соединенную с вариабельной областью легкой цепи (VL) в одной и той полипептидной цепи (VH-VL). В результате использования линкера, являющегося слишком коротким для того, чтобы сделать возможным спаривание двух областей одной и той же цепи, области вынуждены спариваться с комплементарными областями другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих сайта. Более полно диатела описывается, например, в EP 404097, WO 93/11161 и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

«Антитело человека» представляет собой антитело, обладающее аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или было получено с использованием любого из методов получения антител человека, раскрытых здесь. Это определение антитела человека, в частности, исключает гуманизированное антитело, включающее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

Антитело с «созревшей аффинностью» представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких CDR, которые приводят к возрастанию аффинности антитела к антигену по сравнению с родительским антителом, в котором нет такого изменения(й). Предпочтительные антитела с созревшей аффинностью будут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности к целевому антигену. Антитела с созревшей аффинностью получают с помощью процедур, известных в данной области. Marks и др. (Bio/Technology 10: 779-783 (1992)) описывают созревание аффинности с помощью перетасовки VH- и VL-областей. Неспецифический мутагенез остатков CDR и/или каркасных областей описан Barbas и др. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994)); Schier и др. (Gene 169: 147-155 (1995)); Yelton и др. (J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995)); Jackson и др. (J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995)); и Hawkins и др. (J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992)).

«Эффекторные функции» антител относятся к таким биологическим активностям, которые можно отнести к фрагменту Fc (фрагменту Fc со встречающейся в природе последовательностью или фрагменту Fc с вариантной аминокислотной последовательностью) антитела, и меняются в зависимости от изотипа антитела.

Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; супрессию рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток) и активацию В-клеток.

«Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые Ig, связанные с рецепторами для Fc (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, природных киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), делают возможным специфическое связывание этих цитотоксических эффекторных клеток с клеткой-мишенью, представляющей антиген, и впоследствии уничтожение клетки-мишени с помощью цитотоксинов. Антитела «активизируют» цитотоксические клетки и абсолютно необходимы для такого уничтожения. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Резюме экспрессии FcR на гемопоэтических клетках - это таблица 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы можно провести *in vitro* анализ ADCC, например такой, который описан в патенте США № 5500362, или 5821337, или 6737056 (Presta). Применимые для таких анализов эффекторные клетки включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в модели на животном, такой как модель, описанная Clynes и др. (*PNAS* (USA) 95: 652-656 (1998)).

«Эффекторными клетками человека» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют по крайней мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, опосредующих ADCC, включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), природные киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, при этом предпочтительными являются PBMC и NK. Эффекторные клетки можно выделить из природного источника, например из крови.

Термины «рецептор для Fc» или «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с Fc-фрагментом антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека со встречающейся в природе последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор), и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и подвергнутые альтернативному сплайсингу формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA (активирующий рецептор) и FcγRIIB (ингибирующий рецептор), имеющие сходные аминокислотные последовательности, которые различаются, главным образом, в их цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит мотив активации на основе тирозина иммунорецептора (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования на основе тирозина

иммунорецептора (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. обзор Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Обзор FcR приведен Ravetch и Kinet (Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)); Capel и др. (Immunomethods 4: 25-34 (1994)) и de Haas и др. (J. Lab. Clin. Med. 126: 330-341 (1995)). Термином «FcR» здесь охватываются
 5 другие FcR, в том числе FcR, которые будут идентифицированы в будущем. Этот термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, который ответственен за перенос IgG матери плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)) и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов. В заявке WO
 10 00/42072 (Presta) описываются варианты антител с увеличенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этой патентной публикации специально включено сюда посредством ссылки. См. также Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Способы определения связывания с FcRn известны (см., например, Ghetie 1997, Hinton 2004). Связывание с FcRn человека *in vivo* и период полураспада в сыворотке
 15 полипептидов, связывающих с высокой аффинностью FcRn человека, можно проанализировать, например, в трансгенных мышах или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, и приматах, которым ввели варианты полипептидов Fc.

«Комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Классический путь активации комплемента
 20 инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), связывающимися с родственным антигеном. Для оценки активации комплемента можно выполнить анализ CDC, например, как описано Gazzano-Santoro и др. (J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)).

Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями фрагмента Fc и увеличенной или уменьшенной способностью связывать C1q описаны
 30 в патенте США № 6194551B1 и заявке WO 99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено сюда посредством ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Термин «включающий фрагмент Fc полипептид» относится к полипептиду, такому как антитело или иммуноадгезин (см. определения ниже), который включает
 35 фрагмент Fc. С-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с EU-системой нумерации) фрагмента Fc может быть удален, например, во время очистки полипептида или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей этот полипептид. Соответственно, композиция, содержащая полипептид, имеющий
 40 фрагмент Fc, в соответствии с настоящим изобретением, может включать полипептид с K447, с удаленным K447 или смесь полипептидов с и без остатка K447.

«Блокирующее» антитело или антитело в качестве «антагониста» представляет собой антитело, которое ингибирует или уменьшает биологическую активность
 45 антигена, с которым оно связывается. Предпочтительные блокирующие антитела или антитела в качестве антагонистов по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

Как здесь используется, «антитело в качестве агониста» представляет собой антитело, которое имитирует по крайней мере одну из функциональных активностей
 представляющего интерес полипептида.

Для целей настоящего изобретения «акцепторная каркасная область человека»
 50 представляет собой каркасную область, включающую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, происходящую из каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека.

Акцепторная каркасная область человека, «происходящая из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может включать ту же самую аминокислотную последовательность и может содержать ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности. Если ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности присутствуют, предпочтительно, чтобы присутствовало не более 5 и предпочтительно 4 или менее или 3 или менее ранее существовавших изменений аминокислотной последовательности. Если ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности присутствуют в VH, предпочтительно, чтобы такие изменения присутствовали только в трех, двух или одном из положений: 71Н, 73Н и 78Н; например, аминокислотные остатки в этих положениях могут быть 71А, 73Т и/или 78А. В одном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность акцепторной каркасной области VL человека идентична последовательности каркасной области VL иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека.

«Консенсусная каркасная область человека» представляет собой каркасную область, в которой представлен наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в выборке последовательностей каркасных областей VL или VH иммуноглобулинов человека. Как правило, выборка последовательностей VL или VH иммуноглобулинов человека происходит из подгруппы последовательностей переменных областей. Как правило, эта подгруппа последовательностей является подгруппой в соответствии с Kabat и др. В одном варианте осуществления настоящего изобретения подгруппой для VL является подгруппа каппа I в соответствии с Kabat и др. В другом варианте осуществления настоящего изобретения подгруппой для VH является подгруппа III в соответствии с Kabat и др.

«Консенсусная каркасная область VH подгруппы III» включает консенсусную последовательность, полученную из аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи подгруппы III в соответствии с Kabat и др. В одном варианте осуществления настоящего изобретения консенсусная аминокислотная последовательность каркасной области VH подгруппы III включает по крайней мере часть каждой из следующих последовательностей или каждую из таких последовательностей целиком: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 43)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 44)-H3 -WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 45).

«Консенсусная каркасная область VL подгруппы I» включает консенсусную последовательность, полученную из аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи каппа подгруппы I в соответствии с Kabat и др. В одном варианте осуществления настоящего изобретения консенсусная аминокислотная последовательность каркасной области VL подгруппы I включает по крайней мере часть каждой из следующих последовательностей или каждую из таких последовательностей целиком: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 48)-L3 -FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 49).

«Нарушение» или «заболевание» представляет собой состояние, при котором будет получена польза от лечения веществом/молекулой или способом настоящего изобретения. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, в том числе такие патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающего к

нарушению, о котором идет речь. Неограничивающие примеры нарушений, подвергаемых здесь лечению, включают злокачественные и доброкачественные опухоли; карциному, бластоми и саркому.

Термины «нарушение пролиферации клеток» и «пролиферативное нарушение» относятся к нарушениям, ассоциируемым с некоторой степенью патологической пролиферации клеток. В одном варианте осуществления настоящего изобретения нарушение пролиферации клеток представляет собой рак.

Используемый здесь термин «опухоль» относится к неопластическим росту и пролиферации клеток, или злокачественным, или доброкачественным, и ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Термины «рак», «раковый», «нарушение пролиферации клеток», «пролиферативное нарушение» и «опухоль» не являются взаимно исключаящими, когда на них здесь ссылаются.

Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом/пролиферацией клеток. Примеры рака включают, но без ограничения, карциному, лимфому, бластоми, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раков включают сквамозноклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, сквамозную карциному легкого, рак брюшины, печеночно-клеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластоми, цервикальный рак, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак ободочной и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи. Нарушение регуляции развития кровеносных сосудов может привести ко многим нарушениям, которые можно лечить композициями и способами настоящего изобретения. Эти нарушения включают как не являющиеся неопластическими, так и неопластические состояния. Неоплазии включает, но без ограничения, те, которые описаны выше. Не являющиеся неопластическими нарушения включают, но без ограничения, нежелательную или aberrantную гипертрофию, артрит, ревматоидный артрит (RA), псориаз, псориазные бляшки, саркоидоз, атеросклероз, атеросклеротические бляшки, диабетическую и другие пролиферативные ретинопатии, в том числе ретинопатию раннего развития, ретролентальную фиброплазию, неоваскулярную глаукому, связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна (AMD), диабетический отек в зоне желтого пятна, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию корнеального трансплантата, отторжение корнеального трансплантата, ретиальную/хориоидальную неоваскуляризацию, неоваскуляризацию угла (покраснение), неоваскулярное поражение глаз, васкулярный рестеноз, артериовенозные мальформации (AVM), менингиому, гемангиому, ангиофиброму, гиперплазию щитовидной железы (в том числе болезнь Грейвса), трансплантацию корнеальной и другой ткани, хроническое воспаление, воспаление легких, острое поражение легкого/ARDS, сепсис, первичную легочную гипертензию, злокачественные выпоты в легкие, отек мозга (например, ассоциируемый с острым ударом/закрытой травмой головы/травмой), синовиальное воспаление, образование паннуса при RA, миозит оссифицирующий, гипертрофическое формирование кости, остеоартрит (OA), не поддающиеся лечению асциты, поликистозное поражение яичников, эндометриоз, болезни опухания (панкреатит, повышение давление в какой-либо анатомической полости, ожоги, болезнь

кишечника), фиброму матки, преждевременные роды, хроническое воспаление, такое как IBD (болезнь Крона или неспецифический язвенный колит), отторжение почечного аллотрансплантата, болезнь воспаленного кишечника, нефротический синдром, нежелательный или аберрантный рост массы ткани (нераковый), гемартроз, гипертрофические рубцы, ингибирование роста волос, синдром Ослера-Вебера, пиогенную гранулему, ретролентальные фиброплазии, склеродерму, трахому, адгезию сосудов, синовит, дерматит, презклампию, асциты, перикардальный выпот (такой как ассоциируемый с перикардитом) и плевральный выпот.

Используемый здесь термин «лечение» относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение болезни индивидуума или клетки, подвергаемых лечению, и может проводиться для профилактики или во время течения клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, смягчение симптомов, сокращение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для задержки развития заболевания или нарушения используются антитела настоящего изобретения.

Термины «нейродегенеративное заболевание» и «нейродегенеративное нарушение» используются в самом широком значении с включением всех нарушений, в патологию которых вовлечены дегенерация и/или дисфункция нейронов, в том числе, без ограничения, периферических невропатий, мотонейронных нарушений, таких как амиотрофический боковой склероз (ALS, болезнь Луи Геринга), периферического паралича лицевого нерва и различных состояний, в которые вовлечена спинная мышечная атрофия или паралич; и других нейродегенеративных заболеваний человека, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия, рассеянный склероз, хорея Хантингтона, синдром Дауна, глухота, связанная с поражением слухового нерва, и болезни Меньера.

«Периферическая невропатия» является нейродегенеративным нарушением, при котором поражены периферические нервы, наиболее часто проявляющимся в виде одной или комбинации двигательной, сенсорной, сенсерно-двигательной дисфункции или дисфункции вегетативной нервной системы. Периферические невропатии могут, например, быть генетически приобретенными, могут являться результатом системного заболевания или могут быть индуцированы токсическим агентом, таким как нейротоксическое лекарственное средство, например антинеопластический агент, или промышленным загрязняющим веществом или веществом, загрязняющим окружающую среду. «Периферическая сенсорная невропатия» характеризуется дегенерацией периферических сенсорных нейронов, которая может быть идиопатической, может происходить, например, вследствие диабета (диабетическая невропатия), цитостатической лекарственной терапии при раке (например, лечения химиотерапевтическими агентами, такими как винкристин, цисплатин, метотрексат, 3'-азидо-3'-дезокситимидин или таксаны, например паклитаксел [TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.] и доксетаксел [TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция]), алкоголизма, приобретенного синдрома иммунодефицита (AIDS) или генетической предрасположенности. Генетически приобретенные периферические невропатии включают, например, болезнь Рефсума, диффузный инфантильный склероз Крабе, метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Фабри, синдром Дежерины-Сотта, абеталипопротеинемию и болезнь Шарко-Мари-Тута (также

известную как пронеальная мышечная атрофия или наследственная двигательнo-сенсорная невропатия (HMSN)). Большинство типов периферической невропатии развиваются медленно, на протяжении нескольких месяцев или лет. В клинической практике такие невропатии называются хроническими. Иногда периферическая

5 невропатия развивается быстро, на протяжении нескольких дней, и называется острой. При периферической невропатии обычно поражены и сенсорные, и двигательные нервы, что вызывает смешанную двигательнo-сенсорную невропатию, но также известные чисто сенсорные и чисто двигательные невропатии.

10 «Индивидуумом» является позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человек. Млекопитающие включают, но без ограничения, животных фермерского хозяйства (таких как коров), спортивных животных, любимых животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс.

15 «Млекопитающее» для целей лечения относится к любому животному, классифицируемому в качестве млекопитающего, в том числе людям, домашним животным и животным фермерского хозяйства, животным зоопарка, спортивным животным или любимым животным, таким как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно млекопитающим является человек.

20 «Эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

25 «Терапевтически эффективное количество» вещества/молекулы настоящего изобретения, агониста или антагониста может варьировать в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума и способности вещества/молекулы, агониста или антагониста вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество - это также количество, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любые токсические или

30 вредные воздействия вещества/молекулы, агониста или антагониста.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но необязательно, поскольку профилактическая доза используется до заболевания субъекта или на ранней стадии

35 заболевания субъекта, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Используемый здесь термин «цитотоксический агент» относится к веществу, ингибирующему или препятствующему функционированию клеток и/или

40 вызывающему разрушение клеток. Термин, как предлагается, включает радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические агенты, например метотрексат, адриамицин, винкаалкалоиды (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин и другие интеркалирующие

45 агенты, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеазы, антибиотики и токсины, такие как токсины в виде небольших молекул или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, в том числе их фрагменты и или варианты, и различные противоопухолевые или

50 противораковые агенты, раскрытые здесь. Другие цитотоксические агенты описаны ниже. Агенты, уничтожающие опухолевые клетки, вызывают разрушение опухолевых клеток.

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение,

используемое при лечении рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включающие альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахол; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелесин, карзелесин и бизелесин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хрорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамина оксида гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацил мустард, нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как антибиотики энедины (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гаммаII и калихеамицин омегаII (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, в том числе динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностаин и родственные хромофоры на основе антибиотиков энединов - хромобелков), аклациномисины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицины, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (в том числе морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольная кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пиромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностаин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU), аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексам; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; антиадренальные агенты, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; пополнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдотраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и

ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); тиотепа; таксоиды, например паклитаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.); ABRAXANETM без кремофора, композиция сконструированных на основе альбумина наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и доксетаксел TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлоранбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейкововин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных соединений; а также комбинации двух или более вышеуказанных соединений, такие как CHOP, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращение для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM), объединенным с 5-FU и лейкововином.

В это определение также включены антигормональные агенты, действующие для регуляции, снижения, блокирования или ингибирования эффектов гормонов, поддерживающих рост рака, и часто находящиеся в форме для системного лечения или лечения всего организма. Они сами могут быть гормонами. Примеры включают антиэстрогены и избирательные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), включающие, например, тамоксифен (в том числе тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен ELISTA®, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен FARESTON®, антипрогестероны; супрессоры рецепторов эстрогенов (ERD), агенты, действующие с супрессией или выключением яичников, например агонисты высвобождающего лютеинизирующий гормон гормона (LHRH), такие как LUPRON® и ELIGARD® лейпролида ацетат, гозерелина ацетат, бузерелина ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрола ацетат MEGASE®, эксеместан AROMASIN®, форместанин, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® и анастрозол ARIMIDEX®. Кроме того, такое определение химиотерапевтических агентов включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат DIDROCAL®, NE-58095, золедроновая кислота/золедронат ZOMETA®, алендронат FOSAMAX®, памидронат AREDIA®, тилудронат SKELID® или ризедронат ACTONEL®, а также троксацитабин (аналог цитозина нуклеозида 1,3-диоксолан); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в aberrantную пролиферацию клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и геннотерапевтические вакцины, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; лапатиниба дитозилат (двойные ингибиторы тирозинкиназы ErbB-2 и EGFR в виде небольших молекул, также известные как GW572016) и фармацевтически приемлемые соли,

кислоты или производные любого из вышеуказанных соединений.

При использовании здесь «ингибирующий рост агент» относится к соединению или композиции, которые ингибируют рост клетки (такой как клетка, экспрессирующая EphB4) или *in vitro*, или *in vivo*. Таким образом, ингибирующий рост агент может быть агентом, который значительно уменьшает процент клеток (таких как клетка, экспрессирующая EphB4) в фазе S. Примеры ингибирующих рост агентов включают агенты, которые блокируют прогрессию клеточного цикла (в месте, отличном от фазы S), такие как агенты, которые индуцирует арест фазы G1 или арест фазы M. Классические блокаторы M-фазы включают винкаалкалоиды (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Действие этих агентов, которые подвергают аресту фазу G1, также распространяется на арест фазы S, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дальнейшую информацию можно найти в Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds, главе 1, озаглавленной “Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs” by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особенно стр. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми лекарственными средствами, происходящими из тиса. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), происходящий из европейского тиса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел содействуют сборке микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки с помощью предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

«Доксорубин» является антибиотиком антрациклинового ряда. Полное химическое название доксорубина - (8S-цис)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-лихсо-гексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион.

Термин «antineoplastическая композиция» относится к композиции, применимой для лечения рака, содержащей по крайней мере один активный терапевтический агент, например «противораковый агент». Примеры терапевтических агентов (противораковых агентов, также называемых здесь «antineoplastическими агентами») включают, но без ограничения, например, химиотерапевтические агенты, ингибирующие рост агенты, цитотоксические агенты, агенты, используемые при лучевой терапии, антиангиогенные агенты, вызывающие апоптоз агенты, агенты против тубулина, токсины и другие агенты для лечения рака, например нейтрализующее антитело против VEGF, антагонист VEGF, анти-HER-2, анти-CD20, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR, эрлотиниб, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одним или несколькими из следующих: ErbB2, ErbB3, ErbB4 или рецептор(ами) VEGF, ингибиторы тирозинкиназ рецепторов происходящего из тромбоцитов фактора роста (PDGF) и/или фактора стволовых клеток (SCF) (например, иматиниба мезилат (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2 и другие биоактивные и органические химические агенты и т.п.

Используемый в этой заявке термин «пролекарство» относится к форме предшественника или производного фармацевтически активного вещества, которая является менее токсичной для опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным средством и может быть ферментативно активирована или

превращена в более активную исходную форму. См., например, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986); Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, "Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985).

Пролекарства настоящего изобретения включают, но без ограничения, содержащие фосфат пролекарства, содержащие тиофосфат пролекарства, содержащие сульфат пролекарства, содержащие пептид пролекарства, модифицированные с помощью D-аминокислоты пролекарства, гликозилированные пролекарства, содержащие бета-лактамы пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид пролекарства или содержащие необязательно замещенный фенилацетамид пролекарства, 5-фторцитозин и другие пролекарства в виде 5-фторуридина, которые могут быть превращены в более активные цитотоксические свободные лекарственные средства. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые могут быть подвергнуты дериватизации в форму пролекарства для использования в этом изобретении, включают, но без ограничения, химиотерапевтические агенты, описанные выше.

«Антиангиогенный агент» или «ингибитор развития кровеносных сосудов» относится к веществу с небольшой молекулярной массой, полинуклеотиду, полипептиду, выделенному белку, рекомбинантному белку, антителу или их конъюгатам или слитым белкам, которые ингибируют развития кровеносных сосудов, образование и развитие сосудов или нежелательную проницаемость сосудов или непосредственно, или опосредованно. Например, антиангиогенный агент представляет собой антитело или другой антагонист в отношении агента развития кровеносных сосудов, определенные выше, например антитела против VEGF, антитела против рецепторов VEGF, небольшие молекулы, блокирующие передачу сигнала от рецептора VEGF (например, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (сунитиниб малат), AMG706). Антиангиогенные агенты также включают природные ингибиторы развития кровеносных сосудов, например ангиостатин, эндостатин и т.п. См., например, Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53: 217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22: 3172-3179 (2003) (например, таблицу 3, в которой перечислены антиангиогенные терапии при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22: 6549-6556 (2003) (например, таблицу 2, в которой перечислены антиангиогенные факторы); Sato Int. J. Clin. Oncol., 8: 200-206 (2003) (например, в таблице 1 перечислены антиангиогенные агенты, используемые в клинических испытаниях).

Композиции настоящего изобретения и способы их получения

Настоящим изобретением охватываются композиции, в том числе фармацевтические композиции, содержащие антитело против EphB4, и полинуклеотиды, включающие последовательности, кодирующие антитело против EphB4. Используемые здесь композиции содержат одно или несколько антител, которые связываются с EphB4, и/или один или несколько полинуклеотидов, включающих последовательности, кодирующие одно или несколько антител, которые связываются с EphB4. Эти композиции могут, кроме того, содержать подходящие носители, такие как фармацевтически приемлемые наполнители, включающие буферы, которые хорошо известны в данной области.

Настоящим изобретением также охватываются варианты осуществления в виде выделенного антитела и полинуклеотида. Настоящим изобретением также охватываются варианты осуществления в виде по существу чистого антитела и

полинуклеотида.

Антитела против EphB4 настоящего изобретения являются предпочтительно моноклональными. Также в объем настоящего изобретения включены

фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH и F(ab')₂ антител против EphB4, предоставляемых здесь. Эти фрагменты антител создают с помощью традиционных способов, таких как ферментативное расщепление, или их можно создать с помощью рекомбинантных методов. Такие фрагменты антител могут быть химерными или гуманизированными. Эти фрагменты применимы для диагностических и терапевтических целей,

изложенных ниже.

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, образующие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в малых количествах. Таким образом, атрибут «моноклональное» показывает, что свойством антитела является то, что оно не является смесью дискретных антител.

Моноклональные антитела против EphB4 настоящего изобретения можно получить с помощью гибридомной технологии, впервые описанной Kohler и др. (Nature, 256: 495 (1975)), или методов рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567).

При гибридомной технологии мышь или другое подходящее животное-хозяина, такое как хомяк, иммунизируют для индуцирования лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с используемым для иммунизации белком. Антитела против EphB4, как правило, индуцируют у животных с помощью многократных подкожных или внутрибрюшинных инъекций EphB4 и адъюванта. EphB4 можно приготовить с использованием способов, хорошо известных в данной области, некоторые из которых далее описываются здесь. Например, ниже описывается рекомбинантная продукция EphB4. В одном варианте осуществления настоящего изобретения животных иммунизируют производным EphB4, содержащим экстраклеточный домен (ECD) EphB4, слитый с фрагментом Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения животных иммунизируют слитым белком EphB4-IgG1. Животных обычно иммунизируют против иммуногенных конъюгатов или производных EphB4 с монофосфорилипидом А (MPL)/дикрономиколом трегалозы (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) и раствор инъецируют внутривенно во множество мест. Спустя две недели животных подвергают повторной иммунизации. Через 7-14 дней у животных берут кровь и сыворотку анализируют на титр антител против EphB4. Животных подвергают повторной иммунизации до достижения титром плато.

Альтернативно, лимфоциты можно подвергнуть иммунизации *in vitro*. Лимфоциты затем сливают с миеломными клетками, используя подходящий агент слияния, такой как полиэтиленгликоль, с образованием гибридомной клетки (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом гибридомные клетки засевают и выращивают в подходящей для культивирования среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслившихся родительских миеломных клеток. Например, если в родительских миеломных клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), среда для культивирования гибридом обычно включает вещества: гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT) - которые предотвращают рост

дефицитных в отношении HGPRT клеток.

Предпочтительными миеломными клетками являются такие клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную продукцию на высоком уровне антитела отобранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к среде, такой как среда НАТ. Среди них предпочтительными линиями миеломных клеток являются линии крысиных миеломных клеток, такие как линии, происходящие из опухолей мыши MOPC-21 и MPC-11, доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, США, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, доступные из Американской коллекции типовых культур, Rockville, Maryland, США. Для продукции моноклональных антител человека также описаны линии миеломных клеток человека и линии гетеромиеломных мышинных-человеческих клеток (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Среду для культивирования, в которой выращиваются гибридомные клетки, анализируют на продукцию моноклональных антител, направленных против EphB4. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют с помощью иммунопреципитации или с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела можно, например, определить с помощью анализа Скэтчарда (Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)).

После идентификации гибридомных клеток, продуцирующих антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать с помощью методов серийного разведения и выращивать с использованием стандартных способов (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие для этой цели среды для культивирования включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* в виде асцитной жидкости у животных.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, подходящим образом отделяют от среды для культивирования, асцитной жидкости или сыворотки с помощью общепринятых методик очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография на белок-А-сепарозе, гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела против EphB4 настоящего изобретения можно получить с использованием комбинаторных библиотек, скринируемых на наличие клонов синтетических антител с желаемой активностью или активностями. В принципе клоны синтетических антител отбирают с помощью скринирования фаговых библиотек, содержащих фаги, которые представляют различные фрагменты вариабельной области антитела (Fv), слитые с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки разделяют методом пэннинга с помощью аффинной к желаемому антигену хроматографии. Клоны, экспрессирующие фрагменты Fv, способные связываться с желаемым антигеном, адсорбируются на антигене и, таким образом, отделяются от несвязывающихся клонов в библиотеке. Связывающиеся клоны затем элюируют с антигена, и их можно дополнительно обогатить с помощью дополнительных циклов адсорбции/элюции с антигена. Любое антитело против EphB4 настоящего изобретения можно получить с помощью разработки подходящей процедуры скринирования с использованием антигена для отбора представляющего интерес фагового клона с последующим конструированием клона полноразмерного антитела против EphB4,

используя последовательности Fv представляющего интерес фагового клона и подходящие последовательности константных областей (Fc), описанные Kabat и др. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991) vols. 1-3).

Антигенсвязывающий домен антитела образуется из двух вариабельных (V) областей из приблизительно 110 аминокислот, одной вариабельной области легкой цепи (VL) и одной вариабельной области тяжелой цепи (VH), каждая из которых представляет три гипервариабельных петлевых участка или определяющих комплементарность участка (CDR). На фагах вариабельные области могут быть функционально представлены или в виде одноцепочечных Fv (scFv)-фрагментов, в которых VH и VL ковалентно связаны через короткий, гибкий пептид, или в виде фрагментов Fab, в которых каждый из VH и VL слит с константной областью и VH и VL взаимодействуют нековалентно, как описано Winter и др. (Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)). На используемые здесь кодирующие scFv фаговые клоны и кодирующие Fab фаговые клоны собирательно ссылаются в виде «Fv-клоны фагов» или «Fv-клоны».

Набор генов VH и VL можно отдельно клонировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинировать произвольно в фаговых библиотеках, которые затем можно исследовать на наличие антигенсвязывающих клонов, как описано Winter и др. (Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)). Библиотеки из подвергнутых иммунизации источников обеспечивают антитела с высокой аффинностью к иммуногену без необходимости создания гибридом. Альтернативно, набор генов из не подвергавшихся иммунизации источников можно клонировать с обеспечением одного источника антител человека против широко ряда не являющихся аутоантигенами антигенов, а также аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths и др. (EMBO J. 12: 725-734 (1993)). Наконец, библиотеки из не подвергавшихся иммунизации источников можно также получить синтетически с помощью клонирования нереаранжированных сегментов V-генов из стволовых клеток и использования ПЦР-праймеров, содержащих произвольную последовательность, для кодирования гипервариабельных участков CDR3 и осуществления реаранжирования *in vitro*, как описано Hoogenboom и Winter (J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)).

Нитевидный фаг используют для представления фрагментов антител путем слияния с минорным белком оболочки рIII. Фрагменты антител могут быть представлены в виде одноцепочечных Fv-фрагментов, в которых области VH и VL соединены в одной и той же полипептидной цепи с помощью гибкого полипептидного спейсера, например, как описано Marks и др. (J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1997)), или в виде фрагментов Fab, в которых одна цепь слита с рIII, а вторая секретируется в периплазму бактериальной клетки-хозяина, где происходит сборка структуры Fab - белок оболочки, которая становится представленной на поверхности фага путем вытеснения некоторых белков оболочки дикого типа, например, как описано Hoogenboom и др. (Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)).

Как правило, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты генов антитела, получают из иммунных клеток, собранных от людей или животных. Если желательна библиотека, смещенная в пользу анти-EphB4 клонов, субъекта иммунизируют EphB4 для индуцирования антительного ответа и клетки селезенки и/или циркулирующие B-клетки, отличные от лимфоцитов периферической крови (PBL), извлекают для конструирования библиотеки. В предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения библиотеку фрагментов генов антител человека, смещенную в пользу анти-EphB4 клонов, получают путем индуцирования анти-EphB4 антительного ответа в трансгенных мышах, несущих набор функциональных генов иммуноглобулинов человека (и у которых отсутствует функциональная система

5 продуцирования эндогенных антител), так что иммунизация EphB4 вызывает повышение числа В-клеток, продуцирующих антитела человека против EphB4. Создание продуцирующих антитела человека трансгенных мышей описывается ниже.

Дополнительное обогащение в отношении популяций реактивных в отношении EphB4 клеток можно получить путем использования подходящей

10 процедуры скринирования для выделения В-клеток, экспрессирующих специфическое в отношении EphB4, связанное с мембраной антитела, например, путем разделения клеток с помощью EphB4-аффинной хроматографии или адсорбции клеток к меченному флюорохромом EphB4 с последующим сортированием с активацией

15 флуоресценции (FACS).

Альтернативно, применение клеток селезенки и/или В-клеток или других PBL от не подвергнутых иммунизации доноров обеспечивает лучшую представленность

20 возможного набора антител и также делает возможным конструирование библиотеки антител с использованием любого вида животного (человека или не являющегося человеком животного), в котором EphB4 не является антигенным. Для получения библиотек, включающих *in vitro* конструкцию генов антител, от субъекта получают стволовые клетки для обеспечения нуклеиновых кислот, кодирующих

25 нерearанжированные сегменты генов антител. Представляющие интерес иммунные клетки можно получить из множества видов животных, таких как человек, мышь, крыса, животные отряда Lagomorpha, волки, собаки, кошки, свиньи, коровы, лошади и птицы и т.п.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие сегменты генов вариабельных областей антител (включающие сегменты VH и VL), извлекают из представляющих интерес

30 клеток и амплифицируют. В случае библиотек реаранжированных генов VH и VL желаемую ДНК можно получить путем выделения геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами, соответствующими 5'- и 3'-концам реаранжированных генов VH и VL, как

35 описано Orlandi и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)), тем самым создавая наборы разнообразных V-генов для экспрессии. V-гены можно амплифицировать из кДНК или геномной ДНК с использованием обратных праймеров на 5' конце экзона, кодирующего зрелую V-область, и прямых праймеров,

40 основанных на последовательности в пределах J-сегмента, как описано Orlandi и др. (1989) и Ward и др. (Nature, 341: 544-546 (1989)). Однако для амплификации с кДНК обратные праймеры могут быть также основаны на последовательности в лидерном экзоне, как описано Jones и др. (Biotechnol., 9: 88-89 (1991)), а обратные праймеры - на

45 последовательности в пределах константной области, как описано Sastry и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)). Для максимизации комплементарности в праймеры может быть внесена вырожденность, как описано Orlandi и др. (1989) или Sastry и др. (1989). Предпочтительно разнообразие библиотеки максимизируют путем использования ПЦР-праймеров, нацеленных на каждое из семейств V-генов, для

50 того чтобы амплифицировать все имеющиеся размещения VH и VL, присутствующие в образце нуклеиновой кислоты иммунной клетки, например, как описано в способе Marks и др. (J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)) или как описано в способе Orum и др. (Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)). Для клонирования амплифицированной

ДНК в экспрессирующие векторы в ПЦР-праймеры можно ввести редкие рестрикционные сайты в качестве метки на одном конце, как описано Orlandi и др. (1989), или, кроме того, провести амплификацию с помощью ПЦР с использованием меченого праймера, как описано Clackson и др. (Nature, 352: 624-628 (1991)).

Наборы синтетически реаранжированных V-генов можно получить *in vitro* из сегментов V-генов. Большая часть сегментов VH-генов человека была клонирована и секвенирована (как сообщается Tomlinson и др. (J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992))) и картирована (как сообщается Matsuda и др. (Nature Genet., 3: 88-94 (1993))); эти клонированные сегменты (в том числе все основные конформации петлевых участков H1 и H2) можно использовать для создания наборов разнообразных VH-генов с использованием ПЦР-праймеров, кодирующих петлевые участки H3 разнообразной последовательности и длины, как описано Hoogenboom и Winter (J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)). VH-наборы можно также получить с использованием всего разнообразия последовательностей, сфокусированного в длинном петлевом участке H3 одной длины, как описано Barbas и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)). Сегменты V κ и V λ человека были клонированы и секвенированы (как сообщается Williams и Winter (Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993))) и могут быть использованы для создания наборов синтетических легких цепей. Наборы синтетических V-генов на основе целого ряда порядков VH и VL и длин L3 и H3 будут кодировать антитела значительного структурного разнообразия. После амплификации кодирующих V-гены ДНК сегменты V-генов зародышевой линии можно реаранжировать *in vitro* в соответствии со способами Hoogenboom и Winter (J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)).

Наборы фрагментов антител можно сконструировать объединением вместе наборов генов VH и VL несколькими способами. Каждый набор можно создать в различных векторах и векторы подвергнуть рекомбинации *in vitro*, например, как описано Hogrefe и др. (Gene, 128: 119-126 (1993)), или *in vivo* с помощью комбинаторного инфицирования, например, с использованием системы loxP, описанной Waterhouse и др. (Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). В подходе рекомбинации *in vivo* используется двухцепочечная природа фрагментов Fab для преодоления ограничения в отношении размера библиотеки, налагаемого эффективностью трансформации E.coli. Наборы VH и VL из не подвергавшихся иммунизации источников клонируют отдельно, один в фагемиду, а другой - в фаговый вектор. Две библиотеки затем объединяют с помощью инфицирования фагами содержащих фагемиды бактерий, так что каждая клетка содержит различную комбинацию, и размер библиотеки ограничен только числом присутствующих клеток (приблизительно 10¹² клонов). Оба вектора содержат сигналы рекомбинации *in vivo*, так что гены VH и VL подвергаются рекомбинации в одном репликоне и совместно упаковываются в фаговые вирионы. Эти огромные библиотеки обеспечивают большое число разнообразных антител хорошей аффинности (K_d⁻¹ приблизительно 10⁻⁸ М).

Альтернативно, наборы можно клонировать последовательно в один и тот же вектор, например, как описано Barbas и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)), или собрать вместе с помощью ПЦР и затем клонировать, например, как описано Clackson и др. (Nature, 352: 624-628 (1991)). Сборку с помощью ПЦР можно также использовать для соединения ДНК для VH и VL с ДНК, кодирующей гибкий пептидный спейсер, с образованием наборов одноцепочечных Fv (scFv). В еще одном методе используют «сборку с помощью ПЦР в клетке» для объединения генов VH

и VL внутри лимфоцитов с помощью ПЦР и затем клонирования наборов связанных генов, как описано Embleton и др. (Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)).

Антитела, продуцируемые библиотеками из не подвергавшихся иммунизации источников (или природными, или синтетическими), могут быть средней
 5 аффинности (K_d^{-1} приблизительно 10^6 - 10^7 М), но созревание аффинности можно также имитировать *in vitro* путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек, как описано Winter и др. (1994), см. выше. Например, можно неспецифически ввести мутацию *in vitro* путем использования подверженной ошибкам
 10 полимеразы (о которой сообщается Leung и др. (Technique, 1: 11-15 (1989))) в способе Hawkins и др. (J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)) или в способе Gram и др. (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)). Дополнительно, созревание аффинности можно осуществить с помощью неспецифического мутирования одного или
 15 нескольких CDR, например, с использованием ПЦР с праймерами, несущими произвольную последовательность, перекрывающую представляющий интерес CDR, в отобранных индивидуальных клонах Fv и скринирования в отношении клонов более высокой аффинности. В заявке WO 9607754 (опубликованной 14 марта 1996 г.) описывается способ индуцирования мутагенеза в определяющем комплементарность
 20 участке легкой цепи иммуноглобулина с созданием библиотеки генов легкой цепи. Другим эффективным подходом является рекомбинация областей VH и VL, отобранных с использованием фагового дисплея, с наборами встречающихся в природе вариантов V-областей, полученными из не подвергавшихся иммунизации
 25 доноров, и скринирование в отношении более высокой аффинности в нескольких циклах перетасовки цепи, как описано Marks и др. (Biotechnol., 10: 779-783 (1992)). Этот метод позволяет продуцировать антитела и фрагменты антител с аффинностями в диапазоне 10^{-9} М.

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные
 30 последовательности EphB4 известны в данной области. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую EphB4, можно сконструировать с использованием аминокислотной последовательности желаемого района EphB4. Альтернативно, можно использовать последовательность кДНК (или ее фрагмент) номера доступа
 35 в GenBank NM_004444 или последовательность, раскрытую в патенте США № 5635177. ДНК, кодирующие EphB4, можно приготовить множеством способов, известных в данной области. Эти способы включают, но без ограничения, химический синтез с помощью любого способа, описанного Engels и др. (Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)), такого как триэфирный, фосфитный, фосфорамидитный и Н-фосфонатный
 40 способы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения при конструировании кодирующей EphB4 ДНК используются кодоны, предпочтительные при экспрессии в клетке-хозяине. Альтернативно, кодирующую EphB4 ДНК можно выделить из библиотеки геномной ДНК или кДНК.

После конструирования молекулы ДНК, кодирующей EphB4, молекулу ДНК
 45 функционально связывают с контролирующей экспрессию последовательностью в экспрессирующем векторе, таком как плаزمид, причем контролирующая последовательность узнается клеткой-хозяином, трансформированной вектором. Как правило, плазмидные векторы содержат начало репликации и контролирующие
 50 последовательности, происходящие из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Вектор обычно несет начало репликации, а также последовательности, кодирующие белки, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Подходящие для экспрессии в прокариотических и эукариотических клетках-

хозяевах векторы хорошо известны в данной области, и некоторые из них дополнительно описываются здесь. Можно использовать эукариотические организмы, такие как дрожжи, или клетки, происходящие из многоклеточных организмов, таких как млекопитающие.

Необязательно ДНК, кодирующую EphB4, функционально связывают с секреторной лидерной последовательностью, приводящей к секреции продукта экспрессии клеткой-хозяином в культуральную среду. Примеры секреторных лидерных последовательностей включают последовательности stII, экотина, lamb, герпесного GD, lpp, щелочной фосфатазы, инвертазы и альфа-фактора. Для использования здесь также подходит 36 аминокислотная лидерная последовательность белка A (Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Клетки-хозяева трансфицируют и предпочтительно трансформируют описанными выше экспрессирующими или клонирующими векторами настоящего изобретения и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Трансфекция относится к приобретению клеткой-хозяином экспрессирующего вектора, независимо от того, экспрессируется ли в действительности или нет любая кодирующая последовательность. Специалистам со средним уровнем компетентности известны многочисленные способы трансфекции, например преципитация с использованием CaPO_4 и электропорация. Трансфекция обычно признается успешной, если внутри клетки-хозяина появляется какое-либо указание на действие этого вектора. Способы трансфекции хорошо известны в данной области, и некоторые из них дополнительно описываются здесь.

Трансформация означает введение ДНК в организм, так что ДНК реплицируется, или в виде экстрахромосомного элемента, или с помощью хромосомного интегранта. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют с использованием стандартных методов, соответствующих таким клеткам. Методы трансформации хорошо известны в данной области, и некоторые из них дополнительно описываются здесь.

Прокариотические клетки-хозяева, используемые для продуцирования EphB4, можно культивировать, как описывается в общем Sambrook и др. выше.

Клетки-хозяева млекопитающих, используемые для продуцирования EphB4, можно культивировать в ряде сред, хорошо известном в данной области, и некоторые из них описываются здесь.

Клетки-хозяева, на которые ссылаются в этом описании, включают клетки *in vitro* культуре, а также клетки, которые находятся внутри животного-хозяина.

Очистку EphB4 можно осуществить с использованием признанных в данной области способов, некоторые из которых описываются здесь.

Очищенный EphB4 можно присоединить к подходящей матрице, такой как агарозные шарики, акриламидные шарики, стеклянные шарики, целлюлоза, различные сополимеры акриловой кислоты, гели из метакрилата с гидроксильными группами, сополимеры полиакриловой кислоты и полиметакриловой кислоты, нейлон, нейтральные и неионные носители и т.п., для использования в аффинно-хроматографическом разделении клонов фагового дисплея. Присоединение белка EphB4 к матрице можно осуществить способами, описанными в Methods in Enzymology, vol. 44 (1976). Обычно используемый метод присоединения белкового лиганда к полисахаридным матрицам, например агарозе, декстрану или целлюлозе,

включает активацию носителя с использованием цианидов галогенов и последующее связывание первичных алифатических или ароматических аминов пептидного лиганда с активированной матрицей.

Альтернативно, EphB4 можно использовать для покрытия лунок адсорбирующих планшетов, экспрессировать на поверхности клеток-хозяев, присоединяемых к адсорбирующим планшетам, или использовать при клеточном сортировании, или конъюгировать с биотином для захвата покрытыми стрептавидином шариками, или использовать в любом другом известном в данной области технике способе пэннинга библиотек в виде фагового дисплея.

Образцы фаговой библиотеки приводят в контакт с иммобилизованным EphB4 в условиях, подходящих для связывания по крайней мере части фаговых частиц с адсорбентом. Обычно условия, включающие pH, ионную силу, температуру и т.п., выбирают для имитации физиологических условий. Фаги, связанные с твердой фазой, промывают и затем элюируют с помощью кислоты, например, как описано Barbas и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)), или щелочи, например, как описано Marks и др. (J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)), и с помощью конкуренции с антигеном EphB4, например, в процедуре, схожей со способом антигенной конкуренции Clackson и др. (Nature, 352: 624-628 (1991)). В одном цикле отбора фаги можно обогатить в 20-1000 раз. Кроме того, обогащенные фаги можно выращивать в бактериальной культуре и подвергнуть дополнительным циклам отбора.

Эффективность отбора зависит от многих факторов, в том числе кинетик диссоциации во время промывок и того, может ли одновременно входить в контакт с антигеном множество фрагментов антитела на одном фаге. Антитела с кинетиками быстрой диссоциации (и со слабой аффинностью связывания) можно удерживать с помощью использования коротких промывок, поливалентного фагового дисплея и высокой плотности покрытия антигена в твердой фазе. Высокая плотность не только стабилизирует фаг благодаря поливалентным взаимодействиям, но и способствует повторному связыванию фага, который подвергся диссоциации. Отбору антител с кинетиками медленной диссоциации (и с хорошими аффинностями связывания) можно содействовать с помощью использования длинных промывок и одновалентного фагового дисплея, как описано Bass и др. (Proteins, 8: 309-314 (1990)) и в заявке WO 92/09690, и низкой плотности покрытия антигена, как описано Marks и др. (Biotechnol., 10: 779-783 (1992)).

Можно осуществлять отбор среди фаговых антител различной аффинности, даже с аффинностями, которые слегка отличаются, к EphB4. Однако неспецифическая мутация отобранного антитела (например, как осуществлено в некоторых описанных выше методах созревания аффинности), по-видимому, продуцирует множество мутантов, при этом большинство из них будут связываться с антигеном и небольшое число будет иметь более высокую аффинность. При ограничении EphB4 редкие фаги высокой аффинности могут быть исключены. Для сохранения всех мутантов высокой аффинности фаги можно инкубировать с избытком биотинилированного EphB4, за исключением биотинилированного EphB4 в концентрации более низкой молярности, чем величина молярной аффинности к мишени EphB4. Фаги, связывающиеся с высокой аффинностью, можно затем захватить с помощью покрытых стрептавидином парамагнитных шариков. Такой «равновесный захват» делает возможным отбор антител в соответствии с их аффинностями связывания с чувствительностью, которая позволяет выделять мутантные клоны с аффинностью, превышающей лишь в два раза, из большого избытка фагов с низкой аффинностью. Для проведения различий на

основе кинетик диссоциации можно манипулировать условиями, используемыми для промывки фагов, связанных с твердой фазой.

Анти-EphB4 клоны можно активным образом выбрать. В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечиваются антитела против EphB4, 5 блокирующие связывание между лигандом EphB4 (таким как эфрин-B1, эфрин-B2 и/или эфрин-B3) и EphB4, но не блокирующие связывание между лигандом EphB4 и вторым белком (таким как EphB1, EphB2, EphB3, EphB5 и/или EphB6). Fv-клоны, соответствующие таким антителам против EphB4, можно отобрать с помощью (1) 10 выделения анти-EphB4 клонов из фаговой библиотеки, как описано выше, и необязательного амплифицирования выделенной популяции фаговых клонов с помощью выращивания популяции в подходящем бактериальном хозяине; (2) отбора EphB4 и второго белка, против которых желательна блокирующая и неблокирующая активность соответственно; (3) адсорбирования анти-EphB4 фаговых 15 клонов на иммобилизованных EphB4; (4) использования избытка второго белка для элюции любых нежелательных клонов, которые узнают детерминанты связывания EphB4, которые перекрываются с детерминантами связывания второго белка или совместно используются им; и (5) элюции клонов, которые остаются адсорбированными после стадии (4). Необязательно, клоны с желаемыми 20 блокирующими/неблокирующими свойствами можно дополнительно обогатить путем повторения описанных здесь процедур отбора один или несколько раз.

ДНК, кодирующую продуцируемые гибридомой моноклональные антитела или Fv-клоны фагового дисплея, настоящего изобретения легко выделить и секвенировать, 25 используя общепринятые процедуры (например, используя олигонуклеотидные праймеры, сконструированные для специфической амплификации представляющих интерес кодирующих тяжелую и легкую цепи областей с гибридной или фаговой ДНК в качестве матрицы). После выделения ДНК можно встроить в экспрессирующие 30 векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки E.coli, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или миеломные клетки, которые в противном случае не продуцируют белок в виде иммуноглобулина, для получения синтеза желаемых моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи, касающиеся рекомбинантной экспрессии в 35 бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) и Pluckthum, Immunol. Revs., 130: 151 (1992).

ДНК, кодирующую Fv-клоны настоящего изобретения, можно объединить с известной ДНК-последовательностью, кодирующей константные области тяжелой 40 и/или легкой цепи (например, соответствующие ДНК-последовательности можно получить от Kabat и др., см. выше.) с образованием клонов, кодирующих полноразмерные или частичные тяжелые и/или легкие цепи. Понятно, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, в том числе константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут 45 быть получены из любого вида человека или животного. Fv-клон, происходящий из ДНК варибельной области животного одного вида (например, человека) и затем слитый с ДНК константной области животного другого вида с образованием кодирующей «гибрид», полноразмерную тяжелую цепь и/или полноразмерную легкую 50 цепь, последовательности(ей), включен в определение «химерного» и «гибридного» антитела, используемого здесь. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения Fv-клон, происходящий из ДНК варибельной области человека, сливают с ДНК константной области человека с образованием

последовательности(ей), кодирующей полноразмерные и частичные тяжелые и/или легкие цепи человека.

ДНК, кодирующую продуцируемое гибридомой антитело против EphB4 настоящего изобретения, можно также модифицировать, например, путем замены последовательностями, кодирующими константные области тяжелой и легкой цепи человека, гомологичных крысиных последовательностей, происходящих из гибридного клона (например, в способе Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующую продуцируемое гибридомой или Fv-клоном антитело или фрагмент, можно, кроме того, модифицировать путем ковалентного соединения с кодирующей иммуноглобулин последовательностью всей или части последовательности, кодирующей не являющийся иммуноглобулином полипептид. Таким образом готовят «химерные» или «гибридные» антитела, имеющие специфичность связывания антител, продуцируемых Fv-клоном или гибридным клоном, настоящего изобретения.

Фрагменты антител

Настоящим изобретением охватываются фрагменты антител. При определенных обстоятельствах выгодно использовать фрагменты антител, а не целые антитела. Меньший размер фрагментов делает возможным быстрый клиренс и может привести к лучшему доступу к солидным опухолям.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно такие фрагменты получали через протеолитическое расщепление интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); и Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). Однако в настоящее время эти фрагменты могут продуцироваться непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Фрагменты антител Fab, Fv и scFv можно экспрессировать и секретировать из E.coli, что позволяет, таким образом, облегчить продукцию больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделить из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменты можно непосредственно выделить из E.coli и химически связать с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделить непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с увеличенным in vivo периодом полураспада, включающие остатки связывающего эпитопа рецептора выживаемости, описаны в патенте США № 5869046. Для квалифицированного специалиста-практика очевидны другие методы получения фрагментов антител. В других вариантах осуществления настоящего изобретения предпочтительным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185, патенты США № 5571894 и 5587458. Fv и scFv являются единственными разновидностями с интактными сайтами связывания, в которых отсутствуют константные области; следовательно, они подходят для уменьшения неспецифического связывания во время использования in vivo. Слитые с scFv белки можно сконструировать для получения слияния эффекторного белка с амино- или карбокси-концом scFv. См., Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела может также быть «линейным антителом», например, описанным в патенте США № 5641870. Такие фрагменты - линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Гуманизированные антитела

Настоящим изобретением охватываются гуманизированные антитела. Различные способы гуманизации антител не являющихся человеком видов описаны в данной

области. Например, гуманизированное антитело может иметь один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, не являющегося человеком. На эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто приводится ссылка в виде «импортированные» остатки, которые обычно берут из «импортируемой»

5
10
15

вариабельной области. Гуманизацию можно по существу выполнить согласно способу Winter и соавторов (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)) путем замещения последовательностями гипервариабельных участков соответствующих последовательностей антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), в которых заметно менее чем интактная вариабельная область человека была замещена соответствующей последовательностью из не являющихся человеком видов. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека,

15
20
25
30

в которых некоторые остатки гипервариабельных участков и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных сайтов антител грызунов.

Выбор вариабельных областей человека, как легкой, так и тяжелой цепей, используемых при получении гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности. В соответствии с так называемым способом «оптимальной подгонки» последовательность вариабельной области антитела грызунов используют для скрининга всей библиотеки известных последовательностей вариабельных областей человека. Последовательность человека, являющуюся самой близкой к последовательности грызуна, затем берут в качестве каркасной области (FR) человека для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). В другом способе используется конкретная каркасная область, происходящая из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одну и ту же каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

35
40
45
50

Кроме того, важно, чтобы антитела подвергались гуманизации с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели в соответствии с одним способом гуманизированные антитела готовят с использованием процесса анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходной и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов обычно доступны и знакомы квалифицированным в данной области специалистам. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры отобранных последовательностей иммуноглобулинов-кандидатов. Обследование этих отображений делает возможным анализ вероятной роли остатков в функционировании последовательности иммуноглобулина-кандидата, т.е. анализ остатков, которые оказывают влияние на способность иммуноглобулина-кандидата связываться со своим антигеном. Таким образом, остатки FR можно отобрать и объединить из реципиентных и импортируемых последовательностей так, чтобы достигалась желаемая характеристика антитела, например увеличенная аффинность к целевому антигену(ам). Как правило, остатки гипервариабельных участков непосредственно и наиболее заметно оказывают влияние на связывание с антигеном.

Антитела человека

Антитела человека против EphB4 настоящего изобретения можно сконструировать

объединением последовательности(ей) вариабельной области Fv-клона из происходящих от человека библиотек в виде фагового дисплея с известной последовательностью(ями) константной области человека, как описано выше.

Альтернативно, моноклональные антитела человека против EphB4 настоящего изобретения можно получить с помощью гибридомной технологии. Для продукции моноклональных антител человека описаны линии миеломных клеток человека и линии гетеромиеломных мышинных-человеческих клеток, например Kozbor (J. Immunol., 133: 3001 (1984)); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) и Boerner и др. (J. Immunol., 147: 86 (1991)).

В настоящее время можно получить трансгенных животных (например, мышей), которые способны, при иммунизации, продуцировать полный набор антител человека в отсутствие эндогенной продукции иммуноглобулинов. Например, описано, что гомозиготная делеция гена области соединения (JH) тяжелой цепи антитела у химерных и зародышевых мутантных мышей приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антитела. Перенос набора генов зародышевых иммуноглобулинов человека в таких зародышевых мутантных мышей приведет к продукции антител человека при введении антигена. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

Можно также использовать перетасовку гена для получения антител человека из нечеловеческих, например крысиных, антител, причем антитело человека имеет аффинности и специфичности, сходные с аффинностями и специфичностями исходного нечеловеческого антитела. В соответствии с этим способом, который также называют «эпитопным импринтингом», вариабельную область или тяжелой, или легкой цепи фрагмента нечеловеческого антитела, полученного с помощью методов фагового дисплея, как описано выше, замещают набором генов V-областей человека, создавая популяцию химер нечеловеческая цепь/человеческая цепь scFv или Fab. Отбор с использованием антигена приводит к выделению химерных нечеловеческая цепь/человеческая цепь scFv или Fab, в которых человеческая цепь восстанавливает антигенсвязывающий сайт, разрушенный при извлечении соответствующей нечеловеческой цепи в первичном клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп руководствуется (отпечатывает) вариантом партнера в виде цепи человека. Повторяя процесс для того, чтобы заместить оставшуюся нечеловеческую цепь, получают антитело человека (см. заявку PCT WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.). В отличие от традиционной гуманизации нечеловеческих антител с помощью пересадки CDR, этот метод обеспечивает полностью человеческие антитела, которые не имеют остатков FR или CDR нечеловеческого происхождения.

Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, предпочтительно антитела человека или гуманизированные антитела, обладающие специфичностями связывания с по крайней мере двумя различными антигенами. В настоящем случае одна из специфичностей связывания является специфичностью связывания с EphB4, а вторая - с любым другим антигеном. Например, биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами белка EphB4. Биспецифические антитела можно также использовать для локализации цитотоксических агентов на клетках, экспрессирующих EphB4. Эти антитела обладают связывающим EphB4 плечом и плечом, которое связывает цитотоксический агент (например, сапорин, анти-интерферон- α , винкаалкалоид, А-цепь рицина, метотрексат

или содержащий радиоактивный изотоп гаптен). Биспецифические антитела можно приготовить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела $F(ab')_2$).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области.

Традиционно рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессии пар тяжелая цепь-легкая цепь двух иммуноглобулинов, где две тяжелые цепи имеют различные специфичности (Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Из-за случайного расхождения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) продуцируют возможную смесь 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно осуществляют с помощью стадий аффинной хроматографии, является довольно громоздкой, а выходы продуктов низкими. Схожие методики раскрыты в заявке WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993 г., и Traunecker и др. (EMBO J., 10: 3655 (1991)).

В соответствии с отличным и более предпочтительным подходом переменные области антитела с желаемыми специфичностями связывания (сайтами соединения антитела с антигеном) сливают с последовательностями константных областей иммуноглобулинов. Предпочтительно слияние осуществляют с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, включающей по крайней мере часть шарнирной, CH2 и CH3 областей. Предпочтительно, чтобы первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствовала в по крайней мере одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния с тяжелой цепью иммуноглобулина и, если желательно, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и котрансфицируют в подходящий организм-хозяина. Это обеспечивает большую гибкость в регулировании соотношений трех полипептидных фрагментов в тех вариантах осуществления, при которых неравное соотношение трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивает оптимальные выходы. Однако можно построить последовательности, кодирующие две или все три полипептидные цепи, в один экспрессирующий вектор, когда экспрессия по крайней мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или когда соотношения не имеют особого значения.

В предпочтительном варианте этого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридной пары тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина (с обеспечением второй специфичности связывания) в другом плече. Обнаружено, что эта несимметричная структура облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкость способа отделения. Этот подход описан в WO 94/04690. В отношении дополнительных подробностей получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

В соответствии с другим подходом область контакта между парой молекул антитела можно сконструировать с максимизацией процента гетеродимеров, извлекаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная область контакта включает по крайней мере часть C_H3-области константной области антитела. В этом способе одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот с поверхности контакта первой молекулы антитела замещают более большими боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие

«углубления» размером, идентичным или схожим с размером больших боковых цепей (цепи), создают на поверхности контакта второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот более маленькими (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера в сравнении с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают сшитые антитела или «гетероконъюгаты». Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое - с биотином. Такие антитела предложили, например, для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/00373 и EP 03089). Антитела в виде гетероконъюгатов можно получить, используя любые подходящие способы сшивания. Подходящие сшивающие агенты хорошо известны в данной области и раскрыты в патенте США № 4676980 вместе с рядом методов сшивания.

В литературе также описаны методы получения биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела можно приготовить с помощью химической связи. Brennan и др. (Science, 229: 81 (1985)) описывают методику, в которой интактные антитела протеолитически расщепляют с образованием фрагментов $F(ab')_2$. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии дитиольного комплексообразующего агента натрия арсенита для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения межмолекулярного дисульфидного образования. Образованные фрагменты Fab' затем превращают в производные тионитробензоата (TNB). Одно из производных Fab' -TNB затем вновь превращают в Fab' -тиол с помощью восстановления с использованием меркаптоэтиламина и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab' -TNB с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве агентов для избирательной иммобилизации ферментов.

Недавний прогресс способствовал прямому извлечению фрагментов Fab' -SH из *E.coli*, которые могут быть химически сшиты с образованием биспецифических антител. Shalaby и др. (J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)) описывают получение полностью гуманизированного биспецифического антитела в виде молекулы $F(ab')_2$. Каждый фрагмент Fab' отдельно секретировался из *E.coli*, и его подвергали регулируемому химическому сшиванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Образованное таким образом биспецифическое антитело было способно связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор HER2, и нормальными Т-клетками человека, а также инициировать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против мишеней-опухолей молочной железы человека.

Также описаны различные методы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела получали, используя лейциновые молнии (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)). Пептиды в виде лейциновых молний белков Fos и Jun связывали с частями Fab' двух различных антител с помощью слияния генов. Антитела в виде гомодимеров восстанавливали в шарнирной области с образованием мономеров и затем вновь окисляли с образованием антител в виде гетеродимеров. Этот способ можно также использовать для получения антител в виде гомодимеров. Технология «диател», описанная Hollinger и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)), обеспечила альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител. Фрагменты включают переменную область тяжелой цепи (VH), соединенную с переменной областью

легкой цепи (VL) с помощью линкера, являющегося слишком коротким для того, чтобы сделать возможным спаривание двух областей одной и той же цепи.

Соответственно, области VH и VL одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными областями VH и VL другого фрагмента с образованием, таким образом, двух антигенсвязывающих сайтов. Также сообщалось о другой стратегии получения фрагментов биспецифических антител с помощью использования димеров одноцепочечных Fv (scFv). См. Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Предусмотрены антитела с более чем двумя валентностями. Например, можно приготовить триспецифические антитела (Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)).

Поливалентные антитела

Поливалентные антитела могут подвергаться интернализации (и/или катаболизму) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем двухвалентные антитела. Антитела настоящего изобретения могут быть поливалентными антителами (отличными от класса IgM) с тремя или более антигенсвязывающими сайтами (например, четырехвалентными антителами), которые можно легко продуцировать с помощью рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может включать область димеризации и три или более антигенсвязывающих сайтов.

Предпочтительная область димеризации включает (или состоит из) фрагмент Fc или шарнирную область. В этом сценарии антитело будет включать фрагмент Fc и три или более антигенсвязывающих сайтов, являющихся аминоконцевыми относительно фрагмента Fc. Предпочтительное здесь поливалентное антитело включает (состоит из) от трех до приблизительно восьми, но предпочтительно четырех,

антигенсвязывающих сайтов. Поливалентное антитело включает по крайней мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидных цепи), причем полипептидная цепь(и) включает две или более переменных области. Например,

полипептидная цепь(и) может включать VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, где VD1 представляет собой первую переменную область, VD2 представляет собой вторую переменную область, Fc представляет собой одну полипептидную цепь фрагмента Fc, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или полипептид и n представляет собой число, равное 0 или 1. Например, полипептидная цепь(и) может включать цепь VH-CH1-гибкий линкер-VH-CH1-Fc или VH-CH1-VH-CH1-Fc.

Поливалентное антитело здесь предпочтительно, кроме того, включает по крайней мере два (и предпочтительно четыре) полипептида переменных областей легкой цепи. Поливалентное антитело здесь может, например, включать от приблизительно двух до приблизительно восьми полипептидов переменных областей легкой цепи.

Полипептиды переменных областей легкой цепи, предусмотренные здесь, включают переменную область легкой цепи и необязательно включают, кроме того, область CL.

Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрена модификация(и) аминокислотной последовательности антител, описанных здесь.

Например, может быть желательным увеличение аффинности связывания и/или улучшение других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной

последовательности антитела готовят путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту антитела или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей антитела. В конечной конструкции

может присутствовать любая комбинация делеции, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми свойствами. Изменения аминокислот можно внести в аминокислотную последовательность антитела, о котором идет речь, в момент получения последовательности.

Пригодный способ идентификации определенных остатков или районов антитела, имеющих предпочтительное для мутагенеза местоположение, называют «сканирующим аланином мутагенезом», как описано Cunningham и Wells (Science, 244: 1081-1085 (1989)). В этом способе остаток или группу целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) для оказания влияния на взаимодействие аминокислот с антигеном. Местоположения аминокислот, демонстрирующие функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют путем введения дополнительных или других вариантов в места замены. Таким образом, несмотря на то что место введения вариации в аминокислотную последовательность заранее определено, природа самой мутации необязательно должна быть заранее определена. Например, для анализа функционирования мутации в данном месте осуществляют сканирующий аланином мутагенез или неспецифический мутагенез в целевом кодоне или районе, и экспрессированные иммуноглобулины скринируют на желаемую активность.

Вставки в аминокислотную последовательность включают amino- и/или карбоксил-концевые слияния, длина которых находится в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также вставки внутрь последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с метионильным остатком на N-конце или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие вставочные варианты молекулы антитела включают слияние фермента (например, для ADEPT) или полипептида, который увеличивает период полураспада антитела в сыворотке, с N- или C-концом антитела.

Гликозилирование полипептидов обычно является или N-связанным, или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводной составляющей к боковой цепи остатка аспарагина. Для ферментативного присоединения углеводной составляющей к боковой цепи аспарагина узнаваемыми последовательностями являются трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина. Таким образом, присутствие одной из этих двух трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикаминокислоте, наиболее часто серину или треонину, хотя могут также использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление к антителу сайтов гликозилирования традиционно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение может быть также осуществлено путем добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Если антитело включает фрагмент Fc, углевод, присоединяемый к нему, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует

фукоза, присоединенной к фрагменту Fc антитела, описаны в заявке US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). На антитела с биссекторным N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к фрагменту Fc антитела, ссылаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al., и патенте США № 6602684, Umana et al. Об антителах с по крайней мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к фрагменту Fc антитела, сообщается в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.), касающиеся антител с измененным углеводом, присоединенным к фрагменту Fc антитела. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.) в отношении антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

Предпочтительный вариант гликозилирования здесь включает фрагмент Fc, к которому присоединяется углеводная структура, в которой отсутствует фукоза. Такие варианты имеют увеличенную ADCC-функцию. Необязательно фрагмент Fc, кроме того, включает одну или несколько аминокислотных замен, которые дополнительно увеличивает ADCC, например замены в положениях 298, 333 и/или 334 фрагмента Fc (Eu-нумерация остатков). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным в отношении фукозы» антителам, включают US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные в отношении фукозилирования белков (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); заявка US 2003/0157108 A1, Presta, L.; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и дефицитные линии клеток, такие как дефицитные в отношении гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, клетки CHO (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Другим типом варианта является вариант аминокислотной замены. В этих вариантах по крайней мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен отличным остатком. Представляющие наибольший интерес места для мутагенеза с заменой включают гипервариабельные участки, но также предусмотрены изменения в FR. Консервативные замены представлены в таблице 1 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то можно ввести более существенные замены, обозначенные в таблице 1 «примеры замен» или дополнительно описанные ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты скринируют.

Таблица 1		
Первоначальный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu

Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляют путем отбора замен, которые значительно отличаются по их эффекту на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени, или (в) массы боковых цепей. Встречающиеся в природе остатки можно разделить на группы на основе общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, оказывающие влияние на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены влекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс.

Один из типов вариантов замен включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельных участков исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, получаемый в результате вариант(ы), отбираемый для дальнейшей разработки, имеет улучшенные биологические свойства относительно исходного антитела, из которого они получены. Подходящий способ получения таких вариантов замены представляет собой созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Кратко, несколько сайтов гипервариабельных участков (например, 6-7 сайтов) мутируют с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Антитела, полученные таким образом, представляются в частицах нитеобразных фагов в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованных внутри каждой частицы. Представляемые фагами варианты затем скринируют на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как здесь раскрыто. Для идентификации сайтов гипервариабельных участков - кандидатов на модификацию - можно осуществить сканирующий аланином мутагенез с идентификацией остатков гипервариабельных участков, вносящих значительный вклад в связывание с антигеном. Альтернативно или дополнительно, может быть полезным анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие остатки контакта и близлежащие остатки являются кандидатами на замену в соответствии с методами, разработанными здесь. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, как здесь описано, и антитела с лучшими свойствами в одном или нескольких релевантных исследованиях могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, готовят с использованием множества способов,

известных в данной области. Эти способы включают, но без ограничения, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотных последовательностей) или приготовление с помощью опосредуемого олигонуклеотидами (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза с использованием ПЦР и кассетного мутагенеза ранее приготовленного варианта или не являющейся вариантом версии антитела.

Может быть желательным введение одной или нескольких аминокислотных модификаций в фрагмент Fc полипептидов иммуноглобулинов настоящего изобретения, создавая таким образом вариант фрагмента Fc. Вариант фрагмента Fc может включать последовательность фрагмента Fc человека (например, фрагмента Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), включающую модификацию (например, замену) аминокислоты в одном или нескольких положениях аминокислот, в том числе цистеина шарнирной области. В соответствии с описанием настоящего изобретения и учениями данной области предусматривается, что в некоторых вариантах осуществления антитела, используемое в способах настоящего изобретения, может включать одно или несколько изменений по сравнению с аналогичным антителом дикого типа, например, во фрагменте Fc. Эти антитела, тем не менее, будут сохранять по существу те же самые свойства, требуемые для терапевтического применения, что и его аналог дикого типа. Например, полагают, что во фрагмент Fc можно внести определенные изменения, которые приведут к изменению (т.е. увеличению или уменьшению) связывания C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описывается в WO 99/51642. См. также Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260, патент США № 5624821 и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов фрагмента Fc. В WO 00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описываются варианты антител с увеличенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включается сюда посредством ссылки. См. также Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным периодом полураспада и увеличенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который ответственен за перенос IgG матери плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), описаны в заявке US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела включают фрагмент Fc с одной или несколькими заменами, которые увеличивают связывание фрагмента Fc с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями фрагмента Fc и увеличенной или уменьшенной способностью связывать C1q описываются в патенте США № 6194551 B1, WO 99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включается сюда посредством ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Производные антител

Антитела настоящего изобретения можно, кроме того, модифицировать так, чтобы они содержали дополнительные небелковоподобные составляющие, которые известны в данной области и легко доступны. Предпочтительно составляющие, подходящие для дериватизации антитела, являются водорастворимыми полимерами.

Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но без ограничения, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (или гомополимеры, или произвольные сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль,

гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущества при производстве вследствие его стабильности в воде. Полимеры могут
 5 быть любой молекулярной массы и могут быть разветвленными или неразветвленными. Число полимеров, присоединяемых к антителу, может варьировать, и если присоединяется больше одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. Как правило, число и/или тип
 10 используемых для дериватизации полимеров можно определить на основе рассмотрений, включающих, но без ограничения, конкретные свойства или функции антитела, которые необходимо улучшить, то, будет ли производное антитела использоваться для лечения при определенных условиях, и т.п.

Скринирование антител с желаемыми свойствами

15 Антитела настоящего изобретения можно охарактеризовать по их физическим/химическим свойствам и биологическим функциям с помощью различных анализов, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела характеризуются одним или несколькими
 20 следующими свойствами и/или функциями: уменьшением или блокированием активации EphB4, уменьшением или блокированием молекулярной передачи сигнала в прямом направлении от EphB4, уменьшением или блокированием активации лиганда EphB4, уменьшением или блокированием молекулярной передачи сигнала в прямом направлении от лиганда EphB4, нарушением или блокированием связывания
 25 лиганда (например, эфрина-B1, эфрина-B2 и/или эфрина-B3) с EphB4, фосфорилирования EphB4, и/или образования мультимеров EphB4, и/или фосфорилирования лиганда EphB4, и/или лечением, и/или предотвращением опухоли, нарушения пролиферации клеток или рака, и/или лечением или предотвращением
 30 нарушения, ассоциируемого с экспрессией и/или активностью EphB4 (например, увеличенной экспрессией и/или активностью EphB4).

Очищенные антитела можно, кроме того, охарактеризовать с помощью ряда анализов, включающих, но без ограничения, N-концевое секвенирование, аминокислотный анализ, жидкостную гель-хроматографию при высоком давлении в
 35 неденатурирующих условиях (HPLC), масс-спектрографический анализ, ионообменную хроматографию и расщепление папаином.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения получаемые здесь антитела анализируют в отношении их биологической активности. В некоторых
 40 вариантах осуществления настоящего изобретения антитела настоящего изобретения проверяют на их антигенсвязывающую активность. Анализы связывания антигена, которые известны в данной области и могут здесь использоваться, включают, без ограничения, любые прямые или конкурентные анализы связывания с использованием методов, таких как вестерн-блоттинги, радиоиммуноанализы, ELISA (твердофазный
 45 иммуноферментный анализ), «сэндвич»-иммуноанализы, анализы иммунопреципитации, флуоресцентные иммуноанализы и иммуноанализы с использованием белка А. Иллюстративный анализ связывания антигена представлен ниже в разделе «Примеры».

50 В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечиваются моноклональные антитела против EphB4, которые конкурируют с антителом 30.35, 30.35.1D2 и/или 30.35.2D8 за связывание EphB4. Такие конкурирующие антитела включают антитела, которые узнают эпитоп EphB4, который является тем же самым

или перекрывается с эпитопом EphB4, узнаваемым антителом 30.35, 30.35.1D2 и/или 30.35.2D8. Такие конкурирующие антитела можно получить скринированием супернатантов анти-EphB4 гибридом в отношении связывания с иммобилизованным EphB4 при конкуренции с меченым антителом 30.35, 30.35.1D2 и/или 30.35.2D8. Супернатант гибридомы, содержащий конкурирующее антитело, будет уменьшать количество связанного, меченого антитела, определяемое в смеси подлежащего исследованию конкурентного связывания, по сравнению с количеством связанного, меченого антитела, определяемым в смеси контрольного связывания, содержащей нерелевантное (или нет) антитело. Любой анализ конкурентного связывания, описанный здесь, подходит для использования в вышеприведенной процедуре.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается моноклональное антитело против EphB4, которое включает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5 и/или 6) HVR антитела 30.35, 30.35.1D2 и/или 30.35.2D8. Моноклональное антитело против EphB4, которое включает один или несколько HVR антитела 30.35, 30.35.1D2 и/или 30.35.2D8, можно сконструировать пересадкой одного или нескольких HVR антитела 30.35, 30.35.1D2 и/или 30.35.2D8 в матричную последовательность антитела, например последовательность антитела человека, являющуюся самой близкой к соответствующей крысиной последовательности исходного антитела, или консенсусную последовательность всех антител человека в конкретной подгруппе легкой или тяжелой цепи исходного антитела, и экспрессией получаемой в результате последовательности(ей) химерной вариабельной области легкой и/или тяжелой цепи, с или без сопутствующей последовательности(ей) константной области, в рекомбинантных клетках-хозяевах, как здесь описывается.

Антитела против EphB4 настоящего изобретения, обладающие уникальными свойствами, описанными здесь, можно получить скринированием анти-EphB4 гибридомных клонов в отношении желаемых свойств с помощью любого подходящего способа. Например, если желательным является моноклональное антитело против EphB4, которое блокирует или не блокирует связывание лигандов EphB4 с EphB4, антитело-кандидат можно проверить в анализе конкурентного связывания, таком как ELISA конкурентного связывания, при котором лунки планшета покрывают EphB4, покрытые планшеты покрывают слоем раствора антитела в избытке представляющего интерес лиганда Eph, и связанное антитело определяют ферментативно, например, с помощью приведения в контакт связанного антитела с антителом против Ig, конъюгированным с HRP, или биотинилированным антителом против Ig, и развития цветной реакции HRP, например, с помощью проявления планшетов с использованием стрептавидина-HRP и/или перекиси водорода и определения цветной реакции HRP с помощью спектрофотометрии при 490 нм с использованием ELISA-считывающего устройства для планшетов.

Если желательным является антитело против EphB4, которое ингибирует или активирует активацию EphB4, антитело-кандидат можно проверить в анализе фосфорилирования EphB4. Такие анализы известны в данной области, и один такой анализ описывается в разделе «Примеры».

Если желательным является антитело против EphB4, которое ингибирует рост клеток, антитело-кандидат можно проверить в *in vitro* и/или *in vivo* анализах, с помощью которых определяется ингибирование роста клеток. Такие анализы известны в данной области и дополнительно описываются и приводятся в качестве примеров здесь.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предусматривается измененное антитело, обладающее некоторыми, но не всеми, эффекторными функциями, которые делают его желаемым кандидатом для многих применений, в которых важен период полураспада антитела *in vivo*, в то время как определенные эффекторные функции (такие как активация комплемента и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения измеряют активности Fc полученных иммуноглобулинов для гарантии того, что сохраняются только желаемые свойства. *In vitro* и/или *in vivo* цитотоксические анализы можно провести для подтверждения уменьшения/истощения активностей CDC и/или ADCC. Например, можно провести анализы связывания с рецептором Fc (FcR) для гарантии того, что антитело не связывает Fc γ R (следовательно, у него, вероятно, отсутствует активность ADCC), но у него сохраняется способность связывать FcRn. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK, экспрессируют только Fc γ RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Резюме экспрессии FcR на гемопоэтических клетках - это таблица 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 477-492 (1991). Пример *in vitro* анализа для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описан в патенте США № 5500362 или 5821337. Применимые для таких анализов эффекторные клетки включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) или природные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в модели на животном, такой как модель, описанная Clynes и др. (PNAS (USA) 95: 652-656 (1998)). Можно также провести анализ связывания C1q для подтверждения того, что антитело не способно связывать C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC, например, как описано Gazzano-Santoro и др. (J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)). Определения связывания с FcRn и *in vivo* клиренса/периода полураспада можно также провести с использованием способов, известных в данной области, например тех, которые описываются в разделе «Примеры».

Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы

Для рекомбинантной продукции антитела настоящего изобретения кодирующую его нуклеиновую кислоту выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии. Кодирующую антитело ДНК легко выделить и секвенировать с использованием традиционных процедур (например, с помощью использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). В наличие имеется множество векторов. Выбор вектора отчасти зависит от используемой клетки-хозяина. Как правило, предпочтительными клетками-хозяевами являются клетки или прокариотического, или эукариотического (обычно клетки млекопитающих) происхождения. Понятно, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, в том числе константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены из любого вида человека или животного.

а. Создание антител с использованием прокариотических клеток-хозяев

1. Векторная конструкция

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела настоящего изобретения, можно получить, используя стандартные рекомбинантные методы. Желаемые полинуклеотидные последовательности можно

выделить и секвенировать из продуцирующих антитело клеток, таких как клетки гибридомы. Альтернативно, полинуклеотиды можно синтезировать, используя нуклеотидный синтезатор или методы ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полинуклеотиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный реплицироваться и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. Для цели настоящего изобретения можно использовать множество векторов, имеющих и известных в данной области. Выбор соответствующего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, встраиваемых в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подвергаемой трансформации вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификации или экспрессии гетерологичных полинуклеотидов или обеих) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно включают, но без ограничения, начало репликации, ген селективного маркера, промотор, сайт связывания рибосом (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и контролирующие последовательности, происходящие из вида, совместимого с клеткой-хозяином, используются в связи с этими хозяевами. Векторы обычно несут начало репликации, а также маркерные последовательности, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E. coli* обычно трансформируют pBR322, плазмидой, происходящей из вида *E. coli*. pBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, следовательно, обеспечивает легкий способ идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг могут также содержать или быть модифицированы для содержания промоторов, которые могут использоваться микробным организмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описываются Carter и др. (патент США № 5648237).

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контролирующие последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином, можно использовать в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-11, можно использовать для получения рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Экспрессирующий вектор настоящего изобретения может включать две и более пары промотор-цистрон, каждая из которых кодирует полипептидный компонент. Промотор представляет собой нетранслируемую регулируемую последовательность, расположенную 5' от цистрона, которая регулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно распадаются на два класса, индуцибельные и конститутивные промоторы. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует увеличение уровней транскрипции цистрона под своим контролем в ответ на изменения условий культуры, например присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Хорошо известно большое число промоторов, узнаваемых рядом возможных клеток-хозяев. Выбранный промотор можно функционально связать с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, с помощью извлечения промотора из источника ДНК посредством расщепления рестрикционными ферментами и

встраивания выделенной промоторной последовательности в вектор настоящего изобретения. Как встречающиеся в природе промоторные последовательности, так и многие гетерологичные промоторы можно использовать для направления амплификации и/или экспрессии целевых генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения используются гетерологичные промоторы, поскольку они обычно делают возможными транскрипцию на более высоком уровне и более высокие выходы экспрессируемого целевого гена по сравнению со встречающимся в природе промотором целевого полипептида.

Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, системы β -галактамазного и лактозного промоторов, систему триптофанового (trp) промотора и гибридные промоторы, такие как промотор tac или trc. Однако также подходят другие промоторы, являющиеся функциональными в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности опубликованы, что позволяет, таким образом, квалифицированному специалисту функционально лигировать их с цистронами, кодирующими целевые легкую и тяжелую цепи (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269), используя линкеры или адаптеры, обеспечивающие любые требуемые рестрикционные сайты.

В одном аспекте настоящего изобретения каждый цистрон в пределах рекомбинантного вектора включает компонент в виде секреторной сигнальной последовательности, который направляет перемещение экспрессированных полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, или она может быть частью ДНК целевого полипептида, которую встраивают в вектор. Сигнальная последовательность, выбираемая для цели настоящего изобретения, должна быть последовательностью, узнаваемой и процессируемой (т.е. расщепляемой сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не узнают и не процессируют сигнальные последовательности, свойственные гетерологичным полипептидам, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбираемой, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA и MBP. В одном варианте осуществления настоящего изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах экспрессирующей системы, являются сигнальными последовательностями STII или их вариантами.

В другом аспекте продукция иммуноглобулинов в соответствии с настоящим изобретением происходит в цитоплазме клетки-хозяина, и, следовательно, не требуется, чтобы секреторные сигнальные последовательности находились в каждом цистроне. Вследствие этого легкая и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируются, подвергаются укладке и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы хозяев (например, trxB-штаммы E.coli) обеспечивают условия в цитоплазме, которые являются благоприятными для образования дисульфидной связи, что позволяет, таким образом, экспрессированным белковым субъединицам правильно укладываться и собираться (Proba and Pluckthun Gene, 159: 203 (1995)).

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител настоящего изобретения, включают Archaeobacteria и Eubacteria, например, грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры применимых бактерий

включают *Escherichia* (например, *E.coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, род *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В одном варианте осуществления настоящего изобретения используют грамотрицательные клетки. В

5 одном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве хозяев настоящего изобретения используют клетки *E.coli*. Примеры штаммов *E.coli* включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; № 27325 депонирования в ATCC)

10 и его производные, включающие штамм 33D3, имеющий генотип W3110 Δ*hlyA* (Δ*tonA*) *ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-ferE) degP41 kanR* (патент США № 5639635). Также применимы другие штаммы и их производные, такие как *E.coli* 294 (ATCC 31446), *E.coli* B, *E.coli* 1776 (ATCC 31537) и *E.coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры являются

15 иллюстративными, а не ограничивающими. Способы конструирования производных любой из упоминаемой выше бактерии, имеющей определенный фенотип, известны в данной области и описаны, например, Bass и др. (Proteins 8: 309-314 (1990)). Обычно необходимо выбрать соответствующие бактерии, принимая во внимание

20 репликативность репликона в клетках бактерии. Например, *E.coli*, *Serratia* или род *Salmonella* можно подходящим образом использовать в качестве хозяев при использовании хорошо известных плазмид, таких как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410, для обеспечения репликона. Обычно клетка-хозяин секретирует минимальные количества протеолитических ферментов, и при желании в культуру

клеток можно включить дополнительные ингибиторы протеаз.

25 *ii. Продукция антител*

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими векторами и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных

30 соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Трансформация означает введение ДНК в прокариотический хозяин, так что ДНК реплицируется, или в виде экстрахромосомного элемента, или с помощью

хромосомного интегранта. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют с использованием стандартных методов,

35 соответствующих таким клеткам. Для бактериальных клеток, обладающих значительными барьерами в виде клеточной стенки, обычно используют обработку кальцием, в которой используется хлорид кальция. В другом способе трансформации используется полиэтиленгликоль/DMSO. В еще одном способе используется

40 электропорация.

Прокариотические клетки, используемые для продуцирования полипептидов настоящего изобретения, выращивают в средах, известных в данной области и

подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих

45 сред включают среду Лурия (LB) плюс добавки необходимых питательных веществ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения среды также содержат селективный агент, выбираемый на основе конструкции экспрессирующего вектора, позволяющий избирательно расти прокариотическим клеткам, содержащим

экспрессирующий вектор. Например, в среду для роста клеток, экспрессирующих ген

50 устойчивости к ампициллину, добавляют ампициллин.

Помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата можно также включить в соответствующих концентрациях любые необходимые добавки, вводимые

отдельно или в виде смеси с другой добавкой или средой, такие как комплексный

источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или несколько восстанавливающих агентов, выбираемых из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамин, тиогликоллята, дитиоэритритола и дитиотрейтола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах.

5 Для роста *E.coli*, например, предпочтительные температуры находятся в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, более предпочтительно от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C, даже более предпочтительно при приблизительно 30°C. pH среды может быть любым pH, находящимся в диапазоне от 10 приблизительно 5 до приблизительно 9, в зависимости главным образом от организма-хозяина. Для *E.coli* pH предпочтительно составляет от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4 и более предпочтительно приблизительно 7,0.

Если в экспрессирующем векторе настоящего изобретения используется индуцибельный промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего изобретения для контролирования транскрипции полипептидов используются промоторы PhoA. Соответственно трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде для индукции с ограничением по фосфату. Предпочтительно средой с ограничением по фосфату является среда C.R.A.P. (см., например, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263: 20 133-147). Множество других индукторов можно использовать в соответствии с используемой векторной конструкцией, что известно в данной области.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессированные полипептиды настоящего изобретения секретируются в периплазму клеток-хозяев и 25 извлекаются оттуда. Извлечение белка обычно включает разрушение микроорганизма, обычно с помощью такого средства, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный дебрис или целые клетки можно удалить с помощью центрифугирования или фильтрации. Белок 30 можно дополнительно очистить, например, с помощью хроматографии на аффинной смоле. Альтернативно, белки могут транспортироваться в культуральные среды и выделяться из них. Клетки можно удалить из культуры и получить супернатант, профильтрованный и сконцентрированный для дальнейшей очистки белка. Экспрессированные полипептиды можно, кроме того, выделить и идентифицировать с 35 использованием общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и анализ вестерн-блоттингом.

В одном аспекте настоящего изобретения продукцию антител проводят в большом количестве с помощью ферментативного процесса. Для продукции рекомбинантных 40 белков имеются различные высокомасштабные подпитываемые ферментативные процедуры. Емкость высокомасштабных ферментеров составляет по крайней мере 1000 литров, предпочтительно приблизительно 1000-100000 литров. В таких ферментерах используется вертушка для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительного источника углерода/энергии). 45 Ферментация в небольшом масштабе относится обычно к ферментации в ферментере, емкость которого составляет не более чем приблизительно 100 литров и может находиться в диапазоне от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров.

При ферментативном процессе индукцию экспрессии белка обычно инициируют после выращивания клеток при подходящих условиях до желаемой плотности, 50 например OD550, составляющей приблизительно 180-220, когда клетки находятся в ранней стационарной фазе. Ряд индукторов можно использовать в соответствии с применяемой конструкцией вектора, что известно в данной области и описывается

выше. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов времени до индукции. Клетки обычно индуцируют в течение приблизительно 12-50 часов, хотя можно использовать более продолжительное или более короткое время индукции.

Для увеличения выхода продукции и улучшения качества полипептидов настоящего изобретения можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и укладки секретируемых полипептидов антитела можно использовать дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки хапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпропил-цис, транс-изомераза с хаперонной активностью), для котрансформации прокариотических клеток-хозяев. Показано, что белки хапероны облегчают правильную укладку и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах (Chen et al. (1999) J. Bio. Chem. 274: 19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210).

Для минимизации протеолиза экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются чувствительными к протеолизу) некоторые штаммы клеток-хозяев с недостатком протеолических ферментов можно использовать для настоящего изобретения. Например, штаммы клеток-хозяев можно модифицировать в результате генетической мутации(й) генов, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые штаммы с недостатком протеаз E.coli имеются в наличии и описаны, например Joly и др. (1998), выше; Georgiou и др., патент США № 5264365; Georgiou и др., патент США № 5508192; Hara и др., Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения штаммы E.coli с недостатком протеолитических ферментов, трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или несколько белков хаперонов, используют в качестве клеток-хозяев в экспрессирующей системе настоящего изобретения.

iii. Очистка антител

Можно применять стандартные способы очистки белков, известные в данной области. Примерами подходящих процедур очистки являются следующие процедуры: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение эталоном, HPLC с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния или катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

В одном аспекте для иммуноаффинной очистки продуктов настоящего изобретения в виде полноразмерных антител используют белок А, иммобилизованный на твердой фазе. Белок А является белком с м.м. 41 кДа клеточной стенки Staphylococcus aureus, который связывается с высоким сродством с фрагментом Fc антител (Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13). Твердой фазой, на которой иммобилизован белок А, является предпочтительно колонка, включающая поверхность в виде стекла или диоксида кремния, более предпочтительно колонка со стеклом с контролируемым размером пор или колонка на основе кремниевой кислоты. При некоторых применениях колонка покрыта реагентом, таким как глицерин, в попытке предотвратить неспецифическое прилипание применений.

В качестве первой стадии очистки препарат, полученный из клеточной культуры, как описано выше, применяют к твердой фазе с иммобилизованным белком А для того, чтобы сделать возможным специфическое связывание представляющего интерес антитела с белком А. Твердую фазу затем промывают для удаления примесей, неспецифически связавшихся с твердой фазой. Наконец, представляющее интерес антитело извлекают с твердой фазы с помощью элюции.

б. Создание антител с использованием эукариотических клеток-хозяев

Векторы обычно включают, но без ограничения, один или несколько из следующих компонентов: сигнальную последовательность, начало репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

(i) Компонент в виде сигнальной последовательности

Используемый для эукариотических клеток-хозяев вектор может также содержать сигнальную последовательность или кодировать другой полипептид, имеющий сайт специфического расщепления на N-конце представляющего интерес зрелого белка или полипептида. Предпочтительно выбранной гетерологичной сигнальной последовательностью является последовательность, узнаваемая и процессируемая (т.е. расщепляемая с помощью сигнальной пептидазы) клеткой-хозяином. Для экспрессии в клетках млекопитающих имеются сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например сигнальная последовательность gD простого герпеса.

ДНК для такой области предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело.

(ii) Начало репликации

Как правило, компонент в виде начала репликации не требуется для экспрессирующих векторов млекопитающих. Например, начало SV40 можно, как правило, использовать, только поскольку оно содержит ранний промотор.

(iii) Компонент в виде селективного гена

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать селективный ген, также называемый селективным маркером. Типичные селективные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) служат дополнением ауксотрофного дефицита, если уместно, или (с) обеспечивает важные питательные вещества, отсутствующие в сложных средах.

В одном примере схемы отбора применяется лекарственное средство, останавливающее рост клетки-хозяина. Клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, следовательно, сохраняют жизнеспособность после схемы отбора. В примерах такого доминирующего отбора используют лекарственные средства неомицин, микофенольную кислоту и гиромидин.

Другим примером подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, позволяющие идентифицировать клетки, компетентные в отношении приобретения нуклеиновой кислоты антитела, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотioneин-I и II, предпочтительно гены металлотioneинов приматов, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.п.

Например, клетки, трансформированные селективным геном DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей

клеткой-хозяином при применении DHFR дикого типа является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO) с недостатком активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клетки-хозяева (в частности, хозяев дикого типа, содержащих эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные ДНК-последовательностями, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отобрать по росту клеток в среде, содержащей агент отбора селективного маркера, такой как аминогликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199.

(iv) Компонент в виде промотора

Экспрессирующие и клонирующие векторы обычно содержат промотор, узнаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с нуклеиновой кислотой полипептида антитела. Последовательности промоторов для эукариот известны. Фактически все эукариотические гены имеют АТ-богатый район, находящийся на расстоянии приблизительно 25-30 оснований 5' от сайта, где инициируется транскрипция. Другой последовательностью, обнаруживаемой на расстоянии приблизительно 70-80 оснований 5' от начала транскрипции, является район CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3' конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом добавления хвоста полиА к 3' концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходящим образом встраивают в эукариотические экспрессирующие векторы.

Транскрипция полипептида антитела с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как полиомавирус, поксвирус птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), бычий папилломавирус, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например промотора актина или промотора иммуноглобулина, промоторов теплового шока при условии, что такие промоторы совместимы с системой клеток-хозяев.

Ранний и поздний промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит начало репликации вируса SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного HindIII E-фрагмента. Система экспрессии ДНК в хозяевах в виде млекопитающих, в которой в качестве вектора используется бычий папилломавирус, раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

(v) Компонент в виде энхансерного элемента

Транскрипцию ДНК, кодирующей полипептид антитела настоящего изобретения высшими эукариотами, часто усиливают путем встраивания в вектор энхансерной последовательности. В настоящее время известно много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако обычно используется энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 в поздней области начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомавируса в поздней области начала репликации и энхансеры аденовирусов. См.

также Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) в отношении усиливающих элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер в векторе может быть соединен с 5' или 3' положением последовательности, кодирующей полипептид антитела, но предпочтительно он находится 5' от промотора.

(vi) Компонент терминации транскрипции

Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, обычно также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательно обычно доступны из 5', и редко 3', нетранслируемых районов эукариотической или вирусной ДНК или кДНК. Эти районы содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним из применимых компонентов терминации транскрипции является район полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и раскрытый здесь экспрессирующий вектор.

(vii) Отбор и трансформация клеток-хозяев

Клетки-хозяева, подходящие здесь для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, включают описанные здесь клетки высших эукариот, включающие клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало обычной процедурой. Примерами применимых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); клетки почки детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL10); клетки яичника китайского хомячка/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клетки опухоли Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими или клонирующими векторами для продукции антител и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

(viii) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела настоящего изобретения, можно культивировать во множестве сред. Для культивирования клеток-хозяев применимы коммерчески доступные среды, такие как Ham-F10 (Sigma), минимальная необходимая среда (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) (Sigma). Кроме того, в качестве культуральных сред для клеток-хозяев можно использовать любую среду, описанную Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), в патентах США № 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469; в заявке WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США Re 30985. Любую из этих сред можно, если необходимо, дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как

инсулин, трасферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCINTM), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Можно также включить любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, известные квалифицированным в данной области специалистам. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются условиями, которые ранее использовались с клетками-хозяевами, выбранными для экспрессии, и известны специалисту со средним уровнем компетентности.

(ix) Очистка антитела

При использовании рекомбинантных методов антитело можно продуцировать внутри клетки или непосредственно секретировать в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, в качестве первой стадии удаляют, например с помощью центрифугирования или ультрацентрифугирования, корпускулярный дебрис, или клетки-хозяева, или лизированные фрагменты. При секреции антитела в среду супернатанты из таких экспрессирующих систем обычно сначала концентрируют, используя коммерчески доступный фильтр для концентрирования белков, например ультрафильтрационное устройство Amicon или Millipore Pellicon. В любую из вышеприведенных стадий для ингибирования протеолиза можно включить ингибитор протеаз, такой как PMSF, а для предотвращения роста случайных загрязнений можно включить антибиотики.

Приготовленную из клеток композицию антител можно очистить, используя, например, хроматографию на гидроксилapatите, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию, при этом аффинная хроматография является предпочтительным методом очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого иммуноглобулинового фрагмента Fc, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех мышинных изотипов и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). Наиболее часто матрицей, к которой присоединяют аффинный лиганд, является агароза, но имеются и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, позволяют использовать более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем скорости и время, которые можно достичь при использовании агарозы. Если антитело включает область CH3, для очистки применима смола Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). В зависимости от извлекаемого антитела также доступны другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этаноном, HPLC с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин-SEPHAROSETM, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такой как колонка на основе полиаспарагиновой кислоты), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония.

После стадии(й) любой предварительной очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и примеси, можно подвергнуть хроматографии на основе гидрофобных взаимодействий при низком pH, используя буфер для элюции при pH между приблизительно 2,5-4,5, предпочтительно выполняемой при низких

концентрациях соли (например, приблизительно 0-0,25 М).

Иммуноконъюгаты

Настоящим изобретением также обеспечиваются иммуноконъюгаты (взаимозаменяемо называемые «конъюгатами антитело-лекарственное средство» или «ADC»), включающие любое описанное здесь анти-OX40L антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты), или радиоактивным изотопом (т.е. радиоконъюгат).

Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство для локальной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, т.е. лекарственных средств, уничтожающих или ингибирующих опухолевые клетки, при лечении рака (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvas and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172; патент США № 4975278) делает возможными нацеленную к опухолям доставку составляющей лекарственного средства и внутриклеточную аккумуляцию там, причем системное введение этих неконъюгированных лекарственных агентов может привести к неприемлемым уровням токсичности в отношении нормальных клеток, а также опухолевых клеток, которые пытаются элиминировать (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A Pinchera et al. (eds), pp. 475-506). Таким образом пытаются получить максимальную эффективность при минимальной токсичности. Сообщалось, что для этих стратегий применимы как поликлональные антитела, так и моноклональные антитела (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Лекарственные средства, используемые в этих способах, включают дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндесин (Rowland et al. (1986), выше). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, токсины растений, такие как рицин, токсины в виде небольших молекул, такие как гелданамицин (Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), майтансиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623) и калихеамицин (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Токсины могут проявлять свои цитотоксические и цитостатические эффекты с помощью механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства имеют тенденцию становиться неактивными или менее активными при конъюгировании с большими антителами или белковыми лигандами рецепторов.

ZEVALIN® (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idec) представляет собой конъюгат антитело-радиоизотоп, состоящий из крысиного моноклонального антитела IgG1 каппа, направленного против антигена CD20, обнаруживаемого на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов, и радиоизотопа ^{111}In или ^{90}Y , связанного с помощью хелатора-линкера в виде тиомочевины (Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77; Wiseman et al. (2002) *Blood* 99(12): 4336-42; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69). Хотя ZEVALIN имеет активность против В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL), его введение приводит к тяжелым и длительным цитопениям у большинства

пациентов. MYLOTARGTM (гемтузумаб озогамицин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела против CD33 человека, связанного с калихеамицином, был разрешен в 2000 году для лечения острого миелоидного лейкоза с помощью инъекции (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; патенты США № 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Кантузумаб мертансин (Immunogen, Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела huC242, связанного через дисульфидный линкер SPP с составляющей лекарственным средством в виде майтансиноида, DM1, вступает в испытания фазы II лечения раков, экспрессирующих раковый антиген, таких как рак ободочной кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка и другие. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из моноклонального антитела против специфичного в отношении предстательной железы мембранного антигена (PSMA), связанного с составляющей лекарственным средством в виде майтансиноида, DM1, находится в стадии разработки для возможного лечения опухолей предстательной железы. Пептиды ауристатина, ауристатин Е (АЕ) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетические аналоги доластатина, конъюгировали с химерными моноклональными антителами сВR96 (специфичными в отношении Lewis Y на карциномах) и сАС10 (специфичными в отношении CD30 на гематологических злокачественностях) (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784), и они находятся на стадии терапевтической разработки.

Химиотерапевтические агенты, применимые для создания иммуноконъюгатов, описаны здесь (например, выше). Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают дифтерийную А-цепь, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарпин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolacca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и группы *Tricothecenes*. См., например, заявку WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г. Для получения радиоконъюгированных антител имеется множество радионуклидов. Примеры включают ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re. Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием ряда бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), имиотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCl), активные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно приготовить, как описано Vitetta и др. (Science, 238: 1098 (1987)). Примером хелатообразующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом является меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA). См. WO 94/11026.

Здесь также предусмотрены конъюгаты антитела и одного или нескольких токсинов в виде небольших молекул, таких как калихеамицин, майтансиноиды, доластатины, ауристатины, трихотецен и CC1065, и производных таких токсинов, имеющих токсическую активность.

i. Майтансин и майтансиноиды

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгаты включают антитело (полноразмерное или фрагменты) настоящего изобретения, конъюгированное с одной или несколькими молекулами майтансиноидов.

Майтансиноиды являются митотическими ингибиторами, которые действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтансин сначала выделили из кустарника восточной Африки *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Впоследствии обнаружили, что некоторые микробы также продуцируют майтансиноиды, такие как майтансинол и С-3 эфиры майтансинола (патент США № 4151042). Синтетический майтансинол и его производные и аналоги раскрыты, например, в патентах США № 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533.

Составляющие лекарственные средства в виде майтансиноидов являются привлекательными составляющими лекарственными средствами в конъюгатах антитело-лекарственное средство, поскольку они (i) относительно доступны для приготовления с помощью ферментации или химической модификации, дериватизации продуктов ферментации, (ii) подлежат дериватизации с использованием функциональных групп, подходящих для конъюгации через недисульфидные линкеры с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны против множества линий опухолевых клеток.

Иммуноконъюгаты, содержащие майтансиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение раскрыты, например, в патентах США №№ 5208020, 5416064 и европейском патенте EP 0425235 B1, содержание которых специально включено таким образом посредством ссылки. Liu и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)) описали иммуноконъюгаты, включающие майтансиноид, обозначенный DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против рака ободочной и прямой кишки человека. Обнаружено, что этот конъюгат является в высокой степени токсичным в отношении культивируемых клеток рака ободочной кишки и проявляет противоопухолевую активность в *in vivo* анализе роста опухоли. Chari и др. (Cancer Research 52: 127-131 (1992)) описывают иммуноконъюгаты, в которых майтансиноид конъюгирован через дисульфидный линкер с крысиным антителом A7, связывающимся с антигеном линий клеток рака ободочной кишки человека, или другим крысиным моноклональным антителом TA.1, которое связывает онкоген HER-2/neu. Цитотоксичность конъюгата TA.1-майтансиноид проверяли *in vitro* на линии клеток рака молочной железы человека SK-BR-3, которая экспрессирует 3×10^5 поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Конъюгат лекарственного средства достигал степени цитотоксичности, сходной со степенью цитотоксичности лекарственного средства в виде свободного майтансиноида, которую можно было увеличить путем увеличения числа молекул майтансиноида на молекулу антитела. Конъюгат A7-майтансиноид продемонстрировал низкую системную цитотоксичность у мышей.

Конъюгаты антитело-майтансиноид готовят с помощью химического связывания антитела с молекулой майтансиноида без значительного снижения биологической активности ни антитела, ни молекулы майтансиноида. См., например, патент США № 5208020 (содержание которого таким образом специально включено посредством ссылки). В среднем 3-4 молекулы майтансиноида, конъюгированные с каждой молекулой антитела, продемонстрировали эффективность при увеличении

цитотоксичности в отношении клеток-мишеней без отрицательного влияния на функцию или растворимость антитела, хотя, как следовало бы ожидать, даже одна молекула токсина/антитела увеличивала бы цитотоксичность по сравнению с использованием голого антитела. Майтансиноиды хорошо известны в данной области и могут быть синтезированы с помощью известных методов или выделены из природных источников. Подходящие майтансиноиды раскрыты, например, в патенте США № 5208020 и в других патентах и непатентных публикациях, на которые приводятся ссылки здесь выше. Предпочтительными майтансиноидами являются майтансинол и аналоги майтансинола, модифицированные в ароматическом кольце или в других положениях молекулы майтансинола, такие как различные эфиры майтансинола.

В данной области существуют множество связующих групп для получения конъюгатов антитело-майтансиноид, включающих, например, те, которые описаны в патенте США № 5208020 и европейском патенте EP 0425235 B1; Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); и заявке на патент США № 10/960602, поданной 8 октября 2004 г., содержание которых таким образом специально включено посредством ссылки. Конъюгаты антитело-майтансиноид, включающие линкерный компонент SMCC, можно приготовить, как сообщается в заявке на патент США № 10/960602, поданной 8 октября 2004 г. Связующие группы включают дисульфидные группы, тиоэфирные группы, неустойчивые к кислотам группы, светочувствительные группы, неустойчивые к пептидазам группы или неустойчивые к эстеразам группы, описанные в приведенных выше патентах, при этом дисульфидные и тиоэфирные группы являются предпочтительными. Дополнительные связующие группы описываются и приводятся в качестве примеров здесь.

Конъюгаты антитела и майтансиноида можно получить с использованием ряда бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCl), активные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Особенно предпочтительные связующие агенты включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP) для обеспечения дисульфидной связи.

Линкер может быть присоединен к молекуле майтансиноида в различных положениях, в зависимости от типа связи. Например, эфирная связь может быть образована с помощью реакции с гидроксильной группой, используя общепринятые методы связывания. Реакция может происходить по положению C-3, имеющему гидроксильную группу, положению C-14, модифицированному гидроксиметилом, положению C-15, модифицированному гидроксильной группой, и положению C-20, имеющему гидроксильную группу. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения связь образуется в положении C-3 майтансинола или аналога майтансинола.

ii Ауристатины и доластатины

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгаты включают антитело настоящего изобретения, конъюгированное с доластатинами или

пептидными аналогами и производными доластатинов, ауристатинами (патенты США № 5635483; 5780588). Показано, что доластатины и ауристатины препятствуют динамическому поведению микротрубочек, гидролизу GTP и ядерному и клеточному делению (Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) и обладают противораковой (US 5663149) и противогрибковой активностями (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2961-2965). Составляющие лекарственные средства в виде доластатинов или ауристатинов можно присоединить к антителу через N (амино)-конец или C (карбоксильный)-конец пептидной составляющей лекарственного средства (WO 02/088172).

Примеры вариантов ауристатинов включают связанные через N-конец составляющие лекарственные средства в виде монометилауристатина DE и DF, раскрытые в “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, заявка на патент США № 10/983340, поданная 5 ноября 2004 г., содержание которой специально полностью включено посредством ссылки.

Обычно составляющие лекарственные средства на основе пептидов можно приготовить с помощью образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи можно получить, например, согласно способу синтеза в жидкой фазе (см. E. Schroder and K.Lübke, “The Peptides”, volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области пептидной химии. Составляющие лекарственные средства в виде ауристатинов/доластатинов можно приготовить согласно способам, раскрытым в US 5635483; US 5780588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; и Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15*: 859-863. См. также Doronina (2003) *Nat. Biotechnol* 21(7): 778-784; “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, заявку на патент США № 10/983340, поданную 5 ноября 2004 г., которые таким образом полностью включены посредством ссылки (в которых раскрыты, например, линкеры и способы приготовления соединений монометилвалина, таких как MMAE и MMAF, конъюгированных с линкерами).

iii. Калихеамицин

В других вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгаты включают антитело настоящего изобретения, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Семейство антибиотиков калихеамицинов способно вызывать разрывы в двухцепочечной ДНК в субпикомолярных концентрациях. Для приготовления конъюгатов семейства калихеамицинов см. патенты США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают, но без ограничения, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ_1^I (Hinman et al., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) и упоминаемые выше патенты США American Cyanamid Company). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым можно конъюгировать антитело, является QFA, который является антифолатом. И калихеамицин, и QFA имеют внутриклеточные области действия и нелегко пересекают плазматическую мембрану. Следовательно, поглощение клетками этих агентов благодаря опосредуемой антителом интернализации значительно увеличивает их цитотоксические эффекты.

iv. Другие цитотоксические агенты

Другие противоопухолевые агенты, которые можно конъюгировать с антителами

настоящего изобретения, включают BCNU, стрептозоин, винкристин и 5-фторурацил, семейство агентов, в совокупности известных как комплекс LL-E33288, описанный в патентах США № 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США № 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают дифтерийную А-цепь, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модекина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и группы *Tricothecenes*. См., например, заявку WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г.

Настоящим изобретением, кроме того, предусматривается иммуноконъюгат, образованный между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКазой).

Для избирательного разрушения опухоли антитело может включать высокорadioактивный атом. Для получения радиоconъюгированных антител имеется множество радиоактивных изотопов. Примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. При использовании конъюгата для обнаружения он может включать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например tc^{99m} или I^{123} , или спин-метку для ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного в качестве магнитного резонанса), такую как снова иод-123, иод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиометки или другие метки можно включить в конъюгат известными способами. Например, пептид можно биосинтезировать или можно синтезировать с помощью химического аминокислотного синтеза, используя подходящие предшественники аминокислот, включающие, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как tc^{99m} или I^{123} , Re^{186} , Re^{188} и In^{111} , можно присоединить через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 можно присоединить через остаток лизина. Способ IODOGEN (Fraker et al. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) можно использовать для включения иода-123. В "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) описываются подробно другие способы.

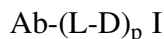
Конъюгаты антитела и цитотоксического агента можно получить, используя ряд бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCl), активные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-diazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ричин можно приготовить, как описано Vitetta и др. (*Science*, 238: 1098 (1987)). Примером хелатообразующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом является меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA). См. WO 94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», способствующим

высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать неустойчивый к кислотам линкер, неустойчивый к пептидазам линкер, светочувствительный линкер, диметильный линкер или содержащий дисульфид линкер (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020).

Соединения настоящего изобретения специально предусматривают, но не ограничиваются, ADC, приготовленный с использованием сшивающих агентов BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые коммерчески доступны (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, США). См. страницы 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Приготовление конъюгатов антитело-лекарственное средство

В конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) настоящего изобретения антитело (Ab) конъюгируют с одной или несколькими составляющими лекарственными средствами (D), например от приблизительно 1 до приблизительно 20 составляющих лекарственных средств на антитело, через линкер (L). ADC формулы I можно приготовить несколькими способами, применяя реакции, условия и реагенты органической химии, известные квалифицированным в данной области специалистам, включающие: (1) реакцию нуклеофильной группы антитела с бивалентным линкерным реагентом с образованием Ab-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с составляющей лекарственным средством D; и (2) реакцию нуклеофильной группы составляющей лекарственного средства с бивалентным линкерным реагентом с образованием D-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с нуклеофильной группой антитела. Здесь описываются дополнительные способы приготовления ADC.



Линкер может состоять из одного или нескольких линкерных компонентов. Примеры линкерных компонентов включают 6-малеимидокапроил («МС»), малеимидопропаноил («MP»), валин-цитруллин («val-cit»), аланин-фенилаланин («ala-phe»), п-аминобензилоксикарбонил («PAB»), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-4(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC») и N-сукцинимидил(4-иодацетил)аминобензоат (SIAB). Дополнительные линкерные компоненты известны в данной области, и некоторые из них описаны здесь. См. также “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, заявку на патент США № 10/983340, поданную 5 ноября 2004 г., содержание которой таким образом полностью включено посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер может включать аминокислотные остатки. Примеры аминокислотных линкерных компонентов включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры дипептидов включают валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примеры трипептидов включают глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотные остатки, составляющие аминокислотный линкерный компонент, включают встречающиеся в природе аминокислоты, а также неосновные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные линкерные компоненты можно разработать и оптимизировать в отношении их избирательности для ферментативного расщепления конкретными ферментами, например ассоциируемой с

опухолью протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмином.

Нуклеофильные группы на антителах включают, но без ограничения, (i) N-концевые аминокислоты, (ii) аминокислоты боковых цепей, например лизина, (iii) тиольные группы боковых цепей, например цистеина, и (iv) гидроксильные группы или аминокислоты сахаров, если антитело гликозилировано. Аминокислоты, тиольные и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны вступать в реакции с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных составляющих и линкерных реагентах, включающих: (i) активные эфиры, такие как эфиры NHS, эфиры HOBT, галогенокарбонаты и ацилгалаты; (ii) алкил- и бензилгалаты, такие как галогеноацетамиды; (iii) альдегидные, кетонные, карбоксильные и малеимидные группы. Некоторые антитела имеют восстанавливаемые межцепочечные дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антитела можно приготовить реакционноспособными для конъюгации с линкерными реагентами с помощью обработки восстанавливающим агентом, таким как DTT (дифиотреитол). Теоретически каждый цистеиновый мостик будет, следовательно, образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы можно ввести в антитело благодаря реакции лизинов с 2-иминотиолом (реагентом Траута), что приводит к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиольные группы можно ввести в антитело (или его фрагменты) путем введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, приготовления мутантных антител, включающих один или несколько неестественных остатков аминокислоты цистеина).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство настоящего изобретения можно также получить с помощью модификации антитела с введением электрофильных составляющих, которые могут вступать в реакции с нуклеофильными заместителями на линкерном реагенте или лекарственном средстве. Сахара гликозилированных антител можно подвергнуть окислению, например, с использованием окислительных реагентов периодатов, с образованием альдегидных или кетонных групп, которые могут вступать в реакцию с аминокислотой линкерных реагентов или составляющих лекарственных средств. Получаемые в результате группы оснований Шиффа иминов могут образовывать стабильную связь или могут быть восстановлены, например, с помощью реагентов боргидридов с образованием стабильных аминных связей. В одном варианте осуществления настоящего изобретения реакция углеводной части гликозилированного антитела или с галактозооксидазой, или с мета-периодатом натрия может привести к образованию карбонильных (альдегидных или кетонных) групп в белке, которые могут вступать в реакции с соответствующими группами на лекарственном средстве (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления настоящего изобретения белки, содержащие N-концевые остатки серина или треонина, могут вступать в реакцию с мета-периодатом натрия, что в результате приводит к получению альдегида вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh (1992), Bioconjugate Chem. 3: 138-146; US 5362852). Такие альдегиды могут реагировать с составляющей лекарственного средства или линкерным нуклеофилом.

Подобным образом, нуклеофильные группы на составляющей лекарственного средства включают, но без ограничения, аминокислоты, тиольные, гидроксильные, гидразидные, оксимные группы, группы гидразина, тиосемикарбозона, гидразинкарбоксилата и арилгидразидные группы, способные вступать в реакцию с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных составляющих и линкерных реагентах, включающих: (i) активные эфиры, такие как

эфиры NHS, эфиры HOBT, галогенформаты и ацилгалиды; (ii) алкил- и бензилгалиды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегидные, кетонные, карбоксильные и малеимидные группы.

Альтернативно, слитые белки, включающие антитело и цитотоксический агент, можно получить, например, с помощью рекомбинантных методов или синтеза пептидов. Длина ДНК может включать соответствующие районы, кодирующие две части конъюгата, или примыкающие друг к другу, и разделенные районом, кодирующим линкерный пептид, который не нарушает желаемые свойства конъюгата.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело можно конъюгировать с «рецептором» (например, стрептавидином) для применения в предварительном нацеливании на опухоль, причем конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту с последующим удалением из циркуляции несвязавшегося конъюгата с использованием очищающего агента и затем введением «лиганда» (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим агентом (например, радионуклеотидом).

Фармацевтические композиции

Терапевтические композиции, включающие антитело настоящего изобретения, готовят для хранения смешиванием антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)) в форме водных растворов, лиофилизированных или других высушенных композиций. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, например фосфат, цитрат, гистидин и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (PEG).

Композиция настоящего изобретения может также содержать более одного активного компонента, если необходимо, для конкретного подвергаемого лечению симптома, предпочтительно компоненты с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятный эффект друг на друга. Такие молекулы присутствуют подходящим образом в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели.

Активные ингредиенты можно также поместить в микрокапсулы, приготовленные, например, с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулу и микрокапсулу из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии,

наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие способы описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000).

Композиции, используемые для *in vivo* введения, должны быть стерильными. Это легко осуществить с помощью фильтрации через мембраны для стерильной
5 фильтрации.

Можно приготовить препараты с непрерывным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с непрерывным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие иммуноглобулин
10 настоящего изобретения, которые находятся в форме фасонных изделий, например пленок, или микрокапсул. Примеры матриц с непрерывным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат,
15 разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTM (инъектируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксипропионовую кислоту. В то время как такие полимеры, как этилен-винилацетат и сополимеры
20 молочной кислоты и гликолевой кислоты, могут высвобождать молекулы на протяжении 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. При нахождении инкапсулированных иммуноглобулинов в организме в течение длительного времени они могут подвергнуться денатурации или
25 агрегации в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Можно разработать рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружено, что механизмом агрегации является образование межмолекулярных S-S-связей через тио-дисульфидный обмен,
30 стабилизации можно достигнуть с помощью модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислотных растворов, контроля степени влажности, используя соответствующие добавки, и разработки специфичных композиций полимерной матрицы.

35 Применения

Антитело настоящего изобретения можно использовать, например, в *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* терапевтических способах.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения или предотвращения опухоли, рака и/или нарушения пролиферации клеток,
40 ассоциируемых с увеличением экспрессии и/или активности EphB4, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы уменьшения, ингибирования или предотвращения роста опухоли или рака, включающие введение
45 эффективного количества антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

EphB вовлечен в направление мотоаксонов и миграцию клеток нервного гребешка при развитии эмбриона. Соответственно, антитела настоящего изобретения также
50 применимы для лечения (в том числе предотвращения) нарушений, в патологию которых вовлечены дегенерация и/или дисфункция клеток, такого как лечение различных (хронических) нейродегенеративных нарушений и острых повреждений нервных клеток. Такие нейродегенеративные нарушения включают, без ограничения,

периферические невропатии, мотонейронные нарушения, такие как амиотрофический боковой склероз (ALS, болезнь Луи Геринга), периферический паралич лицевого нерва и различные состояния, в которые вовлечена спинальная мышечная атрофия или паралич; и другие нейродегенеративные заболевания человека, такие как болезнь

5 Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия, рассеянный склероз, хорея Хантингтона, синдром Дауна, глухота, связанная с поражением слухового нерва, и болезнь Меньера, и острые повреждения нервных клеток, обусловленные, например, травмой или повреждением спинного мозга.

10 Антитела настоящего изобретения также применимы для ингибирования развития кровеносных сосудов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения местом развития кровеносных сосудов является опухоль или рак.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы ингибирования развития кровеносных сосудов, включающие введение эффективного количества

15 антитела против EphB4 нуждающемуся в таком лечении субъекту.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения патологического состояния, ассоциируемого с развитием кровеносных сосудов, включающие введение эффективного количества антитела против EphB4

20 нуждающемуся в таком лечении субъекту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения патологическим состоянием, ассоциируемым с развитием кровеносных сосудов, является опухоль, рак и/или нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения патологическим состоянием, ассоциируемым с развитием кровеносных сосудов, является

25 внутриглазное неоваскулярное поражение.

Кроме того, по крайней мере некоторые антитела настоящего изобретения могут связывать антиген из другого вида. Соответственно, антитела настоящего изобретения можно использовать для связывания специфической антигенной

30 активности, например, в клеточной культуре, содержащей антиген, у являющихся людьми субъектов или у являющихся другими млекопитающими субъектов, имеющих антиген, с которым перекрестно реагирует антитело настоящего изобретения (например, шимпанзе, бабуина, мартышки, яванского макака и макака-резус, свиньи или мыши). В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело

35 настоящего изобретения можно использовать для ингибирования активностей антигена путем приведения в контакт антитела с антигеном, так что активность антигена ингибируется. Предпочтительно антигеном является молекула белка человека.

40 В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело настоящего изобретения можно использовать в способе связывания антигена у субъекта, страдающего нарушением, ассоциируемым с увеличенной экспрессией и/или активностью антигена, включающем введение субъекту антитела настоящего изобретения, так что антиген субъекта связывается. Предпочтительно антигеном

45 является молекула белка человека, а субъектом является человек. Альтернативно, субъектом может быть млекопитающее, экспрессирующее антиген, с которым связывается антитело настоящего изобретения. Кроме того, субъектом может быть млекопитающее, которому антиген введен (например, с помощью введения антигена или экспрессии трансгена антигена). Антитело настоящего изобретения можно

50 вводить являющемуся человеком субъекту с терапевтическими целями. Кроме того, антитело настоящего изобретения можно вводить не являющемуся человеком млекопитающему, экспрессирующему антиген, с которым перекрестно реагирует

иммуноглобулин (например, примату, свинье или мышам), с ветеринарными целями или в качестве модели заболевания человека на животном. Что касается последнего, такие модели на животных могут быть полезны для оценки терапевтической эффективности антител настоящего изобретения (например, проверки доз и временных курсов введения).

Антитела настоящего изобретения можно использовать для лечения, ингибирования, замедления прогрессирования, предотвращения/задержки рецидива, уменьшения интенсивности или предотвращения заболеваний, нарушений или состояний, ассоциируемых с экспрессией и/или активностью одной или нескольких молекул антигенов.

Примеры нарушений включают карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественности. Более конкретные примеры таких раков включают сквамозноклеточный рак (например, эпителиальный сквамозноклеточный рак), рак легкого, включающий мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и сквамозную карциному легкого, рак брюшины, печечно-клеточный рак, рак желудка, в том числе рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, цервикальный рак, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевых путей, гепатому, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, рак анальной части прямой кишки, карциному полового члена, меланому, множественную миелому и В-клеточную лимфому, рак головного мозга, а также рак головы и шеи и сопровождающие метастазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак выбирают из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легкого, нейробластом, меланомы, рака молочной железы, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки (CRC) и печечно-клеточного рака.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациенту вводят иммуноконъюгат, включающий антитело, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксическими агентами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат и/или антиген, с которым он связывается, интернализуется (интернализуются) клеткой, что приводит к увеличению терапевтической эффективности иммуноконъюгата в уничтожении клетки-мишени, с которой он связывается. В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитотоксический агент нацелен или вводится в нуклеиновую кислоту в клетке-мишени. В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитотоксический агент нацелен или препятствует полимеризации микротрубочек. Примеры таких цитотоксических агентов включает любой из отмеченных здесь химиотерапевтических агентов (таких как майтансиноид, ауристин, доластин или калихеамицин), радиоактивный изотоп, или рибонуклеазу, или ДНК-эндонуклеазу.

Антитела настоящего изобретения можно использовать или отдельно, или в комбинации с другими композициями при терапии. Например, антитело настоящего изобретения можно вводить вместе с другим антителом, химиотерапевтическим агентом(ами) (в том числе смесями химиотерапевтических агентов), другим цитотоксическим агентом(ами), антиангиогенным агентом(ами), цитокинами и/или ингибирующим рост агентом(ами). Если антитело настоящего изобретения ингибирует рост опухоли, может быть особенно желательным его объединение с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, которые также

ингибируют рост опухоли. Альтернативно или дополнительно, пациент может получить комбинированную лучевую терапию (например, облучение внешним пучком или терапию с использованием меченного радиоактивным изотопом агента, такого как антитело). Такие комбинированные терапии, отмеченные выше, включают
 5 совместное введение (когда два или более агентов включены в одну и ту же или отдельные композиции) и раздельное введение, при котором введение антитела настоящего изобретения может происходить до и/или после назначения дополнительной терапии или терапий.

10 **Комбинированные терапии**

Как указано выше, настоящим изобретением обеспечиваются комбинированные терапии, при которых антитело против EphV назначают вместе с другой терапией. Например, антитела против EphB4 используют в комбинации с противораковой
 15 терапией или терапией против неоваскуляризации для лечения различных неопластических или не являющихся неопластическими состояний. В одном варианте осуществления настоящего изобретения неопластическое или не являющееся неопластическим состояние характеризуется патологическим нарушением, связанным с абберрантным или желательным развитием кровеносных сосудов. Антитело
 20 против EphB4 можно вводить периодически или в комбинации с другим агентом, который эффективен для этих целей, или в одной и той же композиции, или в виде отдельных композиций. Альтернативно или дополнительно, можно вводить множество ингибиторов EphB4.

Введение антитела против EphB4 можно осуществлять одновременно, например, в
 25 виде одной композиции или в виде двух или более отдельных композиций, используя одни и те же или различные пути введения. Альтернативно или дополнительно, введение можно осуществлять последовательно, в любом порядке. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения интервалы между введениями двух
 30 или более композиций могут находиться в диапазоне минуты-дни, недели-месяцы. Например, сначала можно ввести противораковый агент, а затем антитело против EphB4. Однако также предусматривается одновременное введение или введение антитела против EphB4 первым.

Эффективные количества терапевтических агентов, вводимых в комбинации с
 35 антителом против EphB4, находятся на усмотрении лечащего врача или ветеринара. Назначение и регулировку доз осуществляют для достижения максимального регулирования подвергаемых лечению состояний. Кроме того, доза будет зависеть от таких факторов, как тип используемого терапевтического агента и специфичности
 40 подвергаемого лечению пациента. Подходящие дозы противоракового агента являются дозами, используемые в настоящее время, и их можно снизить благодаря совместному действию (синергизму) противоракового агента и антитела против EphB4.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения комбинация ингибиторов усиливает эффективность отдельного ингибитора. Термин «усиливать»
 45 относится к увеличению эффективности терапевтического агента в его обычной или разрешенной дозе.

Как правило, антитела против EphB4 и противораковые агенты подходят для одних и тех же или схожих заболеваний, для того чтобы блокировать или уменьшить
 50 патологическое нарушение, такое как рост опухоли или рост раковой клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения противораковым агентом является антиангиогенный агент.

Антиангиогенная терапия в связи с раком является стратегией лечения рака,

нацеленной на ингибирование развития в опухоли кровеносных сосудов, необходимых для обеспечения питательными веществами, поддерживающими рост опухоли.

Поскольку развитие кровеносных сосудов вовлечено и в первичный рост опухоли, и в метастаз, антиангиогенное лечение, обеспечиваемое настоящим изобретением, способно
 5 ингибировать неопластический рост опухоли в первичном сайте, а также предотвратить метастаз опухолей во вторичные сайты, делая, следовательно, возможным разрушение опухолей с помощью других терапий.

Идентифицировано и известно в данных областях техники множество
 10 антиангиогенных агентов, включающих агенты, которые здесь перечислены, например перечислены в разделе «Определения» и, например, Carmeliet и Jain (Nature 407: 249-257 (2007)); Ferrara и др. (Nature Reviews: Drug Discovery, 3: 391-400 (2004)); и Sato (Int. J. Clin. Oncol., 8: 200-206 (2003)). См. также заявку на патент США US 20030055006. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело
 15 против EphB4 используется в комбинации с нейтрализующим антителом против VEGF (или фрагментом) и/или другим антагонистом VEGF или антагонистом рецептора VEGF, в том числе, например, растворимым рецептором VEGF (например, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, нейропиллинами (например, NRP1, NRP2)),
 20 фрагментами, аптамерами, способными блокировать VEGF или VEGFR, нейтрализующими антителами против VEGFR, низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы VEGFR (RTK), бессмысленными стратегиями для VEGF, рибозимами против VEGF или рецепторов VEGF, вариантами VEGF в качестве антагонистов и любыми их комбинациями. Альтернативно или дополнительно, два или более
 25 ингибиторов развития кровеносных сосудов можно необязательно вводить вместе пациенту помимо антагониста VEGF и другого агента. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения один или несколько дополнительных терапевтических агентов, например противораковых агентов, можно вводить в
 30 комбинации с антителом против EphB4, антагонистом VEGF и антиангиогенным агентом.

В определенных аспектах настоящего изобретения другие терапевтические агенты, применимые в комбинированной противоопухолевой терапии с антителом
 35 против EphB4, включают другие противораковые терапии (например, оперативное вмешательство, радиологические лечения (например, в которые вовлечено облучение или введение радиоактивных веществ), химиотерапию, лечение противораковыми агентами, перечисленными здесь или известными в данной области, или их комбинации). Альтернативно или дополнительно, два или более антител,
 40 связывающихся с одними и теми же или двумя или более различными антигенами, раскрытыми здесь, можно совместно вводить пациенту. Иногда пациенту может быть полезным также введение одного или нескольких цитокинов.

Химиотерапевтические агенты

В определенных аспектах настоящим изобретением обеспечивается способ
 45 блокирования или уменьшения роста опухоли или роста раковой клетки путем введения эффективных количеств антагониста EphB4 и/или ингибитора(ов) развития кровеносных сосудов и одного или нескольких химиотерапевтических агентов пациенту, который является восприимчивым к раку или у которого диагностирован
 50 рак. В способах комбинированного лечения настоящего изобретения можно использовать ряд химиотерапевтических агентов. Примеры и неограничивающий перечень предусмотренных химиотерапевтических агентов представлены здесь в разделе «Определения».

Специалистам со средним уровнем компетентности в данной области понятно, что соответствующие дозы химиотерапевтических агентов будут, как правило, находиться вблизи тех доз, которые уже применяются при клинических терапиях, причем химиотерапевтические агенты вводятся отдельно или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами. Вероятно, будет происходить изменение дозы в зависимости от подвергаемого лечению состояния. Врач, назначающий лечение, способен определить соответствующую дозу для отдельного субъекта.

Рецидивирующий рост опухоли

Настоящим изобретением также обеспечиваются способы и композиции для ингибирования и предотвращения рецидивирующего роста опухоли или рецидивирующего роста раковых клеток. Рецидивирующий рост опухоли или рецидивирующий рост раковых клеток используется для описания состояния, при котором для пациентов, подвергаемых или подвергшихся одной или несколькими имеющимся в настоящем времени терапиям (например, противораковым терапиям, таким как химиотерапия, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, гормональная терапия и/или биологическая терапия/иммунотерапия, терапия с использованием антител против VEGF, в частности стандартная схема лечения конкретного рака), такая терапия не является клинически адекватной для их лечения, или пациенты больше не получают какой-либо полезный эффект от терапии, так что такие пациенты нуждаются в дополнительной эффективной терапии. Используемое здесь выражение может также относиться к состоянию «нереагирующего/резистентного» пациента, например, которое описывает пациентов, которые отвечают на терапию, но страдают от побочных эффектов, развивают устойчивость, не отвечают на терапию, не отвечают удовлетворительно на терапию и т.п. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рак является рецидивирующим ростом опухоли или рецидивирующим ростом раковых клеток, когда число раковых клеток снизилось незначительно или увеличилось, или размер опухоли не уменьшился значительно или увеличился, или нет какого-либо дальнейшего уменьшения размера или числа раковых клеток. Определение того, являются ли раковые клетки рецидивирующим ростом опухоли или рецидивирующим ростом раковых клеток, можно осуществить или *in vivo*, или *in vitro* с помощью любого способа, известного в данной области, для исследования эффективности лечения раковых клеток, используя принятые в данной области значения терминов «рецидив», или «резистентный», или «нереагирующий» в таком контексте. Опухоль, устойчивая к лечению антителом против VEGF, является примером рецидивирующего роста опухоли.

Настоящим изобретением обеспечиваются способы блокирования или уменьшения рецидивирующего роста опухоли или рецидивирующего роста раковых клеток у субъекта путем введения одного или нескольких антител против EphB4, блокирующих или уменьшающих рецидивирующий рост опухоли или рецидивирующий рост раковых клеток у субъекта. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антагонист можно вводить после противораковой терапии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против EphB4 вводят одновременно с противораковой терапией. Альтернативно или дополнительно, терапию с использованием антител против EphB4 чередуют с другой противораковой терапией, что можно осуществлять в любом порядке. Настоящим изобретением также охватываются способы введения одного или нескольких ингибиторных антител, предотвращающих возникновение или рецидив рака у пациентов, предрасположенных

к раку. Обычно субъект подвергался или параллельно подвергается противораковой терапии. В одном варианте осуществления настоящего изобретения противораковой терапией является лечение антиангиогенным агентом, например антагонистом VEGF. Антиангиогенные агенты включают агенты, известные в данной области, и агенты, которые можно найти в разделе «Определения» здесь. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антиангиогенным агентом является нейтрализующее антитело против VEGF или фрагмент (например, гуманизированное антитело A4.6.1, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C4 и т.п.). См., например, патенты США № 6582959, 6884879, 6703020; WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202; EP 0666868 B1; заявки на патенты США US 20030206899, 20030190317, 20030203409 и 20050112126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004); и WO 2005012359. Дополнительные агенты можно вводить в комбинации с антагонистом VEGF и антителом против EphB4 для блокирования или уменьшения рецидивирующего роста опухоли или рецидивирующего роста раковых клеток, например, см. раздел, озаглавленный «Комбинированные терапии», здесь.

Антитело настоящего изобретения (или вспомогательный терапевтический агент) вводят любым подходящим способом, в том числе с помощью парентерального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и интраназального введения и, если требуется для местного лечения, введения внутрь повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутривенное или подкожное введение. Кроме того, антитело подходящим образом вводят с помощью импульсной инфузии, например, с использованием уменьшающихся доз антитела. Введение доз можно осуществить с использованием любого подходящего пути, например с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости отчасти от того, является введение кратковременным или постоянным.

Содержащие антитело композиции настоящего изобретения готовят, дозируют и вводят способом, согласующимся с хорошей медицинской практикой. Принимаемые во внимание в этом контексте факторы включают конкретное подвергаемое лечению нарушение, конкретное подвергаемое лечению заболевание, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно готовят с одним или несколькими агентами, в настоящее время используемыми для предотвращения или лечения нарушения, о котором идет речь. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антител настоящего изобретения, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Они обычно используются в тех же самых дозах и вводятся теми же путями, которые использовались здесь ранее, или составляют приблизительно 1-99% от прежде применяемых доз.

Для предотвращения или лечения заболевания соответствующая доза антитела настоящего изобретения (при использовании отдельно или в комбинации с другими агентами, такими как химиотерапевтические агенты) будет зависеть от типа подвергаемого лечению заболевания, типа антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли антитело с профилактической или терапевтической целью, предшествующей терапии, клинической истории пациента и ответа на антитело и усмотрения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводится пациенту один раз или на протяжении ряда обработок. В зависимости от типа и тяжести заболевания приблизительно 1 мкг/кг - 15 мг/кг (например, 0,1 мкг/кг - 10 мг/кг) антитела является

первоначальной возможной дозой для введения пациенту или, например, с помощью одного или нескольких отдельных введений, или с помощью непрерывного вливания. Одна типичная ежедневная доза может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. Для

повторных введений на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение поддерживают, пока не будет иметь место желаемое подавление симптомов заболевания. Одна приводимая в качестве примера доза антитела будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно ввести одну или несколько доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2 мг/кг, 4 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы можно вводить периодически, например каждую неделю или каждые три недели (например, так, что пациент получает от приблизительно двух до приблизительно двадцати, например приблизительно шесть, доз антитела). Можно вводить первоначальную более высокую ударную дозу, за которой следуют одна или несколько более низких доз. Приводимая в качестве примера схема дозирования включает введение первоначальной ударной дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, за которой следует еженедельная поддерживающая доза, составляющая приблизительно 2 мг/кг антитела. Однако можно использовать другие схемы дозирования. Прогресс такой терапии легко контролировать с помощью общепринятых методов и анализов.

Антитела против EphB4 настоящего изобретения применимы в анализах обнаружения экспрессии EphB4 (таких как диагностические и прогностические анализы) в специфических клетках или тканях, причем антитела метят, как описано ниже, и/или иммобилизуют на нерастворимой матрице.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы обнаружения EphB4, включающие обнаружение комплекса EphB4 - антитело против EphB4 в образце. Используемый здесь термин «обнаружение» включает качественное и/или количественное обнаружение (измерение уровней) с или без ссылки на контроль.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечиваются способы диагностирования нарушения, ассоциируемого с экспрессией и/или активностью EphB4, включающие обнаружение комплекса EphB4 - антитело против EphB4 в биологическом образце от пациента, у которого имеется или подозревается наличие указанного нарушения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия EphB4 является увеличенной экспрессией или патологической (нежелательной) экспрессией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушением является опухоль, рак и/или нарушение пролиферации клеток.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается любое описанное здесь антитело против EphB4, причем антитело против EphB4 включает определяемую метку.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается комплекс любого описанного здесь антитела против EphB4 и EphB4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комплекс существует *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комплекс включает раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против EphB4 является меченым определяемой меткой.

Антитела против EphB4 можно использовать для обнаружения EphB4 в любом из

ряда хорошо известных способов обнаружения. Например, биологический образец можно проанализировать на наличие EphB4 с помощью получения образца из желаемого источника, смешивания образца с антителом против EphB4 для того, чтобы сделать возможным образование антителом комплекса антитело/EphB4 с любым EphB4, присутствующим в смеси, и обнаружения любого комплекса антитело/EphB4, присутствующего в смеси. Биологический образец можно приготовить для анализа способами, известными в данной области, которые подходят для конкретного образца. Способы смешивания образца с антителами и способы обнаружения комплекса антитело/EphB4 выбирают в соответствии с типом используемого анализа. Такие анализы включают иммуногистохимию, конкурентный анализ и сэндвич-анализы и анализы стерического ингибирования.

Во всех способах анализа EphB4 используется один или несколько из следующих реагентов: меченый аналог EphB4, иммобилизованный аналог EphB4, меченое антитело против EphB4, иммобилизованное антитело против EphB4 и стерические конъюгаты. Меченые реагенты также известны как «индикаторы».

Используемой меткой является определяемое функциональное средство, которое не препятствует связыванию EphB4 и антитела против EphB4. Для использования в иммуноанализах известны многочисленные метки, при этом примеры включают составляющие, которые можно обнаружить непосредственно, такие как флуорохром, хемилюминесцентный агент и радиоактивные метки, а также такие составляющие, как ферменты, которые необходимо подвергнуть реакции или дериватизации для того, чтобы обнаружить. Примеры таких меток включают радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как редкоземельные хелатные соединения или флуоресцеин и их производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например люцифераза светляков и бактериальная люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы, например глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантинооксидаза, связанные с ферментом, который использует перекись водорода для окисления предшественника красителя, таким как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спин-метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

Для ковалентного связывания этих меток с белками или полипептидами имеются общепринятые способы. Например, для мечения антител описанными выше флуоресцентными, хемилюминесцентными и ферментными метками можно использовать связывающие агенты, такие как диальдегиды, карбодиимиды, дималеимиды, бис-имидаты, бис-динитрифицированный бензидин и т.п. См., например, патент США № 3940475 (флуорометрия) и 3645090 (ферменты); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); и Nygren, *J. Histochem and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Предпочтительными здесь метками являются ферменты, такие как пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза. Конъюгирование такой метки, в том числе ферментов, с антителом является стандартной манипуляционной процедурой для специалиста со средним уровнем компетентности в методах иммуноанализа. См., например, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugated for Use in Enzyme Immunoassay", in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

Для определенных способов анализа требуется иммобилизация реагентов.

Иммобилизация влечет за собой отделение антитела против EphB4 от EphB4, который остается свободным в растворе. Это обычно осуществляют или с помощью перевода в нерастворимую форму антитела против EphB4 или аналога EphB4 до проведения анализа, например, с помощью адсорбции на нерастворимой в воде матрице или поверхности (Bennich et al., US 3720760), с помощью ковалентного связывания (например, используя глутаральдегидное сшивание), или с помощью перевода в нерастворимую форму антитела против EphB4 или аналога EphB4 впоследствии, например, с помощью иммунопреципитации.

Экспрессию белков в образце можно проверить с использованием протоколов иммуногистохимии и окрашивания. Показано, что иммуногистохимическое окрашивание срезов тканей является надежным способом оценки или обнаружения присутствия белков в образце. В методах «иммуногистохимии» («ИНС») применяется антитело для зондирования и визуализации клеточных антигенов *in situ*, обычно с помощью хромогенных или флуоресцентных способов. Для приготовления образца можно использовать образец ткани или клеток млекопитающего (обычно являющегося человеком пациента). Примеры образцов включают, но без ограничения, раковые клетки, такие как клетки рака ободочной кишки, молочной железы, предстательной железы, яичника, легкого, желудка, поджелудочной железы, лимфомы и лейкоза. Образец можно получить с помощью множества процедур, известных в данной области, включающих, но без ограничения, хирургическое иссечение, аспирацию или биопсию. Ткань может быть свежей или замороженной. В одном варианте осуществления настоящего изобретения образец фиксируют и заделывают в парафин или т.п. Образец ткани можно зафиксировать (т.е. сохранять) с помощью общепринятой методологии. Специалисту со средним уровнем компетентности в данной области понятно, что выбор фиксатора определяется целью, с которой образец должен быть гистологически окрашен или, другими словами, проанализирован. Специалисту со средним уровнем компетентности в данной области понятно, что продолжительность фиксации зависит от размера образца ткани и используемого фиксатора.

ИНС можно выполнять в комбинации с дополнительными методами, такими как морфологическое окрашивание и/или флуоресцентная гибридизация *in situ*. Имеются два основных способа ИНС: прямой и непрямой анализы. Согласно первому анализу связывание антитела с целевым антигеном (например, EphB4) определяют непосредственно. В этом прямом анализе используется меченый реагент, такой как флуоресцентная метка или меченное ферментом первое антитело, которые можно визуализировать без дальнейшего взаимодействия с антителом. В типичном непрямом анализе неконъюгированное первое антитело связывается с антигеном, и затем меченое второе антитело связывается с первым антителом. Если второе антитело конъюгировано с ферментативной меткой, добавляют хромогенный или флуорогенный субстрат для визуализации антигена. Происходит усиление сигнала, поскольку несколько вторых антител могут взаимодействовать с различными эпитопами на первом антителе.

Первое и/или второе антитела, используемые для иммуногистохимии, обычно метят определяемой составляющей. Имеются многочисленные метки, которые можно, как правило, сгруппировать в следующие классы.

Помимо обсуждаемых выше процедур приготовления образца может быть желательной дополнительная обработка среза ткани до, во время или после ИНС. Например, можно выполнить способы восстановления эпитопа, такие как нагревание

образца ткани в цитратном буфере (см., например, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3): 201 (1996)).

После необязательной стадии блокирования срез ткани подвергают воздействию первого антитела в течение достаточного периода времени и при подходящих условиях, так чтобы первое антитело связалось с целевым белковым антигеном в образце ткани. Условия, подходящие для достижения этого, можно определить с помощью рутинного экспериментирования. Степень связывания антитела с образцом определяют с помощью использования любой из определяемых меток, обсуждаемых выше. Предпочтительно метка является ферментативной меткой (например, HRPO), которая катализирует химическое преобразование хромогенного субстрата, такого как хромоген 3,3'-диаминобензидин. Предпочтительно ферментативная метка конъюгирована с антителом, которое специфически связывается с первым антителом (например, первым антителом является кроличье поликлональное антитело, а вторым антителом является козье антикроличье антитело).

Приготовленные таким образом образцы можно закрепить и покрыть покровным стеклом. Затем проводят оценку микроскопического препарата, например, используя микроскоп, и можно использовать критерии интенсивности окрашивания, обычно используемые в данной области. Критерии интенсивности окрашивания определяют следующим образом.

Таблица 2	
Характер окрашивания	Показатель
Окрашивания клеток не наблюдается	0
Нечеткое/едва воспринимаемое окрашивание обнаруживается для не более 10% клеток	1+
Окрашивание от слабого до умеренного обнаруживается для не более 10% клеток	2+
Окрашивание от умеренного до сильного обнаруживается для не более 10% клеток	3+

Как правило, показатель характера окрашивания, составляющий приблизительно 2+ или выше в анализе ИНС, является диагностическим и/или прогностическим. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения показатель характера окрашивания, составляющий приблизительно 1+ или выше, является диагностическим и/или прогностическим. В других вариантах осуществления настоящего изобретения показатель характера окрашивания, составляющий приблизительно 3+ или выше, является диагностическим и/или прогностическим. Понятно, что, когда клетки и/или ткань опухоли или аденомы ободочной кишки проверяют, используя ИНС, окрашивание, как правило, определяется или оценивается в клетке и/или ткани опухоли (в противоположность стромальной или окружающей ткани, которая может присутствовать в образце).

Другие способы анализа, известные как конкурентные анализы или сэндвич-анализы, являются хорошо установленными и широко используются в коммерческой диагностической отрасли.

Конкурентные анализы основаны на способности индикаторного аналога EphB4 конкурировать с EphB4 проверяемого образца за ограниченное число антигенсвязывающих сайтов антитела против EphB4. Антитело против EphB4, как правило, находится в нерастворимой форме до или после конкуренции, и затем индикатор и EphB4, связанные с антителом против EphB4, отделяют от несвязанных индикатора и EphB4. Это отделение осуществляют с помощью декантирования (если партнер по связыванию был ранее переведен в нерастворимую форму) или центрифугирования (если партнер по связыванию был подвергнут преципитации после конкурентной реакции). Количество EphB4 в проверяемом образце обратно

пропорционально количеству связавшегося индикатора, измеряемому по количеству маркерного вещества. Кривые доза-ответ с использованием известных количеств EphB4 строят и сравнивают с результатами испытания для определения количества EphB4, присутствующего в проверяемом образце. Эти анализы называются системами ELISA, если в качестве определяемых маркеров используют ферменты.

В другой разновидности конкурентного анализа, называемого «гомогенным» анализом, фазового разделения не требуется. Здесь конъюгат фермента с EphB4 готовят и используют так, чтобы, когда антитело против EphB4 связывалось с EphB4, присутствие антитела против EphB4 модифицировало бы ферментативную активность. В этом случае EphB4 или его иммунологически активные фрагменты конъюгируют с использованием бифункционального органического мостика с ферментом, таким как пероксидаза. Конъюгаты выбирают для использования с антителом против EphB4 так, чтобы связывание антитела против EphB4 ингибировало или увеличивало бы ферментативную активность метки. Этот способ сам по себе широко практикуется под названием ЕМІТ.

В способах стерического препятствия для гомогенного анализа используются стерические конъюгаты. Эти конъюгаты синтезируют с помощью ковалентного связывания низкомолекулярного гаптена с небольшим фрагментом EphB4, так что антитело против гаптена по существу не способно связывать конъюгат в то же самое время, когда связывается антитело против EphB4. В соответствии с процедурой этого анализа EphB4, присутствующий в проверяемом образце, будет связывать антитело против EphB4, тем самым позволяя антителу против гаптена связываться с конъюгатом, что будет приводить к изменению свойства конъюгированного гаптена, например изменению флуоресценции, если гаптен является флуорофором.

Сэндвич-анализы, в частности, применимы для определения EphB4 или антител против EphB4. В последовательных сэндвич-анализах иммобилизованное антитело против EphB4 используют для адсорбции EphB4 проверяемого образца, проверяемый образец удаляют, например, с помощью промывки, связанный EphB4 используют для адсорбции второго меченого антитела против EphB4 и связанный материал затем отделяют от остающегося индикатора. Количество связанного индикатора прямо пропорционально EphB4 в проверяемом образце. В «одновременных» сэндвич-анализах проверяемый образец не отделяют до добавления меченого антитела против EphB4. Последовательный сэндвич-анализ, в котором в качестве одного антитела используется моноклональное антитело против EphB4, а в качестве другого антитела - поликлональное антитело против EphB4, применим для проверки образцов на наличие EphB4.

Предшествующее описание является только приведенными в качестве примеров анализами для обнаружения EphB4. Другие способы определения EphB4, которые разработаны в настоящее время или будут разработаны в дальнейшем, в которых используется антитело против EphB4, в том числе описанные здесь биоанализы, включены в объем настоящего изобретения.

Изделия производства

В другом аспекте настоящего изобретения обеспечивается изделие производства, содержащее материал, используемый для лечения, предотвращения и/или диагностики описанных здесь нарушений. Изделие производства включает контейнер и этикетку или листовку-вкладыш, вложенные или связанные с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, пузырьки, флаконы, шприцы и т.п. Контейнеры могут состоять из множества материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер

удерживает композицию, которая является сама по себе или в комбинации с другой композицией(ями) эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может быть мешком с раствором для внутривенного введения или флаконом с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По крайней мере один активный агент в композиции является антителом настоящего изобретения. Этикетка или листовка-вкладыш указывают на то, что композиция применима для лечения предпочтительного состояния, такого как рак. Кроме того, изделие производства может включать (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, причем композиция содержит антитело настоящего изобретения; и (b) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, причем композиция содержит дополнительный цитотоксический агент. В этом варианте осуществления настоящего изобретения изделие производства может дополнительно включать листовку-вкладыш, указывающую на то, что первая и вторая содержащая антитело композиции могут использоваться для лечения конкретного состояния, например рака. Альтернативно или дополнительно, изделие производства может, кроме того, включать второй (или третий) контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BWFI), забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Изделие производства может, кроме того, включать другие материалы, желаемые с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иголки и шприцы.

Ниже приведены примеры способов и композиций настоящего изобретения. Понятно, что различные другие варианты осуществления настоящего изобретения можно осуществить на практике, исходя из общего описания, приведенного выше.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Создание антител против EphB4

Антитела против EphB4 создавали с использованием фагового дисплея, используя для отбора фага белок EphB4-His. В данной области известно множество способов создания библиотек фагового дисплея, из которых можно получить представляющее интерес антитело. Один из способов создания представляющих интерес антител путем использования библиотеки в виде фагового дисплея описан Lee и др. (J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93). Клоны, отбираемые с использованием фагового дисплея, скринировали против белка EphB4-His, используя ELISA фагов. Уникальные клоны были отобраны для дальнейшего определения свойств с помощью конкурентного ELISA фагов и анализа блокирования для определения того, может ли фаговый клон антитела блокировать взаимодействия EphB4-эфрин-B2. Клон 30.35 проявлял подходящие свойства и был выбран для дальнейшего анализа. Для увеличения аффинности клона 30.35 создавали библиотеки в виде фагового дисплея на фоне YW30.35, при этом каждая из них была нацелена на выбранный HVR для мягкой или жесткой рандомизации. Отобранные клоны скринировали с помощью ELISA фагов и затем экспрессировали в виде белка Fab и их аффинности определяли, используя BIAcore. Формат отобранных клонов изменяли на полноразмерные IgG и их аффинности определяли, используя BIAcore. Последовательности родительского клона 30.35 и клонов с созревшей аффинностью представлены на фиг. 1.

Пример 2: Характеристика антител против EphB4

Для определения аффинности связывания мАт против EphB4 использовали измерение резонанса на поверхностных плазмонах с BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc.,

Piscataway). Кратко, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore, Inc.) активировали с помощью N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитело против EphB4 разводили с использованием 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл до инъекции со скоростью потока 5 мкл/минуту для достижения приблизительно 500 единиц ответа (RU) связанного антитела. Затем для блокирования непрореагировавших групп инъецировали 1 М этаноламин. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения молекул EphB4-His (0,7 нМ - 500 нМ) или человека, или мыши инъецировали в PBS с 0,05% Tween-20 при 25°C со скоростью потока 25 мкл/минуту. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием ленгмюровской модели простого связывания в соотношении 1:1 (версия 3,2 программного обеспечения для оценки BIAcore). Константу диссоциации при равновесии (K_d) рассчитывают в виде отношения k_{off}/k_{on} . Результаты этого эксперимента представлены в таблице 3. «Н.о.» означает, что измерения не проводились.

Таблица 3						
Кинетики и аффинность связывания антител против EphB4 с EphB4 человека и мыши						
Анти-EphB4	антиген мыши			антиген человека		
	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	K_d (нМ)	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	K_d (нМ)
YM30.35	0,31	0,75	2,4	0,03	0,96	32
YM30.35.1D2	1,28	<0,05	<0,04	0,36	<0,05	<0,14
YM30.35.2D8	0,92	<0,05	<0,05	0,4	<0,05	<0,12
YM30.35.2D12	н.о.	н.о.	н.о.	0,27	<0,05	<0,19
YM30.35.2D13	н.о.	н.о.	н.о.	0,45	<0,05	<0,11

В различных экспериментах проверяли перекрестную реактивность клон 30.35 антитела против EphB4 с другими рецепторами EphB4. Вкратце, клетки COS7 временно трансфицировали плазмидами, экспрессирующими полноразмерный EphB1 человека, EphB2 человека, EphB3 человека или EphB6 человека. Через 24 часа после трансфекции клетки подвергали анализу FACS для определения связывания антителами против EphB4, если такое связывание происходило. Анти-EphB4 клон 30.35 не реагировал перекрестно с EphB1 человека, EphB2 человека, EphB3 человека или EphB6 человека.

Пример 3: Антитело против EphB4 блокировало передачу сигнала от рецептора EphB4 в анализе на основе клеток

Для того чтобы продемонстрировать способность антител против EphB4 блокировать взаимодействие связанных с мембранами эфрина-B2 и EphB4, авторы настоящего изобретения провели анализ на основе клеток, в котором EphB4 и эфрин-B2 представлялись различными типами клеток. Клетки 3Т3, сверхэкспрессирующие эфрин-B2 человека, использовали для стимуляции клеток HUVEC, которые экспрессировали высокий уровень EphB4, но низкий уровень эфрина-B2, и проверяли способность антитела против EphB4 ингибировать активацию EphB4.

Клетки 3Т3, сверхэкспрессирующие эфрин-B2 человека, готовили следующим образом: полноразмерный эфрин-B2 человека клонировали в вектор pcDNA5/FRT (Invitrogen) и впоследствии использовали для создания стабильной клеточной линии с использованием клеток 3Т3.Flp (Invitrogen) в соответствии с руководством производителя.

Клетки HUVEC покрывали клетками 3Т3, сверхэкспрессирующими эфирин-B2 человека, на 15 или 30 минут, в присутствии или отсутствие антитела против EphB4. Активацию рецептора EphB4 определяли с помощью иммунопреципитации белка EphB4, затем обнаружения присутствия или отсутствия фосфорилирования тирозина рецептора с использованием антитела против фосфотирозина (антитела 4G10; Upstate), используя вестерн-блоттинг. Вкратце, клетки лизировали с использованием буфера RIPA. Лизаты клеток осветляли с помощью центрифугирования и добавляли антитело против EphB4 35.2D8 в количестве 5 мкг/образец. После инкубации при 4°C в течение двух часов иммунокомплекс извлекали с использованием агарозы с белком А. Фосфорилирование EphB4 анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела против фосфотирозина 4G10 (Upstate) в концентрации 1 мкг/мл.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 7. Покрытие клеток HUVEC клетками 3Т3 приводило к эффективному фосфорилированию тирозина EphB4 (линии 4 и 5). Предварительная инкубация в течение 30 минут HUVEC с антителом против EphB4 (клоном 35.2D8 в количестве 5 мкг/мл) эффективно аннулировала фосфорилирование тирозина EphB4, индуцируемое покрытием клетками 3Т3-эфедрин-B2 (линия 6). Напротив, обработка клеток HUVEC только антителом против EphB4 не вызывала активацию EphB4 в HUVEC (линии 2 и 3), и не подвергнутые обработке клетки HUVEC не демонстрировали активацию EphB4. Эти результаты доказывают, что антитело против EphB4 блокирует взаимодействие лиганд-рецептор в контексте прямого контакта клетка-клетка.

Хотя вышеприведенное изобретение описано подробно ради иллюстрации и примера для целей четкости понимания, описание и примеры не следует рассматривать в качестве ограничения объема настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенное антитело против EphB4, включающее последовательности гипервариабельных участков (HVR) HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, где указанные HVR по порядку имеют последовательности, выбранные из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 9, 11, 13, 1, 3 и 7; (b) SEQ ID NO: 10, 12, 14, 1, 3 и 8; (c) SEQ ID NO: 9, 11, 15, 2, 4 и 7; (d) SEQ ID NO: 9, 11, 16, 1, 5 и 7; и (e) SEQ ID NO: 9, 11, 17, 1, 6 и 7.

2. Антитело по п.1, где антитело включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый по порядку имеет последовательность SEQ ID NO: 9, 11, 13, 1, 3 и 7.

3. Антитело по п.1, где антитело включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый по порядку имеет последовательность SEQ ID NO: 10, 12, 14, 1, 3 и 8.

4. Антитело по п.1, где антитело включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый по порядку имеет последовательность SEQ ID NO: 9, 11, 15, 2, 4 и 7.

5. Антитело по п.1, где антитело включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый по порядку имеет последовательность SEQ ID NO: 9, 11, 16, 1, 5 и 7.

6. Антитело по п.1, где антитело включает HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где каждый по порядку имеет последовательность SEQ ID NO: 9, 11, 17, 1, 6 и 7.

7. Антитело по любому из пп.1-6, в котором, по крайней мере, часть последовательности каркасной области является консенсусной последовательностью каркасной области человека.

8. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело включает консенсусную последовательность каркасной области подгруппы к человека.

9. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело включает консенсусную последовательность каркасной области тяжелой цепи подгруппы III человека.

10. Антитело по п.9, где антитело включает замену в одном или более из положений 71, 73 или 78, где активность связывания с EphB4, по существу, сохраняется.

11. Антитело по п.10, в котором замена представляет собой одну или более из следующих замен: R71A, N73T или N78A.

12. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-11.

13. Экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид по п.12.

14. Клетка-хозяин, способная экспрессировать экзогенный генетический материал, включающая вектор по п.13.

15. Клетка-хозяин по п.14, где клетка-хозяин является прокариотической клеткой.

16. Клетка-хозяин по п.14, где клетка-хозяин является эукариотической клеткой.

17. Клетка-хозяин по п. 16, где клетка-хозяин является клеткой млекопитающего.

18. Способ получения антитела против EphB4, причем указанный способ включает (а) экспрессирование вектора по п.13 в подходящей клетке-хозяине и (б) извлечение указанного антитела.

19. Способ получения иммуноконъюгата с антителом против EphB4, причем указанный способ включает (а) экспрессирование вектора по п.13 в подходящей клетке-хозяине; (б) извлечение указанного антитела и (с) конъюгирование антитела с цитотоксическим агентом.

20. Способ по п.18 или 19, в котором клетка-хозяин является прокариотической клеткой.

21. Способ по п.18 или 19, в котором клетка-хозяин является эукариотической клеткой.

22. Способ обнаружения EphB4, причем способ включает обнаружение комплекса EphB4 - антитело против EphB4 в биологическом образце, где антитело против EphB4 в комплексе является антителом против EphB4 по любому из пп.1-11.

23. Способ диагностирования нарушения, ассоциированного с экспрессией EphB4, причем способ включает обнаружение комплекса EphB4 - антитело против EphB4 в биологическом образце от пациента, у которого имеется указанное нарушение или подозревается его наличие, где антитело против EphB4 в комплексе является антителом против EphB4 по любому из пп.1-11.

24. Способ по п.22 или 23, в котором антитело против EphB4 является меченным обнаруживаемой меткой.

25. Композиция для лечения или предотвращения болезненных состояний, ассоциируемых с экспрессией и/или активностью EphB4, содержащая эффективное количество антитела против EphB4 по любому из пп.1-11.

26. Композиция для лечения или предотвращения болезненных состояний, ассоциируемых с экспрессией и/или активностью EphB4, содержащая эффективное количество полинуклеотида по п.12 или вектора по п.13.

27. Композиция по п.25 или 26, где композиция дополнительно содержит носитель.

28. Применение антитела против EphB4 по любому из пп.1-11 для приготовления лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза у субъекта, нуждающегося в

таким лечением.

29. Применение по п.28, где лекарственное средство предназначено для применения в сочетании с антиангиогенным агентом.

5 30. Применение по п.29, где антиангиогенный агент предназначен для введения до или после введения антитела против EphB4.

31. Применение по п.29, где антиангиогенный агент предназначен для одновременного введения с антителом против EphB4.

10 32. Применение по любому из пп.29-31, где антиангиогенный агент представляет собой антагонист фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

33. Применение по п.32, в котором антагонист VEGF представляет собой антитело против VEGF.

34. Применение по п.33, в котором антителом против VEGF является бевацизумаб.

15 35. Применение по любому из пп.28-34, где лекарственное средство предназначено для применения в сочетании с химиотерапевтическим агентом.

20 36. Применение антитела против EphB4 по любому из пп.1-11 для приготовления лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения нарушения, где нарушение представляет собой рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток.

25

30

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Yan Wu and Minhong Yan

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЕРНВ4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> P2300R1

<150> US 60/756,889

<151> 2006-01-05

<150> US 60/760,892

<151> 2006-01-20

<160> 62

<210> 1

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR-H1

<400> 1

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

<210> 2

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR-H1

<400> 2

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

<210> 3

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR-H2

<400> 3

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

Val Lys Gly

<210> 4

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HVR-H2

<400> 4
 Gly Gly Ile Tyr Leu Tyr Gly Ser Ser Ser Glu Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 5
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR-H2

<400> 5
 Gly Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Gly Ser Arg Gly Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR-H2

<400> 6
 Gly Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 7
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR-H3

<400> 7
 Ala Arg Gly Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gly Leu Asp Tyr Ala Met
 1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 8
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR-H3

<400> 8
 Ala Arg Ser Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gly Leu Asp Tyr Ala Met
 1 5 10 15

Asp Tyr

```

<210> 9
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR-L1

<400> 9
  Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
                5                               10

<210> 10
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR-L1

<400> 10
  Arg Ala Ser Gln Asp Ser Glu Ile Phe Leu Ala
                5                               10

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

<220>
<223> HVR-L2

<400> 11
  Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
                5

<210> 12
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR-L2

<400> 12
  Ser Ala Ser Asn Leu Glu Ser
                5

<210> 13
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HVR-L3

<400> 13
  Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
                5

<210> 14

```

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

<220>
 <223> HVR-L3

<400> 14
 Gln Gln Ser Asn Ala Val Pro Leu Thr
 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR-L3

<400> 15
 Gln Glu Ser Thr Thr Thr Pro Pro Thr
 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HVR-L3

<400> 16
 Gln Lys Ser Glu Thr Ile Pro Pro Ser
 5

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

<220>
 <223> HVR-L3

<400> 17
 Gln Gln Thr Ala Gln Thr Pro Glu Thr
 5

<210> 18
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи huMab4D5-8

<400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

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

<210> 19
<211> 87
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 20
<211> 81
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21
<211> 80
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 22
<211> 79
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 23
<211> 87
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 23

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Val	Ser
				20					25					30
Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg
				35					40					45
Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys
				50					55					60
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				65					70					75
Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
				80					85					

<210> 24

<211> 81

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 24

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro
				20					25					30
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp
				35					40					45
Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala
				50					55					60
Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				65					70					75
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				80										

<210> 25

<211> 80

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 25

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro

				20					25					30	
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	
				35					40					45	
Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	
				50					55					60	
Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
				65					70					75	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				80											

<210> 26
 <211> 79
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 26															
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	
1				5					10					15	
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	
				20					25					30	
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	
				35					40					45	
Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	
				50					55					60	
Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
				65					70					75	
Thr	Val	Ser	Ser												

<210> 27
 <211> 87
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 27															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
				20					25					30	
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	
				35					40					45	
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	
				50					55					60	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				65					70					75	

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 28
<211> 81
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 29
<211> 80
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 30
<211> 79
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 30

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
				20					25					30	
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	
				35					40					45	
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
				50					55					60	
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
				65					70					75	
Thr	Val	Ser	Ser												

<210> 31

<211> 87

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 31

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	
				20					25					30	
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	
				35					40					45	
Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	
				50					55					60	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	
				65					70					75	
Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
				80					85						

<210> 32

<211> 81

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 32

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

				35					40					45	
Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
				50					55					60	
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				65					70					75	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				80											

<210> 33
 <211> 80
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 33															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
				20					25					30	
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	
				35					40					45	
Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
				50					55					60	
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
				65					70					75	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				80											

<210> 34
 <211> 87
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 34															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	
				20					25					30	
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	
				35					40					45	
Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	
				50					55					60	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				65					70					75	
Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
				80					85						

<210> 35
 <211> 81
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 36
 <211> 80
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 37
 <211> 79
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 65 70 75
 Thr Val Ser Ser

<210> 38
 <211> 80
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Lys Val Glu Ile Lys
 80

<210> 39
 <211> 80
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 39
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val

```

              50              55              60
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
              65              70              75
Lys Val Glu Ile Lys
              80

```

```
<210> 40
<211> 80
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> Последовательность синтезирована

```
<400> 40  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
1          5              10              15  
  
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
                20             25             30  
  
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
            35           40           45  
  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu  
        50           55           60  
  
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
        65           70           75  
  
Lys Val Glu Ile Lys  
            80
```

```
<210> 41
<211> 80
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> Последовательность синтезирована

```
<400> 41  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu  
1          5          10          15  
  
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
                20          25          30  
  
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
                35          40          45  
  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
                50          55          60  
  
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
                65          70          75  
  
Lys Val Glu Ile Lys  
                80
```

```
<210> 42
<211> 23
```

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 42

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				20			

<210> 43

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 43

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

<210> 44

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 44

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

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

Tyr	Cys
-----	-----

<210> 45

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 45

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				5					10

<210> 46

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 46

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

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

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

<220>
<223> Последовательность синтезирована

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

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

<220>
<223> Последовательность синтезирована

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

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

<220>
<223> Последовательность синтезирована

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

<210> 50
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 50
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 51

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

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 51
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 52
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 52
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 53
 <211> 128
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи Mab30.35

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu	Trp	Val	Gly	Gly	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	
				50					55					60	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	
				65					70					75	
Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	
				80					85					90	
Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	
				95					100					105	
Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	
				110					115					120	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr								
				125											

<210> 54
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи Mab30.35

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	
1				5					10					15	
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	
				20					25					30	
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	
				35					40					45	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
				50					55					60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
				65					70					75	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
				80					85					90	
Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	
				95					100					105	
Ile	Lys	Arg													

<210> 55
 <211> 128
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи Mab30.35.1D2

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

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

<210> 56
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи Mab30.35.1D2

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

<210> 57
 <211> 128
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи Mab30.35.2D8

<400> 57

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

<210> 58

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи Mab30.35.2D8

<400> 58

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	20	25	30	
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	35	40	45	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	65	70	75	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Glu	80	85	90	
Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	95	100	105	
Ile	Lys	Arg																

<210> 59

<211> 128

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи Mab30.35.2D12

<400> 59

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

<210> 60

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи Mab30.35.2D12

<400> 60

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	
1				5					10					15	
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	
				20					25					30	
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	
				35					40					45	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
				50					55					60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
				65					70					75	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Lys	
				80					85					90	
Ser	Glu	Thr	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	
				95					100					105	

Ile Lys Arg

<210> 61

<211> 128

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи Mab30.35.2D13

<400> 61

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

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

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

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

Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
			65						70					75

Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met
			80						85					90

Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			95						100					105

Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
			110						115					120

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			125				

<210> 62

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи Mab30.35.2D13

<400> 62

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

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

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

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

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

Фиг. 2А

Фиг. 2В

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 38
EDVGYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 39
EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 40
EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 41

Фиг. 3

Каркасные последовательности легкой цепи huMAb4D5-8

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³
(SEQ ID NO:42)
LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO: 43)
LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO: 44)
LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:45)

Каркасные последовательности тяжелой цепи huMAb4D5-8 heavy chain

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:46)
HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:47)
HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b}
Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:48)
HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:49)

Фиг. 4

Каркасные последовательности легкой цепи huMAb4D5-8, модифицированной в положении 66 (подчеркнуто)

LC-FR1	¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys ²³ (SEQ ID NO:42)
LC-FR2	³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr ⁴⁹ (SEQ ID NO:43)
LC-FR3	⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys ⁸⁸ (SEQ ID NO:50)
LC-FR4	⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys ¹⁰⁷ (SEQ ID NO:45)

Каркасные последовательности тяжелой цепи huMAb4D5-8, модифицированной в положениях 71, 73 and 78 (подчеркнуто)

HC-FR1	¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser ²⁵ (SEQ ID NO:46)
HC-FR2	³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (SEQ ID NO:47)
HC-FR3	⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn ⁸³ Ser ^{83a} Leu ^{83b} Arg ^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys ⁹² (SEQ ID NO:51)
HC-FR4	¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (SEQ ID NO:49)

Фиг. 5

30.35

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDYADSVK
GYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLGGLDYAMDYWGQGLVT (SEQ ID
NO:53)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:54)

30.35.1D2

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDYADSVK
GYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGLRLGGLDYAMDYWGQGLVT (SEQ ID
NO:55)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDSEIFLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLESGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQSNVPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:56)

30.35.2D8

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISNYLHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYGSSEYADSVK
GYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLGGLDYAMDYWGQGLVT (SEQ ID
NO:57)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQESTTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:58)

30.35.2D12

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSRGYADSVK
GYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLGGLDYAMDYWGQGLVT (SEQ ID
NO:59)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQKSETIPPSFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:60)

30.35.2D13

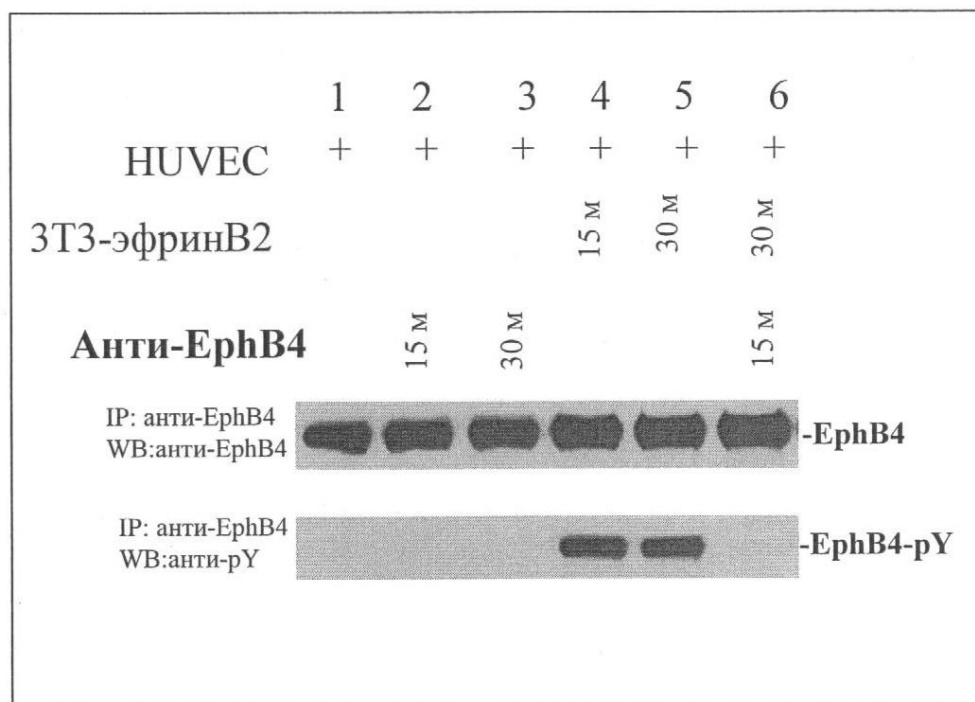
VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSTDYADSVK
GYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLGGLDYAMDYWGQGLVT (SEQ ID
NO:61)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTATPETFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:62)

Фиг. 6



Фиг. 7