

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2011/000384 A1

(43) Дата международной публикации
06 января 2011 (06.01.2011)

РСТ

- (51) Международная патентная классификация:
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки: РСТ/ЕА2009/000004
- (22) Дата международной подачи:
30 июня 2009 (30.06.2009)
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ОНКОМАКС" (OBHSESTVO S OGRANICHENNOY OTVETSTVENNOSTIU "ONKOMAX")** [RU/RU]; ул. Большая Якиманка, д.1, Москва, Moscow (RU).
- (72) Изобретатель; и
- (75) Изобретатель/Заявитель (только для US): **ТИМОФЕЕВ, Илья Валерьевич (TSIMAFEYEV, Ilya Valer'evich)** [BY/RU]; ул. Базовская, 4/1 - 15, Москва, 125635, Moscow (RU).
- (74) Агент: **ЧЕКМАРЁВА, Ольга Викторовна (CHEK-MAREVA Olga Viktorovna)**; ул. Гурьянова, 77-90, Москва, 109388, Moscow (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: METHOD FOR SUPPRESSING TUMOR GROWTH BY BLOCKING FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR, AND METHOD FOR DIAGNOSING MALIGNANT NEOPLASMS

(54) Название изобретения : СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛИ ПУТЕМ БЛОКИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ, СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Таблица 1

AA Экспрессия ФРФР1 на клетках рака почки людей (первичная опухоль, метастазы).
Сравнение с экспрессией ФРФР1 на клетках паренхимы почки здоровых людей и экспрессией ФРФР2 на клетках рака почки людей (первичная опухоль, метастазы).

	N	EE		EE	
		ФРФР1, %	ФРФР1: ядро, %	ФРФР2, %	ФРФР2: ядро, %
BB ПКР: первичная опухоль	100	98	68	4	-
CC ПКР: метастазы	40	82,5	-	5	-
DD Здоровые люди: паренхима почки	40	2,5	-	-	-

Таблица 2

FF Концентрация ФРФ 1 и 2 у пациентов с метастатическим ПКР до начала лекарственного лечения и у здоровых добровольцев.

	GG Здоровые люди	HH Пациенты с метастатическим ПКР	P
JJ ФРФ1, медиана, пг/мл	1,7	4,8	0,03
KK ФРФ2, медиана, пг/мл	0,2	6,9	<0,001

Table 1

AA Expression of FGFR1 in human renal cancer cells (primary tumor, metastases).
Comparison with the expression of FGFR1 in renal parenchyma cells from healthy individuals and the expression of FGFR2 in human renal cancer cells (primary tumor, metastases).

BB RCC: primary tumor
CC RCC: metastases
DD Healthy individuals: renal parenchyma
EE nucleus

Table 2

FF Concentration of FGF 1 and 2 in patients with metastatic renal cell cancer prior to medicinal treatment and in healthy individuals

GG Healthy individuals
HH Patients with metastatic RCC
JJ FGF1, median, pg/ml
KK FGF2, median, pg/ml

(57) Abstract: The invention pertains to the field of medicine and relates to a method for suppressing the growth of tumors, which comprises blocking the pathway of "human fibroblast growth factor / human fibroblast growth factor receptor 1 (domains II and IIIc)", and to a method for diagnosing malignant neoplasms. This pathological pathway leads to an excessive proliferation of tumor cells and to the formation of new vessels accompanied by the growth of primary tumors and metastases. This pathway also represents an independent mechanism of tumor resistance to preparations acting on other pathological pathways. Blocking the pathway of "fibroblast growth factor / fibroblast growth factor receptor 1" using various substances that neutralize the receptor by bonding only with domains II and IIIc thereof results in the interruption or slow-down of tumor growth. This receptor can also be used as a target for the targeted delivery of diagnostic agents as it is present in large amounts in the cells of numerous tumors. The invention is advantageous in that it makes it possible to develop new agents for diagnosing and treating diseases related to excessive proliferation and neovascularization

(57) Реферат:

[продолжение на следующей странице]

WO 2011/000384 A1



Опубликована:

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

Изобретение относится к медицине и включает способ подавления роста опухоли, основанный на блокировании пути «человеческий фактор роста фибробластов / человеческий рецептор 1 типа фактора роста фибробластов (домены II и IIIc)», а также способ диагностики злокачественных новообразований. Указанный патологический путь приводит к избыточной пролиферацией опухолевых клеток и образованию новых сосудов, что сопровождается ростом первичной опухоли и метастазов. Кроме того, описанный путь является независимым механизмом устойчивости опухоли к препаратам, воздействующим на другие патологические пути. Блокирование пути «фактор роста фибробластов / рецептор 1 типа фактора роста фибробластов» различными субстанциями, нейтрализующими рецептор через связывание только с его доменами II и IIIc, приводит к остановке или замедлению роста опухоли. Кроме того, данный рецептор может использоваться как мишень для целенаправленной доставки диагностических препаратов, т.к. находится в большом количестве на клетках многих опухолей. Преимущество изобретения заключается в разработке новых препаратов для диагностики и лечения заболеваний, связанных с избыточной пролиферацией и неоваскуляризацией.

СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛИ ПУТЕМ БЛОКИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ. СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ.

Описание

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к медицине и включает способ подавления роста опухоли, основанный на блокировании пути «человеческий фактор роста фибробластов / человеческий рецептор 1 типа фактора роста фибробластов (домены II и IIIc)», а также способ диагностики злокачественных новообразований. Указанный патологический путь приводит к избыточной пролиферацией опухолевых клеток и образованию новых сосудов, что сопровождается ростом первичной опухоли и метастазов. Кроме того, описанный путь является независимым механизмом устойчивости опухоли к препаратам, воздействующим на другие патологические пути. Блокирование пути «фактор роста фибробластов / рецептор 1 типа фактора роста фибробластов» различными субстанциями, нейтрализующими рецептор через связывание только с его доменами II и IIIc, приводит к остановке или замедлению роста опухоли. Кроме того, данный рецептор может использоваться как мишень для целенаправленной доставки диагностических препаратов, т.к. находится в большом количестве на клетках многих опухолей. Преимущество изобретения заключается в разработке новых препаратов для диагностики и лечения заболеваний, связанных с избыточной пролиферацией и неоваскуляризацией.

Полное описание изобретения

Известно, что в основе развития злокачественных новообразований лежит избыточная пролиферация клеток, а также образование кровеносных сосудов в опухоли, через которые происходит ее питание (ангиогенез).

Образование новых кровеносных сосудов происходит из уже существующего эндотелия и является важным компонентом многих заболеваний и нарушений, в том числе таких, как рост и метастазирование опухолей, ревматоидный артрит, псориаз, атеросклероз, диабетическая ретинопатия, ретролентальная фиброплазия, неоваскулярная глаукома, гемангиомы, иммунное отторжение трансплантированной роговицы и других тканей, а также хронические воспаления.

В случае роста опухолей ангиогенез имеет особенно важное значение при переходе от гиперплазии к неоплазии, а также для обеспечения питания растущей солидной опухоли

(J. Folkman et al. Nature; 339, 58 (1989). Ангиогенез также позволяет опухолям находиться в контакте с кровеносной системой хозяина, в результате чего могут быть определены направления метастазирования для клеток опухоли. Данные, подтверждающие роль ангиогенеза в метастазировании клеток опухоли, были получены, в частности, в результате исследований, показавших зависимость между количеством и плотностью микрососудов в инвазивном раке молочной железы и фактическим наличием дистантных метастазов (N. Weidner et al. New Eng. J. Med., 324: 1 (1991).

По многочисленным имеющимся данным пролиферация клеток опухоли, равно как и эндотелиальных клеток может быть вызвана различными полипептидами, которые естественным образом встречаются в природе. Одним из них является семейство факторов роста фибробластов (ФРФ). Впервые ФРФ был обнаружен в экстрактах гипофиза в 1973 году (H. Armelin. PNAS 70, 9 (1973).

ФРФ относятся к семейству гепарин-связывающих полипептидов, модулирующих функции различных клеток. ФРФ оказывает сильное влияние на пролиферацию и дифференцировку опухолевых и эндотелиальных клеток. В настоящее время выделяют 23 члена семейства ФРФ (ФРФ 1-23). Каждый член семейства имеет свои функциональные особенности. Наиболее хорошо изучены ФРФ 1 и 2 типов (кислый и основной). Для того, чтобы оказать воздействие на клетки, ФРФ должен связаться с рецептором на ее поверхности. Существуют 4 типа рецепторов ФРФ (ФРФР 1-4). С ФРФР1 связываются не только ФРФ 1 и 2, но и большинство других членов этого семейства, поэтому роль этого рецептора в проведении сигнала в клетку считается наиболее значимой.

ФРФР1 состоит из надмембранной, внутримембранной и внутриклеточной частей. Надмембранная часть рецептора состоит из 3 доменов (Д I-III), подобных иммуноглобулину. ФРФ, как правило, взаимодействуют с Д II и III; гепаран-сульфат, участвующий в формировании комплекса ФРФ/ФРФР1, взаимодействует с ДЗ. Альтернативный мРНК сплайсинг способствует образованию на поверхности клетки нескольких вариантов ФРФР1 (D Johnson, L. Williams. J Adv. Cancer Res., 60, 1 (1993); McKeehan et al. J Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 59, 135 (1998). Внутриклеточная часть рецептора представлена тирозинкиназой, при аутофосфорилировании которой происходит дальнейшее проведение сигнала в ядро и деление клетки.

Исследования Бюро по изучению рака почки

Изучая в рандомизированном исследовании эффекты низкомолекулярного гепарина (НМГ) у пациентов с метастатическим почечноклеточным раком (ПКР), нами было доказано, что гепарин влияет на выживаемость пациентов и частоту ответов на иммунотерапию. Мы предположили, что НМГ может связывать ФРФ, взаимодействовать

с его рецептором (ФРФР1), другими гепаран/гепарин-связывающими факторами (И.В. Тимофеев и соав. Российский онкологический журнал, №5 (2008); I. Tsimafeyeu et al. J. Clin. Oncology 25, 18S (2007). В другом исследовании мы показали, что у пациентов с метастатическим ПКР в 40% случаев встречаются нарушения в системе гемостаза, что также может быть вызвано повышенным образованием ФРФ и экспрессией ФРФР1 (I. Tsimafeyeu et al. J. Experimental & Clinical Cancer Research, 28, 30 (2009).

В дальнейших собственных исследованиях KCRB-L01 и KCRB-L02 мы изучали значение комплекса ФРФ/ФРФР1 в развитии ПКР.

KCRB-L01: Изучение экспрессии ФРФР у пациентов с ПКР. Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей 140 больных ПКР. Результаты сравнивали с экспрессией ФРФР у 40 здоровых доноров, которым ранее была произведена биопсия почки по разным причинам без последующего обнаружения заболеваний органа. Нами выявлена экспрессия ФРФР1 в 98% случаев на клетках первичной опухоли почки и в 82,5% случаев на клетках метастазов ПКР. Во всех случаях интенсивность окрашивания при иммуногистохимическом анализе была высокой (3+), что свидетельствует о сильной экспрессии рецептора. В 68% - получено ядерное окрашивание. Экспрессия ФРФР1 на клетках здоровой ткани почки выявлена в 1 случае (2,5%) за счет окрашивания сосудов. Таким образом, данное исследование подтвердило предположение о появлении и высокой экспрессии ФРФР1 как на клетках первичной опухоли, так и в метастазах ПКР (I. Tsimafeyeu et al. ESMO-ECCO 09 (2009): таблица 1.

В исследовании KCRB-L02 мы определяли концентрацию ФРФ 1 и 2, как основных факторов, обладающих митогенной активностью при связывании с ФРФР1, в плазме крови 38 больных метастатическим ПКР до начала таргетной терапии, при прогрессировании болезни на таргетной терапии, а также в плазме крови 38 здоровых добровольцев (методом ELISA). Нами установлено, что в крови здоровых людей уровни обоих ФРФ были достоверно ниже по сравнению с больными метастатическим ПКР (таблица 2). Наибольшие различия были продемонстрированы для ФРФ 2 ($p < 0,001$).

При прогрессировании заболевания на таргетной терапии (сунитиниб, сорафениб) происходило достоверное повышение ФРФ 2 - более чем на 50% ($p < 0,001$) и ФРФ 1 - более чем на 30% ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем ФРФ. При эффективности таргетной терапии изменение уровня обоих ФРФ достоверно не наблюдалось ($p = 0,3$). Медиана концентрации ФРФ 2 в плазме пациентов при прогрессировании болезни и без - достоверно отличалась ($p < 0,001$, фигура 1).

Кроме того, в этом исследовании анализировался уровень мишени для сунитиниба/сорафениба - фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС). Статистических

различий в концентрации ФРЭС в плазме пациентов с ПКР при прогрессировании болезни на терапии и исходным уровнем ($p=0,2$), а также корреляции с обоими ФРФ ($p>0,1$) не выявлено.

Таким образом, результаты исследований KCRB-L01 и KCRB-L02 свидетельствуют о том, что патологический путь ФРФ/ФРФР1 является не только независимым в развитии ПКР, но может определять устойчивость к существующей таргетной терапии опухолей.

Другие авторы также показали значение ФРФ/ФРФР1 при развитии таких опухолей, как немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак желудка и пищевода, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, опухоли головы и шеи, меланома (С. Behrens et al. J Clinical cancer research 14, 19 (2008); M. Koziczak et al. J Oncogene, 23, 20 (2004); K. Freier J Oral Oncology 43, 1 (2007); E. Shin et al. J Cancer Res Clin Oncol. 126, 9 (2000); K. Sugiura et al. J Oncology reports 17, 3 (2007); E. Devilard et al. J BMC Cancer 6, 272 (2006); G. Lefèvre et al. J Investigative Ophthalmology and Visual Science 50 (2009).

Основываясь на вышеизложенном, мы предположили, что блокирование пути ФРФ/ФРФР1 может привести к нарушению пролиферации опухолевых клеток и ингибированию ангиогенеза. Антагонисты ФРФР1, в том числе человеческие моноклональные антитела, могут быть использованы для подавления роста опухоли и ее метастазов. Кроме того, создание конъюгатов моноклонального антитела (его фрагментов) к ФРФР1 и контрастных веществ, может использоваться в диагностике злокачественных и других образований, клетки которых экспрессируют ФРФР1 в большом количестве.

Целью изобретения являлся способ подавления роста опухоли, заключающийся в блокировании (нейтрализации) доменов II и IIIc ФРФР1, а также способ диагностики опухолей, клетки которых экспрессируют ФРФР1.

Для проверки гипотезы и достижения целей были проведены исследования KCRB-L03, KCRB-L04 и KCRB-L05.

Во всех указанных исследованиях для блокирования ФРФР1 (под ФРФР1 далее понимается рецептор, соответствующий регистрационным номерам в международных базах Uniprot - P11362 и Entrez – 2260, а именно его домены II и IIIc (аминокислотная последовательность которых представлена на фигуре 2) в качестве веществ-антагонистов использовались синтезированные нами высокоспецифичные нейтрализующие моноклональные антитела: 1) против доменов ФРФР1 II и IIIc (IO-1); 2) против ФРФР1 и гепаран-сульфата (IO-2).

Термин "моноклональное антитело" используется здесь и далее для обозначения антитела, полученного из популяции достаточно однородных антител, т. е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны в своей специфичности и средству, за

исключением возможных, естественно встречающихся мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Необходимо обратить внимание на то, что в результате подобных, естественно встречающихся, мутаций состав моноклональных антител в данном изобретении, которое в большинстве своем содержит антитела, способные специфически связывать ФРФР1 или же комплекс ФРФР1/гепаран-сульфат или комплексы ФРФ/ФРФР1 или препятствовать связыванию ФРФ с ФРФР1.

Таким образом, термин "моноклональное" указывает на характер антитела, происходящего из достаточно однородной популяции антител, но здесь не имеется в виду, что антитела должны производиться каким-либо определенным путем. Например, моноклональные антитела, описанные в данном изобретении, могут быть получены гибридным методом (G. Köhler, C. Milstein. *J Nature* 256, 495 (1975) или с применением методов, использующих рекомбинантную ДНК (S. Cabilly et al. U.S. Patent N 4816567).

При получении моноклональных антител гибридным методом мышь или другое подходящее животное-хозяин иммунизируется антигеном посредством подкожной, внутриперитонеальной или внутримышечной инъекции с целью выявить лимфоциты, которые производят или же способны производить антитела, специфически связывающиеся с белком(ами), использованным(и) для иммунизации. В качестве альтернативы, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием соответствующего агента, например такого, как полиэтиленгликоль, чтобы создать гибридную клетку (J. Goding. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

В данном изобретении таким антигеном является ФРФР1 (домены II и IIIc) или же комплекс ФРФР1/гепаран-сульфат. Антиген может представлять собой фрагмент или часть ФРФР1, обладающие одним или несколькими аминокислотными остатками, которые участвуют в связывании ФРФ.

Приготовленные таким образом гибридные клетки высеваются и выращиваются в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно должна содержать одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых, родительских клеток миеломы. Например, в случае, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ или ГФРТ), культуральная среда для гибридом обычно будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ), каковые вещества препятствуют росту клеток, не обладающих ГГФРТ.

Предпочтительно выбирать такие клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень экспрессии антител в отобранных клетках,

производящих антитела, и являются чувствительными к средам, таким, например, как среда НАТ. Среди таких клеток предпочтительными клеточными линиями являются: мышинные линии миеломы, такие как линии, происходящие от мышинных опухолей МОРС-21 и МРС-11, которые можно получить из Центра распределения клеток Института им. Солка в Сан-Диего (Калифорния, США); клетки SP-2, которые можно получить из Американской коллекции типовых культур в Роквилле (Мэриленд, США); и клетки P3X63Ag8U.1, описанные Йелтоном и др. (J Surg. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1 (1978)). Кроме того, были описаны клеточные линии человеческой миеломы и человеческо-мышинной гетеромиеломы, способные производить человеческие моноклональные антитела (D. Kozbor et al. J Immunol. 133, 3001 (1984); B. Brodeur, P. Tsang Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker Inc., New York, 1987)).

Культурная среда, в которой выращиваются клетки гибридомы, подвергается анализу для производства моноклональных антител, направленных против соответствующего антигена. Предпочтительно, чтобы специфичность связывания моноклональных антител, производимых клетками гибридомы, была высокой. Данное изобретение включает те моноклональные антитела (IO-1/IO-2), которые показали высокую специфичность (не менее 5×10^9) связывания с указанными антигенами, определенную по стандартной методике «BIOCORE». Другими словами, антитела связывают по меньшей мере один из этих антигенов при анализе связывания и способны ингибировать биологическую активность ФРФР1. Высокая специфичность и сильное блокирование пути обеспечиваются благодаря одновременному связыванию с доменами II и IIIc данного рецептора.

После определения клеток гибридомы, которые производят антагонистические антитела желаемой специфичности, сродства и активности, клоны могут быть субклонированы методом ограниченных разбавлений и выращены стандартными методами (J. Goding. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). К подходящим культуральным средам относятся, например, среда Игла, модифицированная Дулбекко (СИМД), или среда RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут выращиваться *in vivo* в животных как асцитные опухоли.

Моноклональные антитела, продуцированные субклонами, отделяются от культуральной среды, асцитной жидкости или плазмы путем использования обычных методов иммуноглобулиновой очистки, таких как, например, белок А-Сефароза, гидроксиллапатитная хроматография, электрофорез в гелях, диализ или аффинная хроматография.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, описанные в данном изобретении, может быть с легкостью выделена и секвенирована обычными методами (например, с использованием олигонуклеотидных проб, способных связываться специфически с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепу мышиных антител). В качестве источника ДНК использовались клетки гибридомы. После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые затем трансфецируются в клетки хозяина, такие как обезьяньи клетки линии COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в иной ситуации не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для того чтобы достигнуть синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках хозяина.

ДНК может быть модифицирована по выбору для того, чтобы изменить характер иммуноглобулина, продуцируемого экспрессией этой ДНК. Так, например, гуманизированные формы мышиных антител могут быть получены путем замещения комплементарной определяющей области (CDR) варибельного домена мышиного антитела на соответствующую область человеческого антитела. В некоторых вариантах отдельные аминокислоты из базовой области (FR) мышиного антитела также замещаются на соответствующие аминокислотные остатки человеческого антитела (P. Carter et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 89, 4285 (1992); P. Carter et al. J Biotechnology 10, 163 (1992). Химерные формы мышиных антител могут быть получены также путем замещения гомологичных мышиных последовательностей ДНК на последовательность, кодирующую отдельные области человеческих постоянных цепей иммуноглобулина (тяжелой и легкой) (S. Cabilly et al. U.S. Patent N 4816567; S. Morrison et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 6851 (1984).

Антитела, используемые для проверки задач данного изобретения, включают мышиные антитела (IgG). Однако, могут быть получены другие формы антител - «гуманизированные», а также полностью человеческие, что лишь отражает процент человеческого белка и не влияет на специфичность связывания с антигеном, т.е. доказательства способа настоящего изобретения.

Кроме того, для блокирования ФРФР1 и его доменов могут быть легко получены все виды, классы антител (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) и подклассы иммуноглобулинов, а также и фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv), пока они обладают способностью связывать ФРФР1 и пока они проявляют антагонизм по отношению к биологической активности пути ФРФ/ФРФР1, которая проверена в данном изобретении.

В случае предпочитаемого варианта данного изобретения моноклональные антитела будут проявлять сродство к иммунизирующему антигену в размере по меньшей мере 10⁹ литров/моль (P. Munson, D. Rodbard. J Anal. Biochem. 107, 220 (1980). Кроме того,

моноклональные антитела обычно будут ингибировать митогенную или ангиогенную активность ФРФР1 по крайней мере на 90%, как определяется, например, анализом выживания или пролиферации клеток *in vitro*, подобно описанному в наших исследованиях KCRB-L03 (Пример 1) и KCRB-L04 (Пример 2).

Для терапевтических и диагностических применений желательно, чтобы моноклональные антитела реагировали не со всеми компонентами и молекулярными формами ФРФР1. Например, желательно получить моноклональное антитело, которое способно специфически связываться только с доменами ФРФР1 II и IIIc, а не с доменом I или другими доменами и изоформами рецептора. Для этого иммунизация производилась экстрацеллюлярной частью ФРФР1, включающей домены II и IIIc. Необходимые молекулярные формы антитела легко определяются путем сравнения анализов ELISA или путем сравнения иммунопрпитации различных полипептидов ФРФР1. Это дает возможность иммунизации различными изоформами ФРФР1.

ФРФР1 может быть заблокирован и другими известными способами, в частности, ингибиторами, созданными путем химического синтеза.

Терапевтическое использование способа блокирования пути ФРФ/ФРФР1

Для использования способа, описанного в настоящем изобретении, в терапевтической практике любые антагонисты ФРФ/ФРФР1 вводятся млекопитающему, предпочтительно человеку, в фармацевтически приемлемой форме, включая введение внутривенно, а также следующими путями: внутримышечной, интраперитонеальным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, внутрисиновиальным, внутривенным, оральным, локальным или ингаляционным.

Антагонисты также могут вводиться внутриопухолевым, околоопухолевым, внутриочаговым и околоочаговым путями для обеспечения локального действия наряду с системным терапевтическим действием. Подобные формы введения включают фармацевтически приемлемые носители, которые по своей природе не обладают ни токсическим, ни терапевтическим действием. Примерами таких носителей являются ионообменные вещества, квасцы, стеарат алюминия, лецитин, белки плазмы (такие, как белок плазмы человека), буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных овощных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидная окись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества с целлюлозной основой и полиэтиленгликоль.

Носители для локальной или основанной на геле форм антагонистов включают полисахариды, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы или метилцеллюлозы,

поливинилпирролидон, полиакрилаты, полимеры полиоксиэтиленполиоксипропиленового блока, полиэтиленгликоль и спирты. Для введения во всех случаях используются обычные лекарственные формы, получаемые со складов. К таким формам относятся, например, микрокапсулы, нанокапсулы, липосомы, пластыри, ингаляционные препараты, аэрозоли, подъязычные таблетки и препараты с постоянным высвобождением вещества. Антагонист в таких препаратах будет обычно содержаться в концентрации примерно от 0,1 мг/мл до 100 мг/мл.

Подходящие примеры препаратов с постоянным высвобождением вещества включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антагонист; подобные матрицы имеют определенную форму, например это могут быть пленки или микрокапсулы. К примерам матриц с постоянным высвобождением относятся полиэферы, гидрогели [например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат)] , описанные Лангером и др. (J. Biomed. Mater. Res. 15, 167 (1981) и Лангером (Chem. Tech. 12 (1982), или поли(винилалкоголь), полилактиды (Патент США N 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гаммаэтил-L-глутамата, описанные Сидман и др. (Biopolymers 22, 547 (1983), недеградируемый этиленвинилацетат (Лангер и др. см. выше), деградируемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как Lupron DepotTM (инъецируемые микросферы, состоящие из полимеров молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)- 3-гидроксипропионовой кислоты. В то время, как такие полимеры, как этиленвинилацетат и сополимер молочной и гликолевой кислот, способны к постоянному высвобождению молекул в течение более 100 дней, определенные гидрогели высвобождают белки за более короткие периоды времени. Когда инкапсулированные полипептидные антагонисты остаются в организме на долгое время, они могут денатурировать или агрегироваться в результате воздействия влаги при температуре 37°C, что ведет к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. С целью стабилизации могут быть разработаны разумные стратегии, в зависимости от действующего механизма. Например, если обнаружен механизм агрегации, выражающийся в формировании межмолекулярной S-S-связи посредством тиодисульфидного обмена, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации с целью удаления кислых растворов, контролирования влажности, использования соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных составов.

Антагонистические составы с постоянным высвобождением анти-ФРФР1 агента включают также антагонистические антитела, заключенные в липосомах. Липосомы, содержащие антагонисты, могут быть получены известными в данной области методами,

например, описанными Эпштейном и др. (Proc. Nat. Acad. Sci. 82, 3688 (1985); Хуанг и др. (Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 4030 (1980); Патент США N 4485045 и Патент США N 4544545. Липосомы, как правило, имеют небольшую величину (величиной около 200-800 ангстрем) и принадлежат к однослойному типу, в котором содержание липидов выше, чем 30 мол.% холестерина; выбранное соотношение может изменяться для подбора оптимальных условий терапии. Липосомы с продолжительным сроком циркуляции покрываются Патентом США N 5013556.

Еще одним путем использования данного изобретения является инкорпорирование антагониста пути ФРФ/ФРФР1 внутрь изделий, имеющих определенную форму. Такие изделия могут быть использованы для модулирования роста клеток эндотелия и ангиогенеза. Кроме того, такие изделия могут быть использованы для модулирования инвазии опухолей и метастазов.

Возможна конъюгация антагониста пути ФРФ/ФРФР1 и другого лечебного средства.

При профилактике или лечении заболевания необходимая доза антагониста будет зависеть от типа заболевания, от его степени серьезности и протекания, от того, вводятся ли антитела с профилактической или терапевтической целью, от предыдущей терапии, от истории болезни пациента и его реакции на антагонист и от указаний лечащего врача. Антагонист может вводиться пациенту различными способами, одновременно или в качестве серии назначений.

Антагонисты ФРФ/ФРФР1 могут быть использованы для лечения различных неопластических и ненеопластических заболеваний и нарушений. Неоплазмы и близкие состояния, которые поддаются такому лечению, включают почечноклеточный рак, рак легких, рак желудка, рак пищевода, колоректальный рак, рак печени, рак яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, гиперплазию эндометрия, эндометриоз, фибросаркомы, хориосаркомы, опухоли головы и шеи, гепатобластому, саркому Капоши, меланому, рак кожи, гемангиому, кавернозную гемангиому, гемангиобластому, рак поджелудочной железы, ретинобластомы, астроцитому, глиобластому, шванному, олигодендроглиому, медуллобластому, нейробластому, рабдомиосаркому, остеогенную саркому, лейомиосаркому, рак мочевого пузыря и другие уротелиальные опухоли, опухоль Вильмса, рак предстательной железы, аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факотозами.

Возможно применение способа при неонкологических заболеваниях, которые поддаются лечению, включая такие как ревматоидный артрит, псориаз, атеросклероз, диабетические и другие ретинопатии, фиброплазии, неоваскулярную глаукому, тироидные гиперплазии (в том числе болезнь Граве), трансплантацию роговицы и других тканей, хронические

воспаления, воспаление легких, нефротический синдром, асцит, преэклампсию, перикардиальный выпот (например, связанный с перикардитом) и плевральный выпот. В зависимости от типа заболевания и от степени его серьезности первоначальная доза для введения пациенту будет составлять от 1 мкг/кг до 15 мг/кг и может вводиться путем одного или многих отдельных введений или путем постоянного вливания. Обычная дневная доза может варьировать примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг и более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Для повторного введения в течение нескольких дней и более, в зависимости от условий, лечение повторяется, пока не достигается желаемое подавление симптомов болезни. Однако могут использоваться и другие режимы дозировки. Успех лечения легко определяется обычными методами и анализами, например методами рентгено-визуализации опухолей.

В соответствии с другим применением изобретения эффективность антагониста пути ФРФ/ФРФР1 в предотвращении или лечении болезней может быть улучшена путем введения антагониста серийно или же в комбинации с другим веществом, эффективным для данной цели, таким как фактор некроза опухоли, интерфероны, интерлейкины; антитела и ингибиторы, способный нейтрализовать или ингибировать ангиогенную активность фактора роста эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и его рецепторов и/или фактора роста гепатоцитов и/или эпидермального фактора роста и его рецепторов и/или фактора роста плаценты и/или mTOR и/или других внутриклеточных киназ или одно или более обычных терапевтических веществ, таких как, например, алкилирующие соединения, антагонисты фолиевой кислоты, антиметаболиты метаболизма нуклеиновых кислот, антибиотики, аналоги пиримидинов, 5-флуороурацил, пуриновые нуклеозиды, амины, аминокислоты, триазольные нуклеозиды или кортикостероиды. Подобные вещества могут присутствовать во вводимом составе или могут вводиться отдельно. Кроме того, антагонист пути ФРФ/ФРФР1 может вводиться серийно или же в комбинации с радиологическим лечением, которое может включать как иррадиацию, так и введение радиоактивных веществ.

В соответствии с одним из применений изобретения при комбинированной терапии подвергается атаке васкуляризация опухоли. Один или более антагонист ФРФ/ФРФР1 вводятся пациенту с опухолью в терапевтически эффективных дозах, определенных, например, при наблюдении некроза опухоли или ее метастазных фокусов, если они имеются. Такая терапия продолжается до тех пор, пока перестает наблюдаться дальнейшее улучшение или клиническое обследование показывает, что опухоль или ее метастазы исчезли. При прогрессировании болезни вводится одно или несколько описанных выше веществ(о) или гипертермия и лучевая терапия. Поскольку

эффективность дополнительных веществ будет варьировать, желательнее сравнить их влияние на опухоль путем стандартного матричного скрининга. Производится повторное введение антагониста ФРФ/ФРФР1 и дополнительного агента, пока не будет достигнут желаемый клинический эффект. В альтернативном случае антагонист(ы) ФРФ/ФРФР1 вводятся совместно и, при желании, вместе с дополнительными веществами.

Использование в диагностике

В диагностике могут быть использованы антитела к ФРФР1 и также к его доменам II и IIIc. Антитела обычно должны быть помечены остатком, который легко обнаружить. Это может быть любой остаток, который, прямо или косвенно, может продуцировать обнаруживаемый сигнал. Например, это могут быть радиоизотопы, такие как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I ; флюоресцентное или хемилюминесцентное соединение, такое как изотиоцианат флюоресцеина, родамин или люциферин; метки, помеченные радиоизотопами, такими как, например, ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C или ^3H , или ферменты, такие как щелочная фосфатаза, бетагалактозидаза или пероксидаза хрена.

Здесь может применяться любой известный в данной области метод для конъюгирования отдельных антител к обнаруживаемым остаткам, включая описанные методы Хантером и др. (J Nature 144, 945 (1962); Дэвидом и др. (J Biochemistry 13, 1014 (1974); Пейном и др. (J Immunol. Meth. 40, 219 (1981) и Нигреном (J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)). Антитела данного изобретения или ФРФР1 могут быть использованы в диагностике опухолей человека и млекопитающих. При этом антитело или ФРФР1, помеченные обнаруживаемым остатком, вводятся пациенту, предпочтительно в кровеносную систему, и анализируется присутствие и местонахождение меченого антитела или рецептора в организме пациента. Такая визуализация может использоваться, например, при определении стадии заболевания и при лечении неоплазм. Антитело или ФРФР1 метятся любым остатком, обнаружимым в организме млекопитающих, известными в этой области методами, например ядерным магнитным резонансом, радиологическим методом и т.д.

Ниже в качестве примеров представлены некоторые доказательства способа подавления роста опухоли, заключающегося в блокировании (нейтрализации) ФРФР1, а также способа диагностики опухолей, клетки которых экспрессируют ФРФР1. Нижеследующие примеры предлагаются только в качестве иллюстрации и не должны восприниматься как в чем-либо ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1 (Результаты исследования KCRB-L03): анализ выживания или пролиферации клеток in vitro, нарушение функции ФРФР1 при добавлении моноклонального антитела, блокирующего ФРФР1 домены II и IIIc

Для выбора модели клеточной линии были изучены различные линии клеток на предмет гиперэкспрессии ФРФР1:

- 1) человеческого почечноклеточного рака Сак1-1
- 2) человеческого рака молочной железы MCF7
- 3) человеческого рака предстательной железы Du145
- 4) человеческого немелкоклеточного рака легкого A549

Гиперэкспрессия ФРФР1 на клетках определялась в стандартном анализе Вестерн-блоттинг. Общий уровень экспрессии ФРФР1 на клетках составил 40%. Самый высокий уровень экспрессия ФРФР1 был выявлен на клетках линии человеческого почечноклеточного рака Сак1-1, самый низкий – на клетках человеческого рака предстательной железы Du145 (различия в 10 раз): фигура 3

Основываясь на полученных данных, линия человеческого почечноклеточного рака Сак1-1 была отобрана для дальнейших исследований.

Клетки были высеяны с плотностью 10^4 клеток/мл в 6-луночных пластинках. В каждую лунку были добавлены нейтрализующие моноклональные антитела IO-1 и IO-2 в равном объеме и различных концентрациях. Также в качестве контроля к части культуры было добавлено постороннее моноклонального антитела без нейтрализующей способности (приобретенное в Abscam). После инкубации в каждую лунку был добавлен ФРФ 2 по 10 нг/мл. В качестве дополнительного контроля часть клеток выращивалась в отсутствие как антител, так и ФРФ 2. После роста культуры в течение 3 недель клетки в каждой лунке были подсчитаны с помощью компьютерной программы на анализаторе Hewlett Packard Scanjet (США).

Как показано на фигурах 4 и 5, оба моноклональных антитела (IO-1 и IO-2) полностью ингибировали способность добавленного ФРФ 2 поддерживать рост и выживание клеток линии почечноклеточного рака (более чем на 90%). Достоверных различий в активности IO-1 и IO-2 выявлено не было. Моноклональное антитело к ФРФР1 без нейтрализующей способности (Abscam) не вызвало изменений в выживаемости клеток. В опыте было выявлено, что подавление митогенной активности зависит от дозы агента, блокирующего путь ФРФ/ФРФР1 (чем выше доза, тем выше митогенная активность). Общий вывод по данному примеру: при одновременном блокировании доменов II и IIIc ФРФР1 достигается сильное ингибирование роста опухолевых клеток.

Также в данном примере мы показываем, что блокирование рецептора фактора роста фибробластов приводит к нарушению аутофосфорилирования рецептора, что отражает его функциональное значение.

Для этого к описанным клеткам было добавлено антитело Ю-1 и через 1,5 часа – ФРФ 2, 10 нг/мл. Культивирование происходило в течение 5 минут при температуре 37С. Затем клетки были промыты и лизированы в специальном буфере для лизиса (50 ммоль HEPES (pH 7,4), 150 ммоль NaCl, 10% глицерол, 1% Тритон X-100, 1,5 ммоль MgCl₂, ингибиторы протеазы и 2 ммоль натрия ванадат). Инкубация лизата проводилась на льду в течении 30 минут, а затем он был центрифугирован (13000 оборотов в минуту, в течение 10 минут при температуре 4С). Концентрация белка в лизате была измерена в анализе Кумасси Плюс (Pierce). После этого проводились иммунопреципитация/Вестерн-блоттинг. Эти методы выполнялись по стандартному протоколу (Santa Cruz Biotechnology, США) с использованием 1 мг моноклонального антитела для связывания ФРФР1 (контрольное антитело; Santa Cruz Biotechnology), и анти-фосфотирозин (4G10) антител. Полученные пробы использовали для электрофореза с последующим выявлением копреципитированных белков в Вестерн-блоттинге. Часть клеток без добавления ФРФ 2 и антител использовалась для контроля.

Результаты представлены на Фигуре 6. Показано, что моноклональное антитело Ю-1 вызывает нарушение процессов фосфорилирования ФРФР1, тогда как контрольное антитело анти-ФРФР1 (Santa Cruz Biotechnology, США) не препятствовало нарушению фосфорилирования рецептора. Концентрации блокирующего агента (в данном случае Ю-1) влияют на фосфорилирование ФРФР1: чем выше концентрация, тем больше эффект.

Таким образом, пример 1 (исследование KCRB-L03) показывает, что клетки человеческого почечноклеточного рака в присутствии ФРФ 2 пролиферируют, а при блокировании рецептора-мишени ФРФР1 (только доменов II и IIIc) и нарушении его функции, перестают размножаться и теряют митогенную активность. Более того, в примере 1 продемонстрировано, что клетки в отсутствии ФРФ 2 также не пролиферируют и это свидетельствует о его митогенном значении (если ФРФ 2 связать, клетки также не будут пролиферировать).

Пример 2 (Результаты исследования KCRB-L04): анализ выживания или пролиферации эндотелиальных клеток in vitro, нарушение функции ФРФР1 на эндотелиоцитах при добавлении моноклонального антитела, блокирующего ФРФР1

Для анализа выживания эндотелиальных клеток в среде ФРФ и при блокировании ФРФР1 был проведен подобный эксперимент, что и при блокировании фактора роста эндотелиальных клеток сосудов, описанный в патенте США N 20090022716 (Rockwell; Patricia et al. US Patent 20090022716).

В качестве модели эндотелиоцитов использовались бычьи клетки капиллярного эндотелия коры надпочечников (КЭКН) (N. Ferrara et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 5773 (1987)

В начале мы выявили высокую экспрессию ФРФР1 на КЭКН в стандартном анализе Вестерн-блоттинг (Фигура 7).

Затем КЭКН были высеяны с плотностью 5×10^4 клеток/мл в 12-луночных пластинках. В каждую лунку было добавлено 10 нг/мл ФРФ 2 в присутствии или в отсутствие различных концентраций моноклональных антител к ФРФР1, а также постороннего моноклонального антитела без нейтрализующей активности к ФРФР1 (Abcam). После роста культуры в течение 5 дней клетки в каждой лунке были подсчитаны с помощью компьютерной программы на анализаторе Hewlett Packard Scanjet (США). В качестве дополнительного контроля КЭКН выращивались в отсутствие ФРФ 2.

Как показано на Фигуре 8, оба моноклональных антитела к ФРФР1 ингибировали способность добавленного ФРФ 2 поддерживать рост и выживание бычьих КЭКН. Моноклональное антитело без нейтрализующей активности (Abcam) не оказывало никакого действия на клетки.

Таким образом, пример 2 демонстрирует, что при блокировании пути ФРФ/ФРФР1 эндотелиальные клетки перестают размножаться и теряют митогенную активность, что может приводить к нарушению ангиогенеза в опухолях.

Пример 3 (Результаты исследования KCRB-L05): Ингибирование роста опухоли in vivo при блокировании пути ФРФ/ФРФР1

Самкам мышей (Beige/nude) возрастом 5-6 недель (приобретенным в Harlan Sprague Dawley, Inc. (Индианаполис, США) были подкожно введены 2×10^6 опухолевых клеток линии человеческого почечноклеточного рака Saki-1 в 100 мкл физиологического раствора с фосфатным буфером (ФРФБ). После того, как установился рост опухоли, мыши были разделены на 3 группы.

Первой (лечебной) группе мышей вводили интраперитонеально 2 раза в неделю моноклональное антитело Ю-1 к ФРФР1 в дозе 100 мкг/кг. Второй (лечебной) группе мышей вводили интраперитонеально 2 раза в неделю моноклональное антитело Ю-2 к ФРФР1/гепаран-сульфату в дозе 100 мкг/кг. Третьей (контрольной) группе мышей вводился физиологический раствор. Каждая группа включала 15 мышей.

Величина опухоли измерялась каждые 5 дней, и по завершении исследования опухоли были вырезаны и взвешены.

Влияние моноклональных антител/физиологического раствора на рост (объем) опухолей показан на фигуре 9. На рисунке видно, что у тех мышей, которым были введены

моноклональные антитела, блокирующие ФРФР1, объем опухоли был значительно меньше, чем у мышей из контрольной группы.

Вес (медиана) опухоли мышей контрольной группы был достоверно выше по сравнению с мышами лечебных групп ($p < 0,001$). Количество метастазов в легкие также было достоверно выше у мышей контрольной группы ($p < 0,01$).

У тех мышей, которые получали нейтрализующие моноклональные антитела, начиная с первой недели после инокуляции клетками Саки-1, скорость роста опухолей была значительно более медленной, чем у мышей, которым вводили физиологический раствор.

На основании этих данных был сделан вывод об эффективности способа подавления роста опухоли *in vivo* путем блокирования пути ФРФ/ФРФР1 (через блокирование доменов II и IIIc ФРФР1).

Формула

1. Способ подавления роста опухоли, отличающийся тем, что основан на блокировании (нейтрализации) доменов II и IIIc рецептора 1 типа фактора роста фибробластов или комплекса рецептора 1 типа фактора роста фибробластов и гепаран-сульфата.
2. Моноклональное антитело, которое способно одновременно связываться с доменами II и IIIc рецептора 1 типа фактора роста фибробластов.
3. Моноклональное антитело, которое способно связываться с комплексом рецептора 1 типа фактора роста фибробластов и гепаран-сульфата, а также только с гепаран-сульфатом, гепарином.
4. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что ингибирует митогенную активность рецептора 1 типа фактора роста фибробластов или его комплекса с гепаран-сульфатом не менее чем на 90%.
5. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что содержит аминокислотную последовательность домена Fc тяжелой цепи одного из: IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgM.
6. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что включает домен Fc человека.
7. Моноклональное антитело по п.6, отличающееся тем, что включает домен Fv мыши.
8. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что состоит из белка человека на 100%.
9. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что дополнительно включает неиммуноглобулиновый полимер.
10. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что дополнительно включает цитотоксическую часть или аминокислотную последовательность цитокина.
11. Моноклональное антитело по п.10, отличающееся тем, что цитотоксическая часть или аминокислотная последовательность цитокина замещены на последовательность Fc.
12. Моноклональное антитело по п.10, отличающееся тем, что цитотоксической частью является полипептидный токсин.
13. Моноклональное антитело по п.12, отличающееся тем, что цитотоксическая часть способна действовать как Fc-эффектор или способна к рекрутингу иммунокомпетентных клеток.
14. Моноклональное антитело по п.13, отличающееся тем, что цитотоксическая часть является полипептидом, способным связывать комплемент.

15. Моноклональное антитело по п.2 и п.3, отличающееся тем, что способно связываться с человеческим рецептором 1 типа фактора роста фибробластов и является антагонистом взаимодействия фактора роста фибробластов и рецептора 1 типа фактора роста фибробластов.

16. Способ диагностики злокачественных новообразований, основанный на использовании доменов II и IIIc рецептора 1 типа фактора роста фибробластов или комплекса рецептора 1 типа фактора роста фибробластов и гепаран-сульфата.

Таблицы и Фигуры

Таблица 1

Экспрессия ФРФР1 на клетках рака почки людей (первичная опухоль, метастазы). Сравнение с экспрессией ФРФР1 на клетках паренхимы почки здоровых людей и экспрессией ФРФР2 на клетках рака почки людей (первичная опухоль, метастазы).

	N	ФРФР1, %	ФРФР1: ядро, %	ФРФР2, %	ФРФР2: ядро, %
ПКР: первичная опухоль	100	98	68	4	-
ПКР: метастазы	40	82,5		5	-
Здоровые люди: паренхима почки	40	2,5	-	-	-

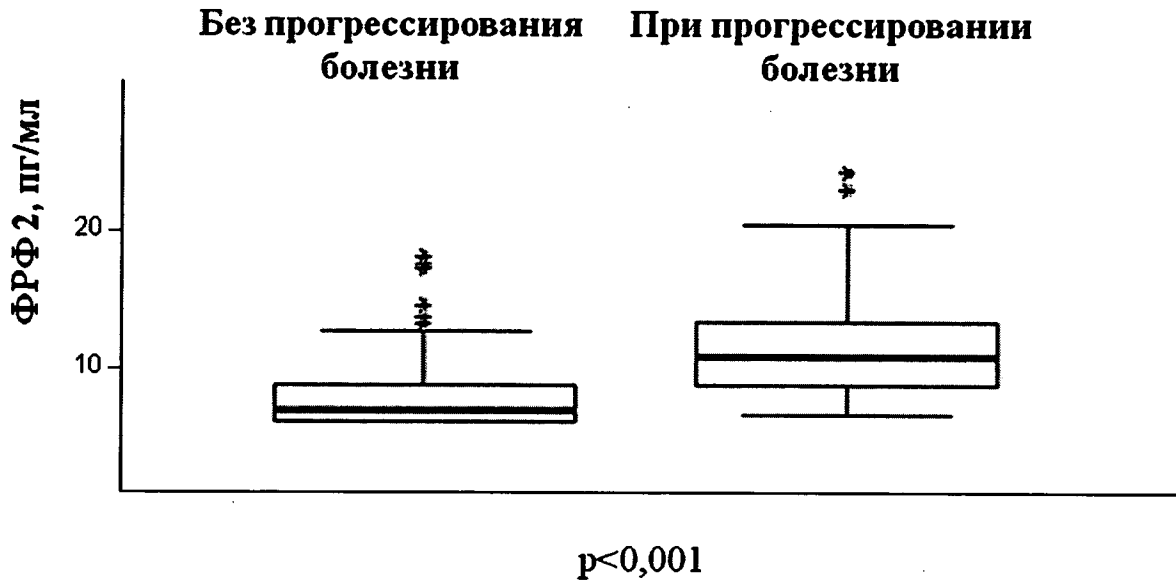
Таблица 2

Концентрация ФРФ 1 и 2 у пациентов с метастатическим ПКР до начала лекарственного лечения и у здоровых добровольцев.

	Здоровые люди	Пациенты с метастатическим ПКР	P
ФРФ1, медиана, пг/мл	1,7	4,8	0,03
ФРФ2, медиана, пг/мл	0,2	6,9	<0,001

Фигура 1

Различия в концентрации ФРФ2 у пациентов с метастатическим ПКР с прогрессированием болезни и с клиническим эффектом при лечении таргетными препаратами



Фигура 2

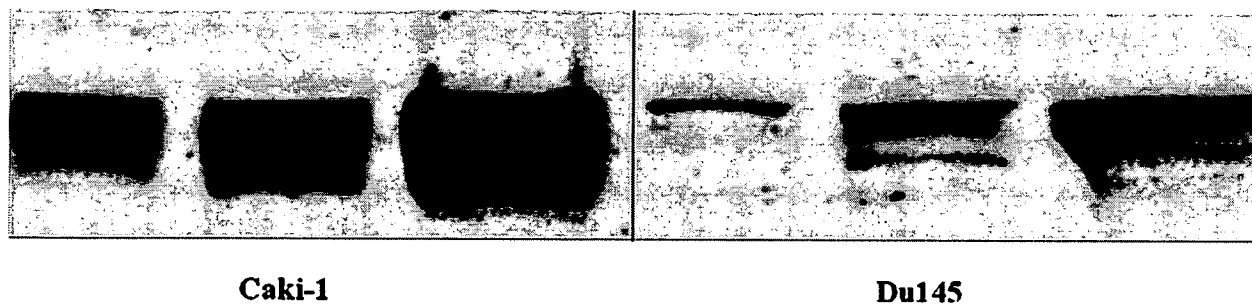
Аминокислотная последовательность ФРФР1 (домены II и IIIc).

```

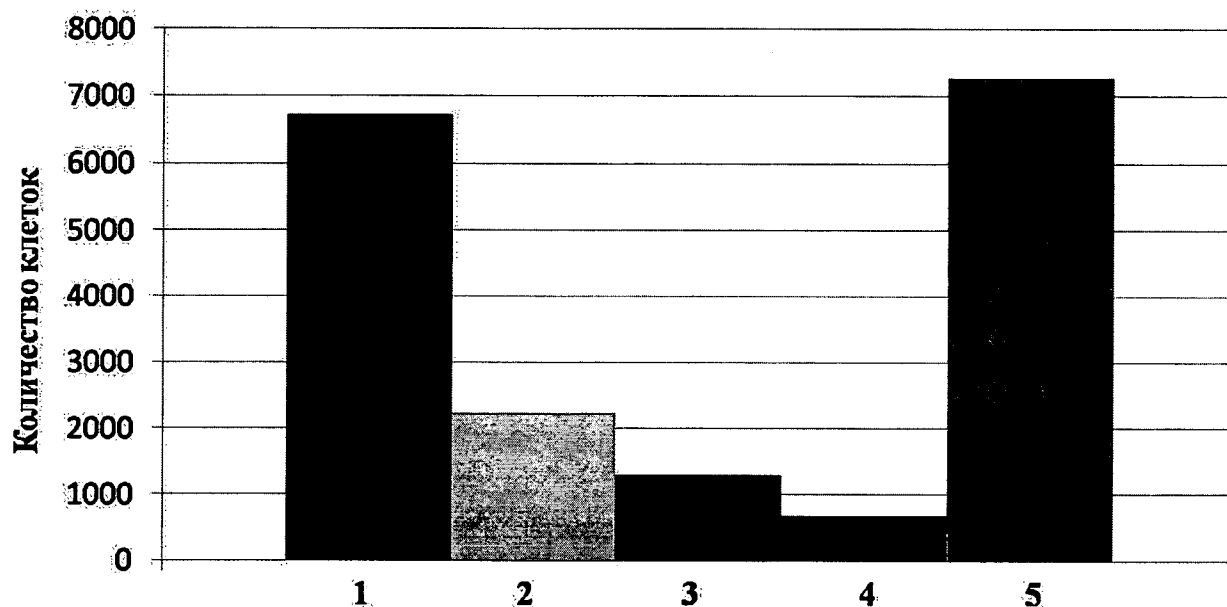
gataacaccaaaccaaacgtagtcccgtagctccatattggacatccccagaaa
agatggaaaagaaattgcatgcagtccggctgccaagacagtgaagtcaaat
gcccttcagtgggacccccaaacccacactgcgctggtgaaaaatggcaaag
aattcaaacctgaccacagaattggaggctacaaggtccgttatgccacctggag
catcataatggactctgtggtgccctctgacaagggcaactacacctgattgtgg
agaatgagtagcggcagcatcaaccacacataccagctggatgctctggagcggg
ccccaccggcccatctgcaagcaggggtgcccgaacaagacagtggccc
tgggtagcaacgtggagt
tcatgtgaagggtacagtgacccgagccgcatatccagtggctaaagcacat
cgaggtgaacgggagcaagattggcccagacaacctgccttatgtccagatcct
gaagactgctggagttaataaccaccgacaaagagatggaggtgcttcaactaaga
aatgtctcctttgaggacgcaggggagtatactgcttggcgggtaactctatcgg
actctccatcactctgcatgggtgaccgttctggaagccctggaagagagg
    
```

Фигура 3

Отличия в экспрессии ФРФР1 между человеческими клеточными линиями почечноклеточного рака (Caki-1) и рака предстательной железы (Du145). Анализ Вестерн-Блоттинг (по 3 уровня для каждой линии).

**Фигура 4**

Ингибирование роста колоний клеток под действием моноклонального антитела против доменов II и III ФРФР1



Обозначения:

1 – клетки без добавления ФРФ и Ю-1;

2 – Ю-1 в концентрации 0,6 нмоль;

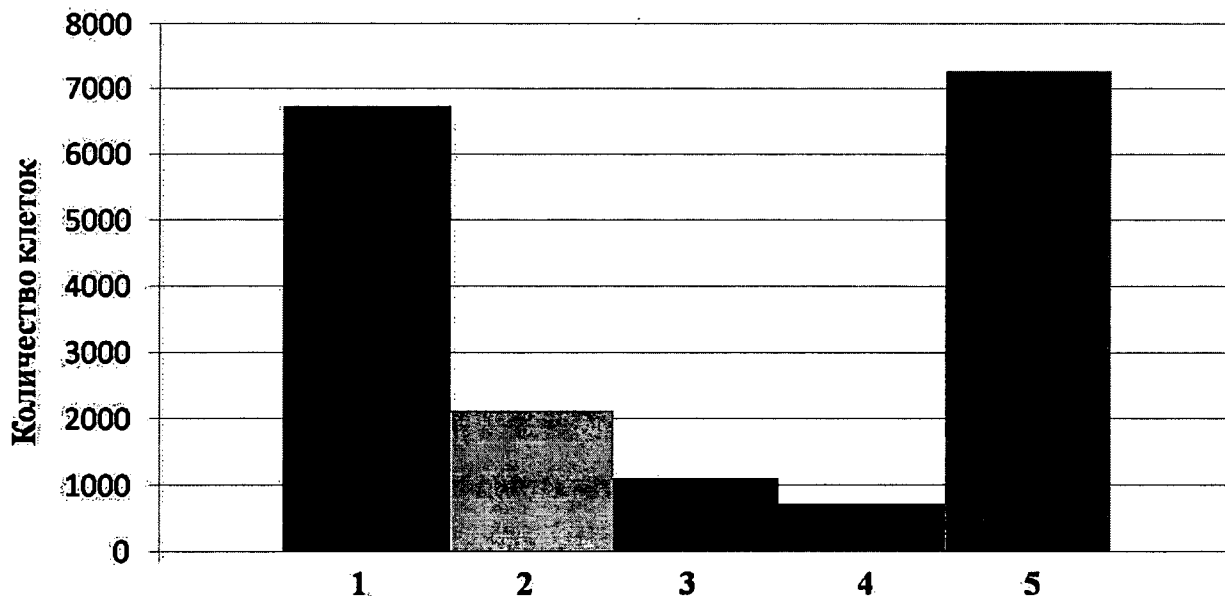
3 – Ю-1 в концентрации 4 нмоль;

4 – Ю-1 в концентрации 50 нмоль;

5 – клетки с добавлением антитела без нейтрализующей активности в концентрации 50 нмоль

Фигура 5

Ингибирование роста колоний клеток под действием моноклонального антитела против комплекса ФРФР1 и гепаран-сульфата

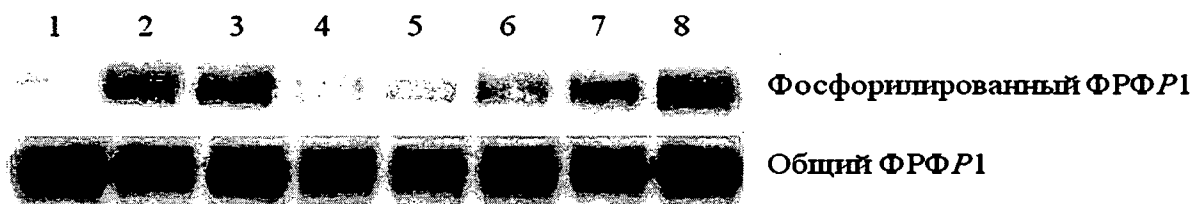


Обозначения:

- 1 – клетки без добавления ФРФ и IO-1;
- 2 – IO-2 в концентрации 0,6 нмоль;
- 3 – IO-2 в концентрации 4 нмоль;
- 4 – IO-2 в концентрации 50 нмоль;
- 5 – клетки с добавлением антитела без нейтрализующей активности в концентрации 50 нмоль

Фигура 6

Блокирование аутофосфорилирования ФРФР1



Обозначения:

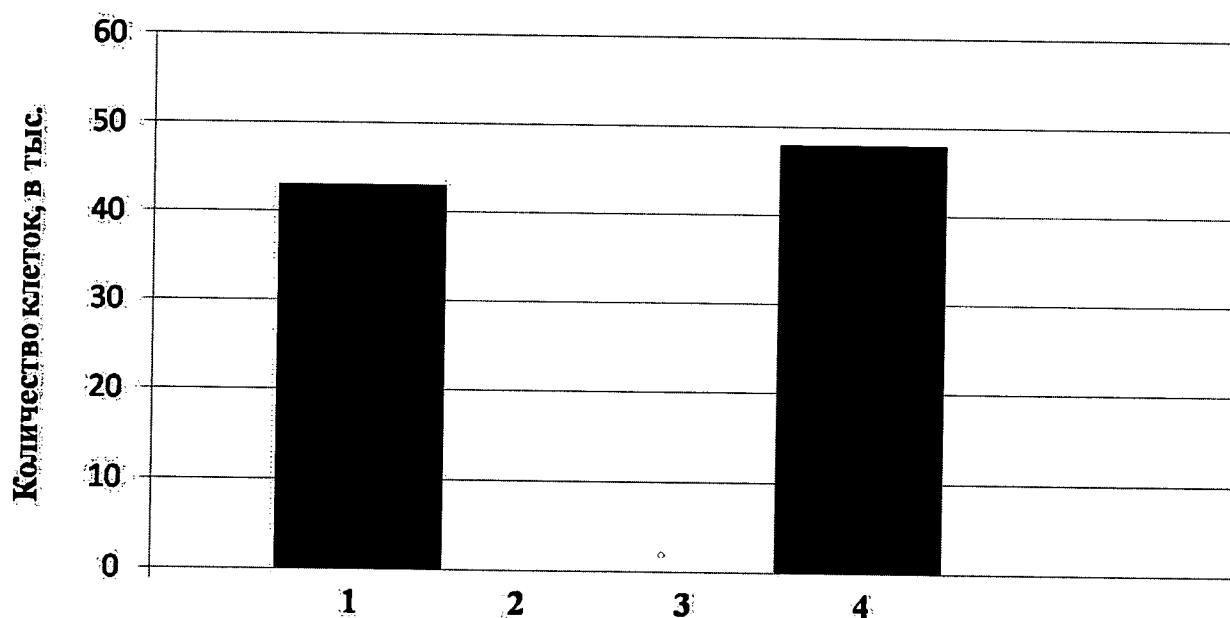
- 1 – клетки без добавления ФРФ и антител;
- 2 – клетки с добавлением ФРФ, без антител;
- 3 – клетки с добавлением ФРФ и контрольного антитела (Santa Cruz Biotechnology);
- 4 – клетки с добавлением ФРФ и IO-1 в концентрации 50 нмоль;
- 5 – клетки с добавлением ФРФ и IO-1 в концентрации 20 нмоль;
- 6 – клетки с добавлением ФРФ и IO-1 в концентрации 4 нмоль;
- 7 – клетки с добавлением ФРФ и IO-1 в концентрации 2 нмоль;
- 8 – клетки с добавлением ФРФ и IO-1 в концентрации 0,6 нмоль.

Фигура 7

Гиперэкспрессия ФРФР1 на бычьих эндотелиальных клетках (метод Вестерн-блоттинга)

**Фигура 8**

Ингибирование роста колоний клеток под действием блокирующих моноклональных антител (Ю-1 и Ю-2).

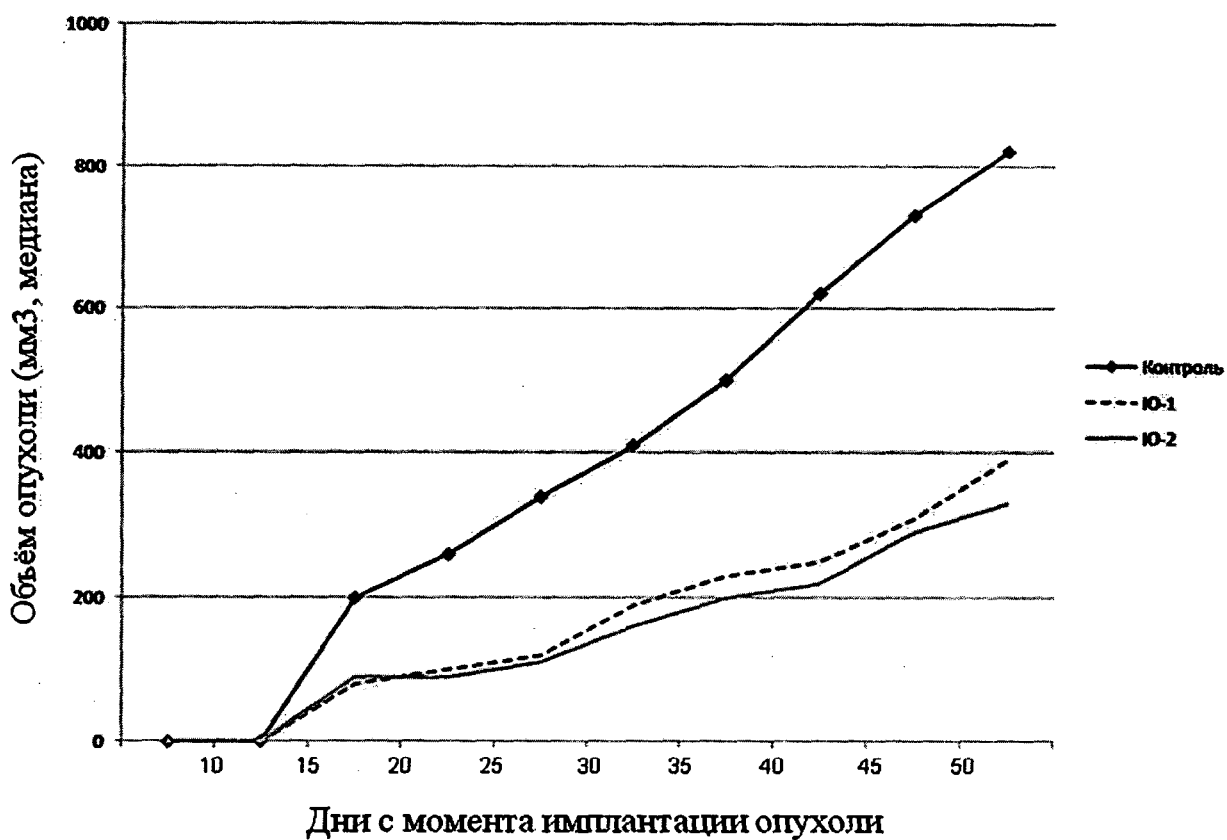


Обозначения:

- 1 – клетки без добавления ФРФ и антител;
- 2 – Ю-2 в концентрации 50 нмоль: снижение митогенной активности на 97,4%
- 3 – Ю-1 в концентрации 50 нмоль: снижение митогенной активности на 95,8%
- 4 – клетки с добавлением антитела без нейтрализующей активности в концентрации 50 нмоль

Фигура 9

Динамика роста опухоли у мышей из лечебных и контрольной групп



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EA 2009/000004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 39/395, A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Esp@cenet, USPTO DB, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/0147612 A (AVNER YAYON et al.) 07.07.2005, paragraphs [0013], [0014], [0032], [0033], [0051], [0076], [0271]	1-16
Y	YIANGOU C et al., "Down-regulation of a novel form of fibroblast growth factor receptor 1 in human breast cancer", British Journal of Cancer, 1997, 76(11), 1419-1427, in particular page 1420, paragraph 3, figure 1A	2-15
Y	SIFFROI-FERNANDEZ S et al, "Acidic fibroblast growth factor (FGF-I) and FGF receptor 1 signaling in human Y79 retinoblastoma", Arch Ophthalmol. 2005 Mar; 123(3): 368-76, the abstract. [Found on 21.12.2009]. Found from PubMed. PMID: 15767480	1, 3-16
Y	WO 1994/010202 A1 (GENENTECH, INC.) 11.05.1994, page 8, lines 13-14, page 17, lines 18-19, claims 5, 6, 11-19, 23, 27, 30	4-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 December 2009		Date of mailing of the international search report 18 March 2010
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EA 2009/000004

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEN Yi W et al, "Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-i in human meningiomas", J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2005;25(1):75-7, the abstract. [Found on 21.12.2009]. Found from PubMed. PMID: 15934314	16

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/EA 2009/000004

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: <i>A61K 39/395 (2006.01)</i> <i>A61P 35/00 (2006.01)</i>		
Согласно Международной патентной классификации МПК		
В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:		
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации): A61K 39/395, A61P 35/00		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины): Esp@cenet, USPTO DB, PubMed		
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 2005/0147612 A1 (AVNER YAYON et al.) 07.07.2005, параграфы [0013], [0014], [0032], [0033], [0051], [0076], [0271]	1-16
Y	YIANGOU C et al., "Down-regulation of a novel form of fibroblast growth factor receptor 1 in human breast cancer", British Journal of Cancer, 1997, 76(11), 1419-1427, особенно стр. 1420, абзац 3, рис. 1A	2-15
Y	SIFFROI-FERNANDEZ S et al., "Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) and FGF receptor 1 signaling in human Y79 retinoblastoma", Arch Ophthalmol. 2005 Mar; 123(3): 368-76, реферат. [найдено 21.12.2009]. Найдено из PubMed. PMID: 15767480	1, 3-16
Y	WO 1994/010202 A1 (GENENTECH, INC.) 11.05.1994, стр. 8, строки 13-14, стр. 17, строки 18-19, п.п. 5, 6, 11-19, 23, 27, 30 формулы	4-15
Y	CHEN Yi W et al., "Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-i in human meningiomas", J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2005;25(1):75-7, реферат. [найдено 21.12.2009]. Найдено из PubMed. PMID: 15934314	16
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С.		<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении
* Особые категории ссылочных документов:		Т более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
А документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	Е более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	О документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	& документ, являющийся патентом-аналогом	
Дата действительного завершения международного поиска: 23 декабря 2009 (23.12.2009)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 18 марта 2010 (18.03.2010)
Наименование и адрес ISA/RU ФГУ ФИПС, РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс:(499) 243-3337		Уполномоченное лицо: Д. Игумнов Телефон № (495) 730-76-75