



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21), (22) Заявка: 2006145905/13, 25.05.2005

(30) Конвенционный приоритет:
25.05.2004 US 60/573,896

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2008 Бюл. № 18

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
25.12.2006(86) Заявка РСТ:
US 2005/018322 (25.05.2005)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/116077 (08.12.2005)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Г.Б. Егоровой, рег.№ 513(71) Заявитель(и):
ЭТТЕНЬЮОН, ЭлЭлСи (US)(72) Автор(ы):
ПЕРРИ Грэхем С. (US),
МЕЗАР Эндрю П. (US)

(54) ЛИГАНДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КОМПЛЕКС АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО
ТИПА (uPA) И ЕГО РЕЦЕПТОРА (uPAR), КОТОРЫЕ ИНГИБИРУЮТ ПОСЛЕДУЮЩИЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ uPAR: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ИЛИ
ТЕРАПИИ

(57) Формула изобретения

1. Лиганд, который связывается с бинарным комплексом uPA-uPAR, но который по существу не связывается с (i) свободным uPA или (ii) участком uPAR, который распознает и связывается с uPA, так что лиганд не ингибирует связывание uPA-uPAR.

2. Лиганд, который связывается с тройным комплексом uPA-uPAR и дополнительной молекулой X, где лиганд

(a) связывается с комплексом uPA-uPAR-X;

(b) по существу не связывается с одним из следующих компонентов:

(i) комплексом uPA-uPAR,

(ii) комплексом uPA-X,

(iii) uPA-распознающим и uPA-связывающим участком uPAR,

(iv) uPA-распознающим и uPA-связывающим участком X,

(v) свободным uPA, или

(vi) свободным X; и

(c) по существу не ингибирует связывание uPA-uPAR или связывание uPA-X.

3. Лиганд по п.2, отличающийся тем, что X представляет собой белок PAI-1.

4. Лиганд по любому из пп.1-3, который по существу не связывается со свободным uPAR.

5. Лиганд по любому из пп.1-3, который представляет собой полипептид.

6. Лиганд по п.4, который представляет собой полипептид.

7. Лиганд по п.5, который представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

8. Лиганд по п.6, который представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

9. Антитело по п.7, которое представляет собой моноклональное антитело (mAb).

10. Антитело по п.8, которое представляет собой моноклональное антитело (mAb).

11. Антитело по п.9, отличающееся тем, что антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает:

(a) V_L цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; и

(b) V_H цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

12. Антитело по п.9, отличающееся тем, что антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает:

(a) V_L цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 1; и

(b) V_H цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

13. Очищенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое/который включает:

(a) V_L цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 1; и

(b) V_H цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

14. Антитело по п.9, отличающееся тем, что антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает:

(a) V_L цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13; и

(b) V_H цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

15. Антитело по п.9, отличающееся тем, что антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает:

(a) V_L цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 9; и

(b) V_H цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 10.

16. Очищенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое/который включает:

(a) V_L цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 9; и

(b) V_H цепь, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 10.

17. моноклональное антитело (mAb) по п.7, которое выбрано из группы, состоящей из

(a) mAb, обозначенного ATN-615, продуцируемого гибридомой с номером доступа в ATCC #_;

(b) mAb, обозначенного ATN-658, продуцируемого гибридомой с номером доступа ATCC #_);

(c) mAb, имеющего по существу такие же антиген-связывающие характеристики, что и ATN-615, и

(d) mAb, имеющего по существу такие же антиген-связывающие характеристики, что и ATN-658.

18. Лиганд по п.1, который ингибирует связывание комплексов uPA-uPAR с другим биологическим лигандом для данных комплексов.

19. Лиганд по п.4, который ингибирует связывание комплексов uPA-uPAR с другим биологическим лигандом для данных комплексов.

20. Лиганд по п.18, который представляет собой полипептид.

21. Лиганд по п.15, который представляет собой полипептид.

22. Лиганд по п.18, отличающийся тем, что другой биологический лиганд представляет собой интегрин.

23. Лиганд по п.22, отличающийся тем, что интегрин выбран из группы, состоящей из $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 2$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 3 \beta 1$ и $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$.

24. Лиганд по любому из пп.2, 18, 20 или 23, где указанный лиганд затрудняет и ингибирует (a) uPAR-опосредованную сборку фибронектина, (b) связывание фибронектина

или его фрагмента с интегрином $\alpha 5\beta_1$ или (с) сборку компонентов витронектина.

25. Лиганд по любому из пп.1-3, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

26. Лиганд по п.4, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

27. Лиганд по п.5, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

28. Лиганд по п.7, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

29. Лиганд по п.9, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

30. Лиганд по п.11, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

31. Лиганд по п.12, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

32. Лиганд по п.13, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

33. Лиганд по п.14, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

34. Лиганд по п.15, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

35. Лиганд по п.16, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

36. Лиганд по п.17, который представляет собой

(а) диагностически выявляемый меченый лиганд или

(b) меченый, конъюгированный или слитый с терапевтически активным фрагментом, придающим указанному лиганду терапевтическую активность.

37. Диагностическая композиция, включающая

(а) меченый лиганд по п.25 и

(b) диагностически приемлемый носитель.

38. Композиция по п.37, отличающаяся тем, что лиганд помечен радионуклидом, визуализирующим агентом для метода эмиссионной позитронной томографии, визуализирующим агентом для ЯМР-томографии, флуоресцентной меткой, флуорогеном,

хромофором, хромогеном, фосфоресцирующей меткой, хемилюминесцентной меткой или биолюминесцентной меткой.

39. Композиция по п.38, отличающаяся тем, что метка представляет собой радионуклид, выбранный из группы, состоящей

из ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{169}Yb и ^{201}Tl .

40. Композиция по п.38, отличающаяся тем, что метка представляет собой флуоресцентную метку или флуороген, выбранные из группы, состоящей из флуоресцеина, родамина, дансила, фикоэритрина, фикоцианина, аллофикоцианина, о-фталдегида, флуорескамина, флуоресцеинового производного, орегона зеленого, родамина зеленого, родола зеленого и тexasского красного.

41. Терапевтическая антиангиогенная или противоопухолевая фармацевтическая композиция, которая ингибирует нежелательный ангиогенез, опухолевый рост и/или метастазирование опухоли, включающая

(а) эффективное количество терапевтически активного лиганда по п.25; и

(b) фармацевтически приемлемый носитель.

42. Терапевтическая фармацевтическая композиция по п.41, имеющая форму, пригодную для инъекции.

43. Терапевтическая фармацевтическая композиция по п.41, отличающаяся тем, что терапевтически активный фрагмент конъюгирован непосредственно или связан опосредованно с лигандом.

44. Терапевтическая фармацевтическая композиция по п.41, отличающаяся тем, что терапевтически активный фрагмент представляет собой химиотерапевтическое средство, токсин или терапевтический радионуклид.

45. Терапевтическая фармацевтическая композиция по п.44, отличающаяся тем, что радионуклид выбран из группы, состоящей

из ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb и ^{217}Bi .

46. Терапевтическая фармацевтическая композиция по п.41, отличающаяся тем, что терапевтически активный фрагмент представляет собой пептид или полипептид, слитый с указанным лигандом.

47. Терапевтическая фармацевтическая композиция по п.46, отличающаяся тем, что слитый пептид или полипептид представляет собой токсин.

48. Способ ингибирования клеточной миграции, клеточной инвазии, клеточной пролиферации или ангиогенеза, или индукции апоптоза, включающий контактирование клеток, ассоциированных с нежелательными миграцией, инвазией, пролиферацией клеток или ангиогенезом, с эффективным количеством терапевтически активного лиганда по п.25.

49. Способ лечения субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, которое характеризуется нежелательным ангиогенезом, опухолевым ростом и/или метастазированием опухоли, включающий введение указанному субъекту эффективного количества терапевтической фармацевтической композиции по п.41.

50. Способ тестирования для выявления в образце вещества, в отношении которого предполагается наличие связывающих свойств лиганда по п.1, который включает

(а) контактирование образца с комплексами uPA-uPAR и выявление связывания компонента указанного образца с комплексами;

(b) контактирование образца со свободным uPAR и выявление связывания компонента указанного образца с uPAR;

(с) сравнение уровня связывания по пункту (а) и (b),

где наличие связывания в (а) и по существу отсутствие или значительно сниженное связывание в (b) указывает на присутствие указанного вещества в образце.

51. Способ по п.50, отличающийся тем, что в отношении лиганда предполагается, что он по существу не связывается со свободным uPAR.

52. Способ по п.50, отличающийся тем, что в отношении лиганда предполагается, что он представляет собой полипептид.

53. Способ по п.50, отличающийся тем, что в отношении лиганда предполагается, что он представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

54. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанный тест представляет собой прямой

тест на связывание.

55. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанный тест представляет собой конкурентный тест на связывание с использованием меченого связывающего партнера, который связывается с комплексами uPA-uPAR, где вещество в образце конкурирует за связывание со связывающим партнером.

56. Способ тестирования для выявления в образце вещества, в отношении которого предполагается наличие связывающих свойств лиганда по любому из пп.2-3, включающий

(а) контактирование образца с комплексами uPA-uPAR-X и выявление связывания компонента указанного образца с комплексами;

(b) контактирование образца с одним или несколькими из следующих компонентов:

(i) uPA-X комплексами

(ii) uPA-uPAR комплексами или

(iii) некомплексированным X

и определение связывания компонента указанного комплекса с uPA-X, uPA-uPAR или X;

(с) сравнение уровней связывания по (а) и (b),

где наличие связывания в (а) или по существу отсутствие или существенно сниженное связывание в (b) указывает на присутствие указанного вещества в образце.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что указанные комплексы находятся на клеточной поверхности.

58. Способ тестирования с целью идентификации антитела или другого лиганда, который связывается с тем же эпитопом, что и mAb ATN-615 или mAb ATN-658, включающий определение способности исследуемого образца, в отношении которого предполагается наличие указанного антитела или другого лиганда, конкурентно ингибировать связывание ATN-615 или ATN-658, несущего выявляемую метку, с

(i) иммобилизованным suPAR,

(ii) иммобилизованным D2D3 доменом suPAR, или

(iii) иммобилизованным фрагментом suPAR или D2D3 доменом suPAR,

где по меньшей мере наличие примерно 20% конкурентного ингибирования указывает на то, что антитело или лиганд связывается с тем же указанным эпитопом.

59. Способ идентификации пептида, который распознается (а) mAb ATN-615, (b) mAb ATN-658 или (с) антителом или другим лигандом, который имеет связывающую специфичность mAb ATN-615 или mAb ATN-658, отличающийся тем, что указанный способ включает определение способности образца, в отношении которого предполагается наличие указанного пептида или предполагаемого пептида, конкурентно ингибировать связывание mAb ATN-615 или mAb ATN-658 или указанного антитела или другого лиганда с выявляемой меткой с такой же связывающей специфичностью с

(i) иммобилизованным suPAR,

(ii) иммобилизованным D2D3 доменом suPAR, или

(iii) иммобилизованным фрагментом suPAR или D2D3,

где наличие по меньшей мере примерно 20% конкурентного ингибирования указывает на то, что данный пептид обладает указанной связывающей специфичностью.

60. Тест для скрининга соединения, которое имеет, или для определения, имеет ли рассматриваемое соединение по существу такие же связывающие характеристики при связывании со структурой uPAR, что и ATN-615 или ATN-658, включающий определение способности образца, подвергаемого скринингу, или предполагаемого соединения конкурентно ингибировать связывание ATN-615 или ATN-658 с выявляемой меткой с

(i) иммобилизованным suPAR,

(ii) иммобилизованным D2D3 доменом suPAR, или

(iii) иммобилизованным фрагментом suPAR или D2D3,

где наличие по меньшей мере примерно 20% конкурентного ингибирования указывает на то, что соединение обладает указанными связывающими характеристиками.

61. Тест по п.60, отличающийся тем, что соединение, подвергаемое скринингу, или предполагаемое соединение представляет собой малую органическую молекулу с молекулярной массой от примерно 50 Да до примерно 2500 Да.

62. Способ по п.60, отличающийся тем, что подвергаемое скринингу соединение или

предполагаемое соединение представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты.

63. Способ по п.62, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой олигонуклеотид.

64. Способ по п.63, отличающийся тем, что олигонуклеотид представляет собой молекулу РНК или аптамер.

65. Выделенный пептид, содержащий по меньшей мере 3 аминокислоты, где пептид, будучи частью более длинной аминокислотной последовательности, присутствует в линейном эпитопе, связываемом mAb, имеющим следующие характеристики:

(a) V_L цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; и

(b) V_H цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

66. Выделенный пептид, содержащий по меньшей мере 3 аминокислоты, где пептид, будучи частью более длинной аминокислотной последовательности, присутствует в линейном эпитопе, связываемом mAb, имеющим следующие характеристики:

(a) V_L цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 1; и

(b) V_H цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

67. Выделенный пептид, содержащий по меньшей мере 3 аминокислоты, где пептид, будучи частью более длинной аминокислотной последовательности, присутствует в линейном эпитопе, связываемом mAb, имеющим следующие характеристики:

(a) V_L цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13; и

(b) V_H цепь, содержащую три CDR, которые имеют соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

68. Выделенный пептид, содержащий по меньшей мере 3 аминокислоты, где пептид, будучи частью более длинной аминокислотной последовательности, присутствует в линейном эпитопе, связываемом mAb, имеющим следующие характеристики:

(a) V_L цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 9; и

(b) V_H цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 10.

69. Выделенный пептид, содержащий по меньшей мере 3 аминокислоты, где указанный пептид, будучи частью более длинной аминокислотной последовательности, присутствует в линейном эпитопе, распознаваемом

(a) mAb, обозначенным ATN-658, которое продуцируется гибридомой с номером доступа ATCC #_, или

(b) mAb, имеющим по существу такие же антиген-связывающие характеристики, что и ATN-658.

70. Выделенный пептид, содержащий по меньшей мере 3 аминокислоты, где пептид, будучи частью более длинной аминокислотной последовательности, присутствует в линейном эпитопе, распознаваемом mAb ATN-615,

(a) mAb, обозначенным ATN-615, которое продуцируется гибридомой с номером доступа ATCC #_, или

(b) mAb, имеющим по существу такие же антиген-связывающие характеристики, что и ATN-615.