



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94922 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
C12P 21/08 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) СПОСІБ РЕГУЛЮВАННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ СИГНАЛІЗАЦІЇ ТКАНИННОГО ФАКТОРА У ССАВЦЯ, ЯКИЙ ЦЬОГО ПОТРЕБУЄ, СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АГЕНТА, ЩО СПЕЦИФІЧНО ІНГІБУЄ СИГНАЛІЗАЦІЮ ТКАНИННОГО ФАКТОРА**

1

2

(21) а200807780

(22) 06.11.2006

(24) 25.06.2011

(86) PCT/US2006/043313, 06.11.2006

(31) 60/734,149

(32) 07.11.2005

(33) US

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) РАФ ВУЛФРЕМ, US, АХАМЕД ДЖАССІМУД-ДІН, US, ФЕРШТІГ ХЕНРІК, US, МЮЛЛЕР БАРБАРА М., DE

(73) ЗЕ СКРІПС РІСЬОРЧ ІНСТІТЮТ, US

(56) US 5 223 427 A, 29.03.1997

US 2002/0193302 A1, 19.12.2002

WO 94/05328 A1, 17.04.1994

WO 99/03498 A1, 28.01.1999

BELTING MATTIAS ET AL: "Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 5, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 502-509  
KIRCHHOFFER D ET AL: "EPITOPE LOCATION ON TISSUE FACTOR DETERMINES THE ANTICOAGULANT POTENCY OF MONOCLONAL ANTI-TISSUE FACTOR ANTIBODIES" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, SCHATTAUER GMBH, DE; US, vol. 84, no. 6, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 1072-1081

(57) 1. Спосіб інгібування або пригнічення сигналізації тканинного фактора/фактора VIIa (TF/VIIa) через протеазоактивований рецептор 2 (PAR2) у ссавця, який цього потребує, згідно з яким ссавцеві вводять інгібітор сигналізації тканинного фактора, що не впливає на гемостаз ссавця.

2. Спосіб за п. 1, у якому ссавець хворіє на пов'язане з ангіогенезом захворювання, новоутворення або запалення.

3. Спосіб за п. 1, у якому інгібітор не заважає активуванню коагуляції.

4. Спосіб за п. 1, у якому сигналізація TF/VIIa залежить від протеїндисульфідізомерази (PDI).

5. Спосіб за п. 1, у якому інгібітор являє собою антитіло або мале хімічне утворення.

6. Спосіб за п. 5, у якому інгібітор являє собою антитіло або молекулу, що зв'язує антиген, і має специфічність зв'язування моноклонального антитіла 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9383.

7. Спосіб за п. 5, у якому інгібітор являє собою моноклональне антитіло 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9383.

8. Спосіб за п. 1, у якому інгібітор пригнічує зв'язування з тканинним фактором моноклонального антитіла 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9383.

9. Спосіб за п. 1, у якому інгібітор не інгібує зв'язування з тканинним фактором моноклонального антитіла 5G9, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9382.

10. Спосіб лікування або полегшення симптомів захворювання, пов'язаного із сигналізацією тканинного фактора/фактора VIIa (TF/VIIa) через протеазоактивований рецептор 2 (PAR2) у ссавця, який цього потребує, шляхом введення ссавцеві терапевтично ефективної кількості сполуки, яка інгібує сигналізацію TF/VIIa, але не заважає активуванню тканинним фактором гемостазу.

11. Спосіб за п. 10, у якому захворюванням є новоутворення, пов'язана з ангіогенезом хвороба або запалення.

12. Спосіб за п. 10, у якому захворюванням є рак грудей або меланома.

13. Спосіб за п. 10, у якому гемостазом є медіювана TF коагуляція.

14. Спосіб за п. 10, у якому сигналізація TF/VIIa залежить від протеїндисульфідізомерази.

15. Спосіб за п. 10, у якому сполука являє собою антитіло або мале хімічне утворення.

16. Спосіб за п. 15, у якому сполука-інгібітор являє собою антитіло або молекулу, що зв'язує антиген, і володіє специфічністю зв'язування моноклонального антитіла 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9383.

(13) C2

(11) 94922

(19) UA

17. Спосіб за п. 15, у якому сполука являє собою моноклональне антитіло 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9383.

18. Спосіб ідентифікації агента, який інгібує сигналізацію TF/VIIa через протеазоактивований рецептор 2 (PAR2), але не впливає на коагуляцію, згідно з яким вимірюють у присутності або відсутності дослідної сполуки зв'язування між (i) антитілом або молекулою, що зв'язує антиген, і має специфічність зв'язування моноклонального антитіла 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9383, та (ii) поліпептидом тканинного фактора, й визначають інгібування такого зв'язування у присутності дослідної сполуки у порівнянні із зв'язуванням у відсутності дослідної сполуки, ідентифікуючи таким чином агент, який інгібує сигналізацію TF/VIIa, але не впливає на коагуляцію.

19. Спосіб за п. 18, у якому антитіло або молекула, що зв'язує антиген, являє собою моноклональне

антитіло 10H10, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB93 83.

20. Спосіб за п. 18, у якому дослідною сполукою є мала молекула органічної сполуки.

21. Спосіб за п. 18, у якому виявляють інгібувальну дію виявленого агента

на сигналізацію тканинного фактора.

22. Спосіб за п. 18, у якому виявляють відсутність інгібувальної дії виявленого агента на медіовану тканинним фактором коагуляцію.

23. Спосіб за п. 18, у якому (i) контактують у присутності або відсутності виявленого агента поліпептид тканинного фактора з моноклональним антитілом 5G9, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9382, та (ii) виявляють відсутність інгібувальної дії виявленого агента на зав'язування тканинного фактора моноклональним антитілом 5G9, що його виробляє гібридома з номером доступу ATCC HB9382.

Предмет цього винаходу користується пріоритетом тимчасової заявки США № 60/734,149 від 2005. Опис пріоритетної заявки повністю включений сюди шляхом посилання для будь-яких цілей.

Цей винахід створений завдяки урядовій підтримці за грантами №№ HL60472, HL31950 та HL16411 Національного інституту захворювань серця, легенів та крові. Уряд має певні права на цей винахід.

Винахід стосується сполук та способів лікування хвороб, залежних від сигналіну тканинного фактору/фактору VIIa (TF/VIIa) у ссавців. Спосіб полягає у введенні до організму ссавця інгібітору сигналіну тканинного фактору. Інгібітор ефективно послаблює або виключає прояви хвороби або запобігає її появі чи рецидиву, не порушуючи систему гемостазу ссавця.

Комплекс ферментів поверхневого рецептора клітини тканинного фактору (TF) разом з фактором VIIa серинової протеїнази активує фізіологічний гемостаз та коагуляцію й водночас переключає активований протеазо рецепторний сигналінг в стані запалення, поширення пухлини та ангіогенезу (Mackman, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 24: 1015-1022, 2004; Riewald and Ruf, *CHt. Care* 7:123-129, 2003; Belting et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 25: 1545-1550, 2005). Те, яким чином вищезгаданий сигналінг скерований TF-VIIa, визначає патологію, не будучи перекритим нижчими згенерованими багатомісними коагуляційними протеазами, залишається фундаментальною невирішеною проблемою судинної біології (Kawabata et al., *Br J Pharmacol*, 144: 212-219, 2005; Namkung, et al., *Gastroenterology*, 126: 1844-1859, 2004; Fiorucci, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13936-13941, 2001; Cocks et al., *Nature*, 398: 156-160, 1999).

TF зв'язує та алостерично активує фактор VIIa та бере участь у складанні третинного комплексу запуску коагуляції TF-VIIa-X, який вивільняє продукт Задля продукування тромбіну. (Norledge et al.,

*Proteins* 53: 640-648, 2003). Комплекс TF-VIIa-X також прямо розщеплює протеазоактивований рецептор (PAR)2 (Camerer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5255-5260, 2000; Riewald and Ruf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7742-7747, 2001). Незважаючи на те, що роль тромбіну, сигналізуючого через PAR2 при гемостазі та запаленні, добре відома, активація PAR альтернативними протеазами *in vivo* майже не вивчена (Coughlin, J. *Thromb. Haemost.* 3: 1800-1814, 2005). TF та PAR2 тісно пов'язані, бо фосфорилування цитоплазматичного домену TF є наслідком сигналізації PAR2, а в мишей з видаленням цитоплазматичним доменом в TF посилюється залежний від PAR2 ангіогенез (Ahamed and Ruf, *J. Biol. Chem.* 279: 23038-23044, 2004; Belting et al., *Nature Med.* 10: 502-509, 2004). Втім, ще не до кінця зрозуміло, як регулюється сигналізація TF-VIIa і відіграє фізіологічну роль незалежно від сигналів інших нижчерозташованих протеаз. Зараз не існує інгібіторів ангіогенезу, офіційно затверджених для лікування пов'язаних з ангіогенезом хвороб. Існує потреба в умінні регулювання або інгібування сигналіну TF, пов'язаного з ангіогенезом, зростанням пухлинних клітин, метастазами пухлин або запаленнями, яка не заважала б нормальному функціонуванню шляхів гемостазу.

Цей винахід стосується сполук та способів лікування хвороб ссавців, зокрема, пов'язаних з ангіогенезом хвороб, запалень або новоутворень. Сполука є інгібітором сигналіну тканинного фактору, який не зачіпає гемостазу в організмі ссавця. Спосіб полягає у введенні до організму ссавця інгібітору сигналіну тканинного фактору. Інгібітор ефективно зменшує прояви пов'язаних з ангіогенезом хвороб, запалень або новоутворень, не підвищуючи ризику послаблення коагуляції або посилення кровотечі в організмі ссавця.

Спосіб лікування хвороб, залежних від сигналізації тканинного фактору/фактору VIIa в організмі ссавця, полягає у введенні інгібітору сигналізації

тканинного фактору в кількості, достатній щоб послабити або усунути прояви хвороби чи запобігти її появі або рецидиву, причому інгібітор не порушує гемостаз в організмі хворого. Такими хворобами є, але ними не вичерпуються, пов'язані з ангіогенезом хвороби, запалення або новоутворення. Новоутворення та запалення відносяться до, хвороб, пов'язаних з ангіогенезом. В одному сенсі інгібітор являє собою антитіло або невелике хімічне утворення. Точніше, інгібітором є моноклональне антитіло 10H10 (MAb 10H 1.0), що його виробляє гібридома за номером Американської колекції типових культур (ATCC) HB93 83.

Згідно із способом розпізнання сполуки, яка регулює сигналізацію тканинного фактору в клітинах, дослідну сполуку вводять у контакт з аналітичною системою на клітинній основі, яка містить експресований клітинами тканинний фактор, здатний до сигналізації, а залежна від тканинного фактору сигналізація регулюється протеїндисульфідізомеразою, яка надає фактор VIIa до аналітичної системи у достатній кількості, щоб активувати залежну від тканинного фактору сигналізацію, потім визначають вплив зазначеної дослідної сполуки на залежну від тканинного фактору сигналізацію у зазначеній аналітичній системі, причому ефективність зазначеної дослідної сполуки у зазначеній аналітичній системі є показником такого регулювання. З одного боку, спосіб включає визначення інгібуючої дії дослідної сполуки на сигналізацію тканинного фактору у зазначеній аналітичній системі. З другого - пересвідчуються, що дослідна речовина не впливає на опосередкований тканинним фактором гемостаз. Клітинами є, серед інших, кератиноцити, меланоми або епітеліальні клітини. Надалі клітинна аналітична система сигналізує свою здатність до відповіді через протеазо-активований рецептор 2. При цьому дослідна речовина являє собою антитіло або невелике хімічне утворення. Зокрема, ця сполука інгібує зв'язування MAb 10H10 з тканинним фактором. Вона не інгібує зв'язування моноклонального антитіла 5G9 (MAb 5G9), що його виробляє гібридома під номером HB9382, з тканинним фактором.

Згідно із способом лікування ангіогенезу у ссавців піддослідному вводять терапевтично ефективну кількість сполуки, яка регулює сигналізацію у клітинах через шлях тканинного фактору/фактору VIIa, де зазначена сполука є антагоністом сигналізації тканинного фактору/фактору VIIa у клітинній аналітичній системі, та зазначена сполука послаблює або усуває ангіогенез або попереджає його появу або рецидив у ссавця. При цьому сполука не впливає на гемостаз ссавця. З одного боку сигналізація тканинного фактору/фактору VIIa залежить від протеїндисульфідізомерази. З другого, - відбувається через протеазо-активований рецептор 2. При цьому дослідна речовина являє собою антитіло або невелике хімічне утворення. Зокрема, ця сполука інгібує зв'язування MAb 10H10 з тканинним фактором. Вона не інгібує зв'язування MAb 5G9 з тканинним фактором.

Згідно із способом лікування новоутворень у ссавців хворому вводять терапевтично ефективну кількість сполуки, яка регулює сигналізацію у клі-

тинах через шлях тканинного фактору-фактору VIIa, де зазначена сполука є антагоністом сигналізації тканинного фактору-фактору VIIa у клітинній аналітичній системі й послаблює або усуває новоутворення або попереджає його появу або рецидив у ссавця. При цьому сполука не впливає на гемостаз ссавця. Сигналізація тканинного фактору-фактору VIIa залежить від протеїндисульфідізомерази, а відбувається через протеазо-активований рецептор 2. При цьому дослідна речовина являє собою антитіло або невелике хімічне утворення. Зокрема, ця сполука інгібує зв'язування MAb 10H10 з тканинним фактором. Вона не інгібує зв'язування MAb 5G9 з тканинним фактором.

Згідно із способом лікування запалень у ссавців хворому вводять терапевтично ефективну кількість сполуки, яка регулює сигналізацію у клітинах через шлях тканинного фактору-фактору VIIa, де зазначена сполука є антагоністом сигналізації тканинного фактору-фактору VIIa у клітинній аналітичній системі й послаблює або усуває захворювання або попереджає його появу або рецидив у ссавця. При цьому сполука не впливає на гемостаз ссавця. Сигналізація тканинного фактору-фактору VIIa у цьому способі залежить від протеїндисульфідізомерази, а відбувається через активований протеазо-активований 2. При цьому дослідна речовина являє собою антитіло або невелике хімічне утворення. Зокрема, ця сполука інгібує зв'язування MAb 10H10 з тканинним фактором. Вона не інгібує зв'язування MAb 5G9 з тканинним фактором.

Згідно із способом визначення наявності або схильності до пов'язаного з ангіогенезом хворобливого стану у ссавців беруть пробу; вводять до проби антитіло, яке специфічно зв'язується із тканинним фактором, й визначають наявність або кількість антитіла, зв'язаного з тканинним фактором у пробі, причому наявність антитіла, зв'язаного з тканинним фактором, свідчить про наявність або схильність до пов'язаного з ангіогенезом хворобливого стану у ссавця, при цьому антитіло інгібує сигналізацію тканинного фактора й не впливає на гемостаз ссавця. У цьому методі підвищений рівень антитіла, зв'язаного з тканинним фактором, свідчить про наявність або схильність до пов'язаного з ангіогенезом хворобливого стану. В даному випадку антитілом є MAb 10H10. Пов'язаним з ангіогенезом захворювання може бути викликаним новоутворенням або запаленням.

Згідно із способом визначення наявності або схильності до пов'язаного з новоутворенням хворобливого стану у ссавців беруть пробу у ссавця; вводять до проби антитіло, яке специфічно зв'язується із тканинним фактором у пробі, й визначають наявність або кількість антитіла, зв'язаного з тканинним фактором у пробі, причому наявність антитіла, зв'язаного з тканинним фактором, свідчить про наявність або схильність до пов'язаного з новоутворенням хворобливого стану у ссавця, при цьому антитіло інгібує сигналізацію тканинного фактора й не впливає на гемостаз ссавця. У цьому способі підвищений рівень антитіла, зв'язаного з тканинним фактором, свідчить про наявність або схильність до пов'язаного з новоутворенням хво-

робливого стану. Антитілом є МАb 10H10. Пов'язаним з новоутворенням станом може бути солідна пухлина, доброякісний або злоякісний рак грудей, меланома, гліома, астроцитиома, гематологічне злоякісне утворення, лейкемія, рак легенів, рак прямої кишки, рак матки, лейоміома матки, рак яєчників, рак ендометрія, синдром полікістозу яєчників, внутрішньоматкові поліпи, рак простати, гіпертрофія простати, рак жовчного міхура, аденоміоз, залозистий рак, менінгіома, рак кісток, множинна міелома або рак ЦНС.

Згідно зі способом визначення наявності або схильності до пов'язаного з запаленням хворобливого стану у ссавців беруть пробу у ссавця; вводять до проби антитіло, яке специфічно зв'язується із тканинним фактором, й визначають наявність або кількість антитіла, зв'язаного з тканинним фактором у пробі, причому наявність антитіла, зв'язаного з тканинним фактором, свідчить про наявність або схильність до пов'язаного з запаленням хворобливого стану у ссавця, при цьому антитіло інгібує сигналізацію тканинного фактора й не впливає на гемостаз ссавця.

У цьому способі підвищений рівень антитіла, зв'язаного з тканинним фактором, свідчить про наявність або схильність до пов'язаного з запаленням хворобливого стану. Антитілом є МАb 10H10.

Фіг.1 показує специфічне інгібування сигналінового тканинного фактору.

Фіг.2 показує регулювання сигнального тканинного фактору протеїн-дисульфідомеразою.

Фіг.3 показує сигналізацію відновленого тканинного фактору.

Фіг.4 показує, як сигналізація TF-VIIa сприяє зростанню пухлини.

Фіг.5 показує призначення епітопу для МАb-10H10.

Фіг.6 показує, що інактивація коагуляційної активності TF залежить від оксиду азоту.

Фіг.7 показує, що утворення комплексу TF-PAR2 є необхідне для сигналіну TF-VIIa.

Цей винахід пропонує сполуки та способи лікування аномального сигналіну тканинного фактору/фактору VIIa (TF/VIIa) (наприклад, у осіб з надлишковим TF/VIIa сигналіном) та лікування осіб, які потерпають від захворювань або станів, що залежать, медіюються або пов'язані з TF/VIIa сигналіном. Аномальною сигналізацією TF/VIIa вважається надлишкова або недостатня активність шляху сигналізації тканинного фактору/фактору VIIa (TF/VIIa) у порівнянні із здоровими особами. До хвороб, які залежать від сигналізації TF/VIIa, належать усі розлади або стани, поява або розвиток яких медіюються або пов'язані з аномальною сигналізацією TF/VIIa шляху. Це, наприклад, запалення, новоутворення та ангіогенезо-залежні хвороби. До останніх відносяться хвороби з надлишковим ангіогенезом (серед них рак, діабетична сліпота, вікова дегенерація жовтої плями, ревматоїдний артрит та псоріаз) або недостатнім ангіогенезом (коронарна хвороба, інсульт, повільне загоєння ран). Як правило, сполуки у винаході містять інгібітор сигналізації на шляху TF/VIIa, який не впливає на медіований TF гемос-

таз (наприклад, коагуляцію). Згідно із способом за винаходом ссавцям для лікування вводять ефективну кількість такого інгібітору. Інгібітор ефективний у зменшенні появ або проявів запалення або новоутворення, не збільшуючи ризик кровотечі у піддослідної особи.

Комплекс ферментів поверхневого рецептора клітини тканинного фактору (TF) разом з сериновою протеїназою фактором VIIa активує фізіологічний гемостаз та коагуляцію й водночас переключає активований протеазою рецепторний сигналінг, в стані запалення, поширення пухлини та ангіогенезу (Mackman, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 24: 1015-1022, 2004; Riewald and Ruf, *Crit. Care* 7: 123-129, 2003; Belting et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 25: 1545-1550, 2005). Яким чином вищерозташований сигналінг скерований TF-VIIa визначає патологію, не будучи перекритим нижчими згенерованими набагато міцнішими коагуляційними протеазами, залишається фундаментальною невирішеною проблемою судинної біології. Як пояснюється далі у прикладах, цей винахід демонструє, що позаклітинна протеїндисульфідізомераза (PDI) зв'язується з TF, регулюючи коагуляцію при збереженні клітинної сигналізації. Розщеплюючи зовнішньоклітинний TF по дисульфідному зв'язку Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup>, імітує функціональні властивості регульованого PDI сигналіну TF. Отже, шляхи обміну дисульфідних станів діють як позаклітинні перемикачі специфічності функції рецептора. Вплив моноклональними антитілами, націленими на природну конформацію сигнального TF, інгібує клітину відповідь та зростання пухлини *in vivo* (наприклад, раку грудей або меланоми). Втручання в патофізіологічний індукований TF сигналінг без погіршення нормального індукованого TF гемостазу є прикладом того, що функціональні властивості дисульфідних перемикачів можуть бути використані в лікувальних цілях.

Звичайно, цей винахід не обмежується окремими методиками, реагентами, сполуками, композиціями або біологічними системами, які можуть бути найрізноманітніші. Так само і термінологію вжито тут суто для потреб опису конкретних варіантів здійснення, й вона не є обмежувальною. Вжиті у цьому описі винаходу форми однини мають на увазі також і множину, якщо з контексту не витікає протилежне. Наприклад, "клітина" означає також сполучення двох або більше клітин, і т.ін.

Термін "біля", якщо вживається з числовою величиною, як от кількість, тривалість тощо, має на увазі, що відхилення не перевищують  $\pm 20\%$  або  $\pm 10\%$ , зокрема,  $\pm 5\%$ , переважно  $\pm 1\%$ , найкраще  $\pm 0.1\%$  від наведеного значення, оскільки такі відхилення впливають на здійснення наведених способів.

Якщо не зазначено інше, усі науково-технічні терміни тут мають значення, звичайно вживані фахівцями галузі. Хоча при практичних випробуваннях винаходу можуть вживатися будь-які прийоми та матеріали, подібні або еквівалентні до описаних тут, ми наводимо переважні матеріали та прийоми. В описі та формулі винаходу вживається наступна термінологія.

"Гемостаз" - припинення кровотечі з пораненої судини, вимагає спільної дії судинних, тромбоцитарних та плазматичних факторів, врівноважених регуляторними механізмами, що попереджають накопичення тромбоцитів та фібрину у зоні поранення. Аномалії гемостазу призводять до тромбозу або надлишкової кровотечі.

"Ангіогенез" - утворення нових кровоносних судин у ссавця у здоровому або хворобливому стані. Ангіогенез має місце при загоєнні ран та для поновлення притоку крові до тканин після поранення або враження. У жінок ангіогенез відбувається також під час місячного репродуктивного циклу (для поновлення стінок матки, для визрівання яйця при овуляції) та під час вагітності (для утворення плаценти, кровообігу між матір'ю та плодом). Коли фактори ангіогенезу виробляються в надлишку в порівнянні з кількістю ангіогенних з інгібіторними факторів росту судин, спостерігається зростання кровоносних судин. Коли інгібітори знаходяться в надлишку відносно стимуляторів, ангіогенез припиняється.

Надлишковий ангіогенез відбувається при хворобах, серед яких, наприклад, рак, діабетична сліпота, вікова дегенерація жовтої плями, ревматоїдний артрит та псоріаз. За таких умов нові судини живлять вражені тканини, руйнують нормальні тканини, а у випадку раку прокладають шлях метастазам пухлин. Недостатній ангіогенез має місце, зокрема, при коронарній хворобі, інсульті та повільному загоєнні ран. Тоді зростають неадекватні судини, а кровообіг не відновлюється належним чином, що може призвести до вмирання тканин.

Лікування новоутворень

"Новоутворення" - це ракові або інші злоякісні пухлини, спричинені ненормальним та неконтрольованим поділом клітин, які можуть поширюватися на інші частини організму через лімфатичну або кровоносну систему, "солідна пухлина" - це, зокрема, саркома, меланома, карцинома або інша солідна ракова пухлина.

"Саркома" - це пухлина, утворена з речовини, що нагадує зародкову сполучну тканину, яка складається з щільно упакованих клітин, занурених до фібрилярної або гомогенної речовини. Існують, зокрема, хондросаркома, фібросаркома, лімфосаркома, меланосаркома, міксосаркома, остеосаркома, саркома Абернеті, адіпозна саркома, ліпосаркома, саркома альвеолярних м'яких тканин, амелобластна саркома, ботриїдна саркома, хоріосаркома, ембріональна саркома, саркома Вільмса, ендометріальна саркома, стромальна саркома матки, саркома Юінга, фасціальна саркома, фібробластна саркома, злоякісна гігантоклітинна пухлина, гранулоцитарна саркома, саркома Ходжкіна, ідіопатична геморагічна саркома з множинною пігментацією, імунобластна саркома В-клітин, лімфома, імунобластна саркома Т-клітин, саркома Енсена, саркома Капоші, клітинна саркома Купфера, ангіосаркома, лейко-саркома, злоякісна саркома мезенхіми, паростеальна саркома, ретикулоцитна саркома, саркома Рауса, сероцистна саркома, синовіальна саркома та телеангіоектатична саркома.

"Меланома" - пухлина, яка виникає з меланоцитної системи шкіри та інших органів, наприклад, акральна-лентигінозна меланома, безпигментна меланома, доброякісна підліткова меланома, меланома Клаудмена, меланома S91, меланома Гард інга-Пассея, ювенильна меланома, злоякісна ластовиння, злоякісна меланома, бургіста меланома, піднігтева меланома та поверхнева меланома.

"Карцинома" - злоякісне новоутворення з епітеліальних клітин, які проникають до сусідніх тканин та продукують метастази, наприклад, ацинарна карцинома, аденоцистома, аденокистозна карцинома, аденоматозна карцинома, карцинома кори надниркових залоз, альвеолярна карцинома, карцинома базальних клітин, базаліома, плоскоклітинний рак, бронхоальвеолярна карцинома, альвеолярно-клітинний рак, бронхогенна карцинома, мізковидний рак, холангіоклітинна карцинома, хоріокарцинома, колоїдна карцинома, комедокарцинома молочної залози, ґратчаста карцинома, панцирна карцинома, рак шкіри, циліндрична карцинома, циліндрично-клітинна карцинома, рак протоків, тверда карцинома, ембріональний рак, круглоклітинна карцинома, епіермоїдальна карцинома, епітеліальний рак аденоїдів, екзофітна карцинома, позавиразкова карцинома, фіброкарцинома, желатиноподібна карцинома, гігантоклітинний рак, залозистий рак, рак зернистих клітин яєчників, карцинома матрикса волосу, гематоїдна карцинома, печінково-клітинний рак, карцинома клітин Гьортла, карцинома гіалінового хряща, гіпернефрома, ембріональна карцинома немовлят, преінвазивний рак, міжепідермальний рак, внутрішньо-епідермальний рак, карцинома Кромпехера, карцинома клітин Кульчицького, великоклітинна карцинома, карцинома кристалика ока, ліпоматозна карцинома, лімфоепітеліальна карцинома, медулярний рак, меланокарцинома, мукоїдний рак, мукоепідермоїдна карцинома, слизовий рак, міксоматозна карцинома, рак носоглотки, овсяно-клітинний рак легенів, рак кісткоподібної тканини, папілярна аденокарцинома, перипортальна карцинома, рак шиловидних клітин, перстнеподібно-клітинний рак, клітинний рак нирок, карцинома резервних клітин, саркомоподібна карцинома, карцинома Шнейдера, скіррозний рак, карцинома яєчок, недиференційований рак, карцинома дрібних клітин, картопляноподібний рак, веретенноклітинний рак, губчаста карцинома, гирляндоподібна карцинома, остеогенна карцинома із судинним компонентом, перехідно-клітинний рак, бургіста карцинома, сосочково-плоскоклітинний рак та віфльозна карцинома.

"Лейкемія" - це прогресуюча злоякісна хвороба кровотвірних органів, яка характеризується неконтрольованою проліферацією і розвитком лейкоцитів та їх попередників у крові та кістковому мозку. Клінічна класифікація лейкемії базується на (1) тривалості та характері захворювання - гостре чи хронічне; (2) виді зайнятих клітин: мієлоїдних (мієлогенна), лімфоїдних (лімфогенна) або моноцитарних; (3) збільшенні або незбільшенні кількості аномальних клітин у крові - лейкемія або алейкемія (сублейкемія). Існують такі види, як гостра не-

лімфоцитарна лейкемія, хронічна лімфоцитарна лейкемія, гостра гранулоцитарна лейкемія, хронічна гранулоцитарна лейкемія, гостра промієлоцитарна лейкемія, лейкемія Т-клітин у дорослих, алейкемічна лейкемія, лейкоцитемічна лейкемія, базофільна лейкемія, недиференційований лейкоз, коров'яча лейкемія, хронічна мієлоцитарна лейкемія, гематодерматоз, ембріональна лейкемія, еозинофільна лейкемія, лейкемія Гросса, лейкемія клітин Корті, гемобластоз, гемоцитобластоз, гістоцитарна лейкемія, лейкоз стовбурних клітин, гостра моноцитарна лейкемія, лейкопенічна лейкемія, лімфатична лейкемія, лімфобластна лейкемія, лімфоцитарна лейкемія, лімфогенна лейкемія, лімфоїдна лейкемія, лімфосаркомоподібна лейкемія, мастоцитоз, мегакаріоцитна лейкемія, мікромієлобластна лейкемія, моноцитарна лейкемія, мієлобластна лейкемія, мієлоцитарна лейкемія, мієлоїдна гранулоцитарна лейкемія, мієломоноцитарна лейкемія, лейкемія Негелі, плазмоцитарна лейкемія, промієлоцитарна лейкемія, лейкемія Шиллінга, сублейкемія та недиференційована лейкемія.

Серед інших видів раку можна навести, наприклад, хворобу Ходжкіна, неходжкінівську лімфому, множинну мієлому, нейробластому, рак грудей, рак яєчників, рак легенів, рабдоміосаркому, первинний тромбоцитоз, первинну макроглобулінемію, рак дрібних клітин легенів, первинні пухлини мозку, рак шлунку, рак кишковика, злоякісну інсуліноому підшлункової залози, злоякісні карциноїди, рак сечового міхура, передзлоскісні виразки шкіри, рак яєчок, лімфоми, рак щитовидної залози, нейробластому, рак стравоходу, рак сечостатевого тракту, злоякісну гіперкальцемію, рак шийки матки, рак ендометрію, рак кори надниркових залоз та рак простати.

#### Лікування запалень

Термін "запалення" чи "запалювальне захворювання" охоплює як гострі (коли активізуються запалювальні процеси), так і хронічні (з повільною течією та утворенням нової сполучної тканини) реакції. Гострі та хронічні запалення розрізняються типом клітин, що беруть у них участь. Гостре запалення часто буває пов'язане з поліморфоядерними нейтрофілами, а хронічне звичайно характеризується лімфогістоцитарною та/або грануломатозною реакцією. Запалення включає реакції як специфічних, так і неспецифічних захисних систем. Реакція специфічної захисної системи - це відповідь специфічної імунної системи на появу антигена (у тому числі аутоантигена). Реакція неспецифічної захисної системи - це запалювальна реакція, опосередкована лейкоцитами, нездатними до імунологічної пам'яті, а саме гранулоцитами, макрофагами, нейтрофілами та еозинофілами. Приклади специфічного запалення - дифузне, фокальне, облітеративне, паренхіматозне, реактивне, специфічне, токсичне та травматичне запалення.

Тварина захищається від захворювань, що опосередковують запалення, знижуючи потенціал запалювальної реакції на запалювального агента (агента, здатного спричинювати запалення, наприклад, метаколін, гістамін, алерген, лейкотриєн,

соляний розчин, гіпервентиляція, фізичні вправи, двооксид сірки, аденозин, пропранолол, холодне повітря, брадикінін). В ідеалі потенціал запалювальної реакції знижується, бажано надовго, настільки, що організм більше не відчуває незручності та/або зміни функціонування від дії запалювального агента. Наприклад, захист може характеризуватися здатністю сполуки, введеної до організму, запобігти появі хвороби або усунути чи послабити симптоми, прояви, ознаки хвороби. Зокрема, захист може полягати у зміні запалювальної реакції таким чином, щоб усунути (тобто загальмувати, інгібувати або блокувати) занадто активну або шкідливу запалювальну реакцію. Також захист організму полягає у регулюванні опосередкованого клітинами імунітету та/або гуморального імунітету (наприклад, активності Т-клітин та/або IgE). Хворобою є будь-яке відхилення від нормального стану організму - як симптоми хвороби, так і стан, у якому відхилення (інфекція, мутація гену, генетичний дефект тощо) вже відбулося, але симптоми ще не проявилися.

#### Терапевтичні антитіла

У деяких варіантах винахід пропонує способи інгібування або пригнічення сигналізації TF/VIIa у ссавців, де потрібна знижена сигнальна активність TF/VIIa (наприклад, у випадку запалення або пухлини). Способи полягають у введенні ссавцю інгібітору TF/VIIa сигналіну у достатній кількості для інгібування або пригнічення сигналізації TF/VIIa. В інших варіантах пропонуються способи лікування або послаблення симптомів хвороб, спричинених або пов'язаних із сигналізацією тканинного фактору/фактору VII у ссавців. Як зазначено вище, до таких хвороб належать, зокрема, захворювання, пов'язані з ангіогенезом, новоутвореннями, а також запалення. Способи полягають у введенні ссавцю інгібітору сигналізації тканинного фактору у достатній кількості для інгібування або елімінації захворювання, пов'язаного з ангіогенезом, новоутвореннями, а також запалення, або для запобігання його появи чи рецидиву. У варіантах здійснення винаходу застосовують інгібітор, який є антитілом до тканинного фактору та інгібує сигналізацію тканинного фактору, не заважаючи гемостазу (наприклад, коагуляції) у ссавців.

Типовим антитілом є поліпептид, основу якого складає структурна ділянка гена імуноглобуліну або фрагменти, що специфічно розпізнають антиген й зв'язуються з ним. До відомих генів імуноглобуліну належать гені з константними ділянками капа, лямбда, альфа, гама, дельта, епсілон та мію, а також безліч генів імуноглобуліну з варіабельними сегментами. Легкі ланцюги класифікуються як капа або лямбда. Важкі ланцюги як альфа, гама, дельта, епсілон та мію, у свою чергу, визначають класи імуноглобулінів IgG, IgM, IgA, IgD та IgE відповідно. Антитіло-зв'язуюча ділянка в антитілі найбільш критична в специфічності та афінності зв'язування.

Антитіла та похідні від антитіл молекули, що зв'язують антигени, мають поліпептидні ланцюги, які демонструють міцне одно-, дво- або полівалентне зв'язування до даного епітопа чи епітопів (наприклад, TF або специфічний для TF пептидний

епітоп розпізнається MAb 10H10). Якщо не зазначено інакше, антитіла або молекули, що зв'язують антигени, за винаходом можуть мати послідовності, одержані від будь-якого виду хребетних, верблужих, пташиних чи риб. Їх можна одержувати будь-якою придатною технікою, наприклад, гібридомною, відтворенням рибосоми, відтворенням фагів, тасуванням бібліотек генів, напівсинтетичними або повністю синтетичними бібліотеками або комбінацією цих прийомів. Антитіла та молекули, що зв'язують антигени, за винаходом включають цілі антитіла, поліпептидні ланцюги, що зв'язують антигени, та інші сконструйовані антитіла (див., зокрема, Serafini, J Nucl Med. 34:533-6, 1993).

Антитіла або молекули, що зв'язують антигени, також включають фрагменти антитіл, які містять ділянки цілих антитіл, здатні зв'язувати відповідний антиген (наприклад, TF або специфічний для TF пептидний епітоп, що його розпізнає MAb 10H10). До таких фрагментів антитіл належать (i) одновалентний фрагмент Fab, який складається з доменів VL, VH, CL та CH1; (ii) двохвалентний фрагмент F(ab')<sub>2</sub> з двох фрагментів Fab, зшитих дисульфідним містком у зоні талії; (iii) фрагмент Fd що складається з доменів VH та CH1; (iv) фрагмент Fv що складається з доменів доменів VL та VH одного плеча антитіла, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) що складається з домену VH; (vi) ізольована ділянка визначення комплементарності (CDR). Більш того, хоча двоє доменів фрагменту Fv - VL та VH - кодуються різними генами, їх можна з'єднувати рекомбінантними методами за допомогою синтетичного лінкера, який дозволяє зробити з них єдиний протейновий ланцюг, де VL та VH домени паруються, утворюючи моновалентну молекулу (так звану одноланцюгову Fv (scFv) (Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Huston et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988).

Антитіла та молекули, що зв'язують антигени, за винаходом включають також один або кілька імуноглобулінових ланцюгів, які хімічно злиті з іншими білками або експресовані як злиті білки, будучи біспецифічними антитілами. Біспецифічні або біфункціональні антитіла, є штучними гібридними антитілами з двома різними парами важких та легких ланцюгів і двома різними сайтами зв'язування. До інших зв'язуючих антигени фрагментів антитіл за винаходом належать двовалентні scFv (дитіла), бівалентні антитіла scFv, де молекула антитіла розпізнає два різні епітопи, одинарні зв'язувальні домени (dAbs) та мінітіла.

Різнноманітні наведені антитіла можна одержувати ферментативною або хімічною модифікацією цілих антитіл, або синтезом наново за методиками рекомбінантної ДНК (наприклад, одноланцюговий Fv), або ідентифікацією з бібліотек фагових дисплеїв (див., зокрема, McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990). Так, мінітіла можна одержувати відомими способами, наприклад, за Vaughan and Sollazzo, Comb Chem High Throughput Screen. 4:417-30 2001. Існує безліч способів одержання біс-пецифічних антитіл, у тому числі злиття гібридом або зшивання фрагментів Fab' (Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990);

Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992). Одноланцюгові антитіла ідентифікуються за бібліотеками фагових дисплеїв або рибосом, чи перемішаних бібліотек генів. Такі бібліотеки можна будувати з синтетичних, напівсинтетичних або централізованих та імунокомпетентних джерел.

Конкретним прикладом антитіл, що можуть застосовуватися у лікувальній практиці, може бути мишаче моноклональне антитіло 10H10. Як буде показано нижче у прикладах, MAb 10H10 діє як інгібітор сигналізації тканинного фактору, не впливаючи на гемостаз. Це антитіло докладно описане у патентах США №№ 5,223,427 та 6,001,978. Гібридома, що виробляє це антитіло, була депонована згідно з вимогами Будапештської угоди в Американській колекції типових культур (ATCC) (Манасас, штат Вірджинія) 27 березня 1987 р. під № HB9383. На додаток до антитіла 10H10, продуковані цією гібридомною, у способах лікування за винаходом можна використовувати будь-які антитіла, що мають таку само специфічність і таку само або кращу афінну спроможність, що й MAb 10H10. Крім того, у способах лікування за винаходом можна використовувати будь-які молекули або фрагменти, що зв'язують антигени, які є похідними від MAb 10H10, або антитіла, що мають таку само специфічність і таку само або кращу зв'язувальну спроможність, що й MAb 10H10.

Деякі із способів згідно з винаходом мають на меті лікування людей. При лікуванні хворих людей бажано застосовувати пристосовані для використання на людях антитіла, людські антитіла або химерні антитіла, що містять людські послідовності (наприклад, у константному регіоні). У порівнянні з антитілами, отриманими з інших організмів (наприклад, мишей), таке антитіло, потрапляючи до організму людини, виявляє меншу антигенність або взагалі її не має. Химерне антитіло проти TF (наприклад, з такою само зв'язувальною спроможністю, як у MAb 10H10) може складатися з композиту сегментів нелюдських антитіл проти TF з регіонами людських антитіл. Наприклад, химерний H ланцюг може складатися з антиген-зв'язуючої ділянки варіабельного сегменту важкого ланцюга мишачого антитіла проти TF, наведеного тут, з частиною константної ділянки важкого ланцюга людського антитіла. Цей химерний важкий ланцюг може об'єднуватися з химерним L ланцюгом, що являє собою зв'язуючу антиген ділянку варіабельного сегменту легкого ланцюга мишачого антитіла проти TF, зшиту з частиною константної ділянки людського легкого ланцюга.

Химерні антитіла проти TF за винаходом можна одержувати способами, наведеними в статях (див., наприклад, Robinson et al., міжнародна заявка PCT/US86/02269; Akira, et al., європейська заявка EP 184,187; Taniguchi, M., європейська заявка EP 171,496; Morrison et al., європейська заявка EP 173,494; Neuberger et al., міжнародна заявка WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., європейська заявка EP 125,023; Better et al., Science 240:1041-1043, 1988; Liu et al., PNAS 84:3239-3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139:3521-3526, 1987; Sun et al., PNAS 84:214-218, 1987; Nishimura et al., Cane. Res. 47:999-1005, 1987;

Wood et al., *Nature* 314:446-449, 1985; Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559, 1988).

Химерні антитіла, що містять цілі варіабельні сегменти від нелюдських антитіл, можна надалі пристосовувати до використання у людини (гуманізувати), щоб зменшити антигенність антитіл у людському організмі. Для цього звичайно замінюють певні послідовності амінокислотних залишків у варіабельних сегментах Fv (каркасних або поп-CDR ділянки) на еквівалентні послідовності або амінокислотні залишки з людських варіабельних сегментів Fv. Ці додатково заміщені послідовності амінокислотних залишків звичайно не беруть прямої участі у зв'язуванні антигенів. Частіше гуманізація антитіл, що не належать людині відбувається шляхом заміни лише CDR сегментів (зокрема, вищенаведених мишачих антитіл проти TF) на CDR сегменти людських антитіл. У деяких випадках після того замінюють певні додаткові залишки у людських каркасних сегментах на відповідні залишки з нелюдського донорського антитіла. Така додаткова заміна часто потрібна для поліпшення зв'язування антигену. Це пояснюється тим, що гуманізовані антитіла, у яких лише CDR сегменти пересажені з нелюдського антитіла, не завжди мають таку само зв'язувальну активність, як нелюдські донорські антитіла. Отже, на додаток до CDR сегментів гуманізовані антитіла проти hTF за винаходом (наприклад, такі, що не поступаються за специфічністю зв'язування MAb 10H10) можуть мати у людському каркасному сегменті деякі амінокислотні залишки, заміщені відповідними залишками від нелюдських донорських антитіл (наприклад, вищенаведеного мишачого антитіла). Способи одержання гуманізованих антитіл шляхом заміщення негіперваріабельних сегментів, включно з критеріями вибору каркасних залишків для заміщення, описані в статтях (див., наприклад, Winter et al., заявка Великої Британії GB 2188638A (1987), патент США 5,225,539; Jones et al. *Nature* 321:552-525, 1986; Verhoeven et al., *Science* 239:1534, 1988; Beidler et al., *J. Immunol.* 141:4053-4060, 1988; та WO 94/10332).

На додаток до химерних або гуманізованих антитіл до hPAR1, для лікування людей за винаходом можна використовувати чисто людські антитіла з такою само специфічністю зв'язування та порівнянню або кращою спорідненістю зв'язування, що й у мишачих антитіл типу MAb 10H10. Людські антитіла проти TF можна одержувати будь-яким відомим способом, наприклад, фаговим дисплеєм за допомогою бібліотеки антитіл, створеної з людських імуноглобулінових послідовностей (див., наприклад, Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995), патенти США №№ 4,444,887 та 4,716,111; публікації PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 та WO 91/10741).

Похідні антитіла або молекули, що зв'язують антигени, з такою само специфічністю зв'язування та рівною або кращою спорідненістю зв'язування, що й у MAb 10H10, можна одержувати способами, відображеними в статтях та представленими тут. Так, кандидатурні антитіла або імуноглобуліни, що

виробляються проти антигена тканинного фактору, можна перевіряти, наприклад, на здатність конкурувати з MAb 10H10 на зв'язування з поліпептидом чи пептидом тканинного фактору. Поліпептидні та поліенуклеотидні послідовності людського тканинного фактору описані в статтях (наприклад, Scarpati et al., *Biochemistry* 26:5234-5238, 1987; Fisher et al., *Thromb. Res.* 48:89-99, 1987). Поліпептиди чи пептиди тканинного фактору, придатні для відбору, можна одержувати добре відомими або описаними тут способами. Крім того, у літературі описана низка специфічних антигенних пептидів, одержаних з людського тканинного фактору, наприклад, у патентах США №№ 5,223,427 та 6,001,978. У цих патентах також йдеться про характер зв'язування MAb 10H10 з низкою пептидів тканинного фактору. Наприклад, показано, що MAb 10H10 специфічно зв'язується з пептидом тканинного фактору з послідовністю SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWERPKV (SEQ ID NO:1) або ECDLTDEIVKDVQKQTY (SEQ ID NO:2), але не до деяких інших пептидів, одержаних з людського тканинного фактору, таких, як, TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVQKQTY (SEQ ID NO:3) або LARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLC (SEQ ID NO:4). Отже, кандидатурні антитіла (тобто антитіла, вироблені проти поліпептиду людського тканинного фактору) можна відбирати за здатністю блокувати зв'язування MAb 10H10 з пептидом послідовністю SEQ ID NO:1 та/або SEQ ID NO:2. Можна також відбирати за картиною зв'язування, ідентичною або близькою до MAb 10H10, з низкою пептидів людського тканинного фактору, як описано у патенті США № 5,223,427. Методики такого відбору добре відомі (див., наприклад, патенти США №№ 5,223,427 та 6,001,978) і також наводяться тут.

На додаток до аналізів *in vitro* можна застосовувати методики ідентифікації *in vivo* антитіл проти TF, придатних для здійснення способу за винаходом. Наприклад, методика заміни варіабельного сегменту нелюдського антитіла на варіабельний сегмент людського антитіла *in vivo* при збереженні або поліпшенні характеристик зв'язування описана у заявці США № 10/778,726 (публікація № 20050008625). З метою вироблення людського антитіла з такою само специфічністю і такою само або кращою спорідненістю зв'язування, як у мишачого MAb 10H10, у вищенаведена роботі пропонується базована на скерованій епітопами заміні варіабельних сегментів нелюдського антитіла на цілком людське антитіло. Одержане антитіло в цілому за структурою не схоже з вихідним нелюдським, але зв'язується з тими самими епітопами того ж самого антигена.

Людські антитіла з такою само або кращою спорідненістю до специфічного епітопа, що й вихідне нелюдське антитіло (наприклад, мишаче MAb 10H10) можна одержати від фірм, які виробляють людські антитіла. Наприклад, щоб виробити потрібне людське антитіло, KaloBios, Inc. (Маунтін-В'ю, Каліфорнія) використовує бібліотеку людських "акцепторних" антитіл. При цьому створюється бібліотека людських антитіл, напряму скерованих



або орієнтованих на той самий епітоп, що зв'язуються з тим епітопом, що й нелюдське антитіло, але з іншою спорідненістю. Далі антитіла в орієнтованих на епітопи бібліотеці відбираються за такою самою або кращою спорідненістю, що й вихідне нелюдське антитіло. Відібрані людські антитіла після того аналізують на афінність та ідентичність послідовності.

На додаток до MAB 10H10 та одержаних з нього антитіл або зв'язуючих антигени молекул отриманих з них, можна одержувати інші антитіла проти TF з властивостями, придатними для використання у способах лікування за винаходом, за допомогою загальновідомих методик та прийомів. Добре відомо, що реагентами, здатними до біоспецифічного зв'язування є антитіла, фрагменти антитіл, що зв'язуються з тканинним фактором, наприклад, на метастазних або запалювальних клітинах (наприклад, одноланцюгові антитіла, фрагменти Fab<sup>1</sup>, фрагменти F(ab')<sub>2</sub>, а також scFv протеїни та аффітіла (Affibody, Teknikringen 30, 6 поверх, п/с 700 04, Стокгольм SE-10044, Швеція; див. патент США № 5,831,012, повністю включений сюди як посилальний матеріал). У залежності від призначення це також можуть бути рецептори та інші білки, здатні до специфічного зв'язування інших біомолекул.

Гібридні антитіла та фрагменти гібридних антитіл включають цілі молекули антитіл з повними легкими та важкими ланцюгами або будь-які їх фрагменти, наприклад, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, scFv, легкі ланцюги антитіл та важкі ланцюги антитіл. Придатні є також Химерні антитіла з варіабельними та константними сегментами від різних видів, що описані тут, також є придатними, (див., наприклад, заявку США № 20030022244).

Спочатку обирають цільовий об'єкт, до якого можна створити антитіло. Прийоми створення моноклональних антитіл, спрямованих на цільові об'єкти, добре відомі. Серед них можна, зокрема, назвати ксено- або гуманізовані мишачі антитіла, гібридами тощо. Цільовим об'єктом може бути будь-яка речовина, здатна виявляти антигенність; зазвичай це білки та полісахариди протеїдів, наприклад, рецептори, ферменти, фактори росту, пептиди тощо. Треба розуміти, що згідно з винаходом можуть використовуватися не лише природні антитіла, а й штучно створені, або ж фрагменти антитіл, спрямовані на завданий об'єкт.

Антитілами (Ab), що їх можна піддавати зазначеним прийомом, можуть бути моноклональні та поліклональні антитіла, а також фрагменти антитіл, як от Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, scFv, діатіла, легкі ланцюги антитіл, важкі ланцюги антитіл та/або фрагменти антитіл, одержані з бібліотек фагів або фагемідів. Первинне антитіло одержують з вихідних видів, зокрема, з послідовності нуклеїнових або амінокислот варіабельної ділянки легкого ланцюга, важкого ланцюга або обох їх, антитіла вихідного виду, що має специфічність щодо цільового антигена. Вихідним є будь-який вид, в якого можна генерувати антитіла або бібліотеки антитіл, тобто щури, миші, кролики, кури, мавпи, люди тощо. Прийоми вироблення та клонування моноклональних антитіл добре відомі фахівцям. Після одержання

потрібного антитіла варіабельні сегменти (VH та VL) поділяють на окремі компоненти (тобто каркас (FR) та CDR) з використанням будь-яких можливих визначень CDR (наприклад, чистий Kabat, чиста Chothia, комбіновані Kabat та Chothia й будь-які інші, відомі фахівцям). Після одержання треба обрати відповідний цільовий вид для одержання каркасу. В одному з варіантів співставляють кожний окремий каркасний сегмент з послідовності антитіл вихідного виду з варіативними послідовностями амінокислот або послідовностями генів від цільового виду. Програми пошуку співставлень відомі фахівцям - це BLAST та інші. Наприклад, якщо цільовим видом є людина, джерело таких послідовностей амінокислот або послідовностей генів (зародкова лінія або переформовані послідовності антитіл) можна знайти у будь-якій придатній базі даних, наприклад, Genbank, база даних протеїнів NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), VBASE, бази даних генів людських антитіл (<http://www.mrgc-sre.cam.ac.uk/imt-doc>) та бази даних імуноглобулінів Kabat (<http://www.immuno.bme.nwu.edu>) або у транслюваних з них продуктах. Якщо співставлення робляться на основі послідовностей нуклеотидів, то треба проаналізувати гени з цієї субпослідовності, щоб відібрати ті, що мають найближчу гомологію амінокислот до антитіл вихідного виду. Вважається, що послідовності амінокислот або генів, гомологічно найближчі у порівнянні з іншими послідовностями у базі даних, є придатними для використання та маніпулювання відповідно до наведених тут процедур. Більш того, послідовності амінокислот або генів з менш близькою гомологією можна використовувати, коли вони кодують продукти, які після маніпуляцій та відбору згідно з винаходом демонструють специфічність до цільового антигена. У деяких варіантах придатними можна визнати більше ніж 50% гомологічного ряду. Звичайно, цільовим видом не обов'язково є людина.

"Лікування" - це будь-які явні ознаки успішного втілення лікувальних заходів, або поліпшення стану, чи запобігання появи раку чи запалення, включаючи такі об'єктивні або суб'єктивні показники, як полегшення; ремісія; послаблення симптомів або поліпшення самопочуття хворого; уповільнення дегенерації або розпаду; або досягнення меншого виснаження кінцевою фазою дегенерації. Одужання або поліпшення симптомів може визначатися на підставі об'єктивних чи суб'єктивних параметрів, у тому числі результатів лікарського обстеження.

Відповідно термін "лікування" стосується введення сполук за винаходом для запобігання або затримки, полегшення, припинення або інгібування розвитку симптомів або станів, пов'язаних із захворюванням очей. Термін "лікувальна ефект" охоплює послаблення, усунення або запобігання захворюванню, симптомам захворювання або бічним ефектам захворювання у хворого.

"У сполученні з", "комбінована терапія" та "комбіновані продукти" у визначених варіантах стосується спільного введення хворому першого лікарського засобу та сполук за винаходом. При комбінованому введенні кожний компонент можна вводити одночасно або у будь-якій послідовності у

різні моменти часу. Отже, кожний компонент можна вводити нарізно, але досить близько у часі для досягнення потрібної лікувальної дії.

"Лікування" раку, ракових метастазів або запалень згідно з винаходом включає профілактику появи симптомів у хворого, який має схильність до раку або запалення, але ще не має видимих проявів захворювання, інгібування симптомів раку або запалення (уповільнення або припинення їх зростання), полегшення симптомів або бічних ефектів раку чи запалення (у тому числі паліативне лікування), і полегшення симптомів раку чи запалення (спричинення регресії). "Лікування" - це будь-які явні ознаки успішного проведення лікувальних засобів, або поліпшення стану, або запобігання появи раку чи запалення, включаючи такі об'єктивні або суб'єктивні показники, як полегшення; ремісія; послаблення симптомів або поліпшення самопочуття хворого; уповільнення дегенерації або розпаду; або досягнення меншого виснаження кінцевою фазою дегенерації. Одуjuanня або поліпшення симптомів може визначатися на підставі об'єктивних чи суб'єктивних параметрів, у тому числі результатів лікарського обстеження. Відповідно термін "лікування" стосується введення сполук за винаходом для запобігання або затримки, полегшення, припинення або інгібування розвитку симптомів або станів, пов'язаних із очним захворюванням. Термін "лікувальна дія" охоплює послаблення, усунення або запобігання захворюванню, симптомам захворювання або бічним ефектам захворювання у хворого.

"Одиниця дози" - фізично дискретна одиниця, що визначається як разова доза для конкретного хворого. Кожна одиниця містить завдану кількість діючої речовини (речовин), розраховану на завдання потрібної лікувальної дії у пов'язанні з відповідним фармацевтичним носієм. Призначення того чи іншого дозування визначається (а) характеристиками діючої речовини (речовин) та потрібним лікувальним ефектом, (b) обмеженнями, зумовленими характером такої діючої речовини (речовин).

Терміни "ідентичний" або процент "ідентичності" двох або більше нуклеїнових кислот або послідовностей поліпептидів це однакові послідовності або ті містять певний процент однакових амінокислотних залишків або нуклеотидів (наприклад, біля 60% ідентичності, переважно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, або більше ідентичності у завданому сегменті (наприклад, послідовність нуклеотидів, яка кодує тканинний фактор або антитіло проти тканинного фактору за винаходом), при порівнянні та вишикуванні за максимальною відповідністю у вікні порівняння або призначеному сегменті) при порівнянні за алгоритмами порівняння послідовностей BLAST або BLAST 2.0 з наведеними нижче параметрами умовчання, або при ручному порівняльному аналізі та візуальному огляді (див. сайт NCBI). Такі послідовності вважаються "по суті ідентичними". Цей термін також стосується комплексності дослідної послідовності. Термін також охоплює послідовності, що мають делеції та/або додатки, а також послідовності з заміщеннями. Як

описано далі, преференційні алгоритми враховують розриви і т.п. Бажано, щоб ідентичності існували у сегменті, що має принаймні 25 амінокислот чи нуклеотидів завдовжки, краще ж 50-100 амінокислот чи нуклеотидів.

При порівнянні послідовностей зазвичай одна послідовність слугує еталоном, з яким порівнюються дослідні послідовності. При застосуванні алгоритму порівняння послідовностей дослідні та еталонну послідовність вводять до комп'ютера, за потреби завдають координати послідовностей та визначають параметри програми алгоритму послідовностей. Переважно застосовують параметри програми за умовчанням або визначають альтернативні параметри. Далі алгоритм порівняння послідовностей визначає ступінь ідентичності дослідних послідовностей відносно еталонної послідовності, виходячи з параметрів програми.

"Вікно порівняння" тут включає посилання на сегмент будь-якої кількості безперервних позицій, обраний з-поміж 20-600, звичайно 50-200, переважно 100-150 позицій, у якому послідовність можна порівнювати з еталонною послідовністю з такою самою кількістю безперервних позицій після оптимального порівняння структур двох послідовностей. Прийоми групування структур послідовностей для порівняння добре відомі фахівцям. Оптимальне групування послідовностей для порівняння можна здійснити, наприклад, за допомогою алгоритму локальної гомології (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482, 1981), алгоритму гомологічного групування (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970, пошуком подібності за методикою Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988), машинними виконаннями цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA та TFASTA у пакеті Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science "Dr. Madison" WI); або ручним порівнянням структур та візуальним оглядом (див., наприклад, Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*. 1995 supplement).

Прикладом алгоритмів, яким надається перевага в алгоритмах для визначенні ступеню ідентичності та подібності послідовностей є BLAST та BLAST 2.0, описані у Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402, 1977, та Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990, відповідно. BLAST та BLAST 2.0 з описаними тут параметрами використовуються для визначення ступеню ідентичності нуклеїнових кислот та протеїнів за винаходом. Програмне забезпечення для виконання аналізу BLAST є доступне від Національного центру біотехнологічної інформації (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). За цим алгоритмом спочатку знаходять пари з високою подібністю (HSP), визначаючи короткі слова довжини W у послідовності запиту, які або збігаються, або відповідають якійсь позитивній пороговій величині T при порівнянні структур із словом рівної довжини у базі даних послідовностей. T називають порогом подібності слова в оточенні (Altschul et al., вище). Ці початкові порогові влучення слугують зародками для подальшого пошуку довгих HSP, що їх містять. Влучення поширюються в обох напрямках уздовж кожної послідовності до тих пір, поки кумулятивний рахунок влучень збільшується.

Розраховують кумулятивну множину, використовуючи для нуклеотидних послідовностей параметри  $M$  (множина відповідностей для пари збіжних залишків; завжди  $> 0$ ) та  $N$  (множина невідповідностей для пари незбіжних залишків; завжди  $< 0$ ). Для послідовностей амінокислот використовують матрицю множин для розрахунку кумулятивного рахунку. Поширення влучень слів в обох напрямках припиняється, коли інтегральна множина відхиляється на величину  $X$  від максимального досягнутого значення; кумулятивний рахунок доходить до нуля або нижче завдяки накопиченню одного або кількох негативних збігів залишків; досягнутий кінець тієї чи іншої послідовності. Параметри  $W$ ,  $T$  та  $X$  алгоритму BLAST визначають чутливість та швидкість дії алгоритму. Програма BLASTN (для нуклеотидних послідовностей) використовує за умовчанням довжину слів ( $W$ ) 11, очікування ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  та порівняння обох ланцюгів. Для послідовностей амінокислот програма BLASTP використовує за умовчанням довжину слів 3, очікування ( $E$ ) 10 та матрицю множин BLOSUM62 (див. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:10915,1989), вирівнювання ( $B$ ) 50, очікування ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  та порівняння обох ланцюгів.

"Поліпептид", "білок" та "протеїн" рівною мірою означають полімер амінокислотного залишку. Терміни застосовуються також до полімерів амінокислот, у яких один або кілька амінокислотних залишків слугують штучною хімічною імітацією відповідної природної амінокислоти, а також до природних та штучних полімерів амінокислот.

(0065) "Амінокислота" - природна або штучна амінокислота, а також аналоги та імітації амінокислот, які функціонують подібно до природних амінокислот. Природні амінокислоти - це амінокислоти, закодовані генетичним кодом, включаючи ті, що були пізніше модифіковані, наприклад, гідроксіпролін, у-карбоксиглютамат та О-фосфосерин. Аналоги амінокислот - це сполуки, які мають таку само базову хімічну структуру, що й природні амінокислоти, наприклад, атом вуглецю, пов'язаний з атомом водню, карбоксильною групою, аміногрупою та R-групою, наприклад, гомосерин, норлейцин, метіонинсульфоксид, метіонинметилсульфоній. Такі аналоги мають модифіковані R-групи (наприклад, норлейцин) або модифіковані пептидні каркаси, але їх базова хімічна структура не відрізняється від природної амінокислоти. Імітації амінокислот - це сполуки, які за структурою відрізняються від загальної хімічної структури амінокислоти, але функціонують аналогічно природній амінокислоті.

Амінокислоти позначаються тут або загальнопризначеними трьохлітерними позначками, або однолітерними згідно з рекомендаціями біохімічного комітету номенклатури IUPAC-IUB. Нуклеотиди також позначаються однолітерними кодами..

"Консервативно модифіковані варіанти" стосуються послідовностей як амінокислот, так і нуклеїнових кислот. Відносно конкретних послідовностей нуклеїнових кислот консервативно модифіковані варіанти стосуються тих нуклеїнових кислот, які кодують ідентичні або майже ідентичні

послідовності амінокислот, або де нуклеїнові кислоти не кодують ідентичні або по суті ідентичні послідовності амінокислот. Завдяки виродженості генетичного коду велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодують будь-який даний протеїн. Наприклад, кодони GCA, GCC, GCG та GCU усі кодують амінокислоту аланін. Отже, у будь-якій позиції, де на аланін вказує кодон, цей кодон можна змінювати на будь-який з відповідних кодонів, не змінюючи кодований поліпептид. Такі варіації нуклеїнових кислот називаються "мовчазними" і є різновидом консервативно модифікованих варіацій. Кожна послідовність нуклеїнових кислот, яка кодує поліпептид, також описує усі можливі мовчазні варіації нуклеїнової кислоти. Фахівцям зрозуміло, що кожний кодон у нуклеїновій кислоті (крім AUG - єдиного кодону для метіоніну - та TGG - єдиного кодону для триптофану) можна модифікувати з одержанням функціонально ідентичної молекули. Відповідно кожна мовчазна варіація нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, є неявно присутня у кожній описаній послідовності що цікавить нас відносно вираженого продукту, але не відносно реально існуючих нуклеїнових послідовностей.

Щодо послідовностей амінокислот, фахівець знає, що окремі заміни, виключення або включення до нуклеїнової кислоти, пептиду, поліпептиду або послідовності протеїнів, яке змінює, виключає або додає певну одну амінокислоту або невелику їх кількість до кодованої послідовності, є «консервативно модифікуючою варіацією», де результатом зміни є заміщення амінокислоти хімічно схожою амінокислотою. Таблиці консервативного заміщення із зазначенням функціонально подібних амінокислот є добре відомі. Такі консервативно модифіковані варіації доповнюють поліморфні варіанти, міжвидові гомологи та алелі згідно з вивченням.

Наступні вісім груп містять амінокислоти, які консервативно заміщують одна одну: 1) аланін (A), гліцин (G); 2) аспарагінова кислота (D), глютамінова кислота (E); 3) аспарагін (N), глютамін (Q); 4) аргінін (R), лізін (K); 5) ізолейцин (I), лейцин (L), метіонін (M), валін (V); 6) фенілаланін (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонін (T); 8) цистеїн (C), метіонін (M) (див., наприклад, Creighton, Proteins (1984)).

Макромолекулярні структури, наприклад, поліпептидні, можна описувати на різних рівнях організації. Загальний огляд цієї організації див., наприклад, Alberts et al, Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., 1994) та Cantor and Schimmel, Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules, 1980. "Первинна структура" стосується послідовності амінокислот окремого пептиду. "Вторинна структура" стосується локально впорядкованих трьохвимірних структур усередині поліпептиду. Ці структури відомі як домени - ферментні, позаклітинні, трансмембранні, порові та цитоплазматичні хвостові домени. Домени - це ділянки поліпептиду, які формують компактний юніт й звичайно мають довжину від 15 до 350 амінокислот. Прикладом є домени з ферментативною активністю, наприклад, домен кінази. Типові домени

складаються з менших відрізків поліпептидів -  $\beta$ -складчастих структур та  $\alpha$ -спіралей. "Третинна структура" - це трьохвимірна структура повного мономеру поліпептиду. "Четвертинна структура" є трьохвимірною структурою, утвореною нековалентними зв'язками незалежних третинних одиниць. Анізотропні стани також називаються енергетичними.

Окрема послідовність нуклеїнових кислот також охоплює "сплайсовані варіанти". Подібним чином окремих протеїнів, кодованих нуклеїновою кислотою, також реферує до будь-якого протеїна, кодованого сплайсованим варіантом цієї нуклеїнової кислоти.

"Сплайсовані варіанти" - це продукти альтернативного сплайсингу гена. Після транскрипції вихідний транскрипт нуклеїнової кислоти може сплайсуватися так, що альтернативні продукти сплайсування однієї нуклеїнової кислоти кодуватимуть різні поліпептиди. Механізми утворення сплайсованих варіантів різні, але включають альтернативне сплайсування екзонів. Альтернативні поліпептиди, одержані з однієї нуклеїнової кислоти наскрізною транскрипцією, також охоплюються цим визначенням. Під нього підпадають будь-які продукти сплайсингу, у тому числі рекомбінантні форми продуктів сплайсингу.

"Рекомбінантний" стосовно клітини, нуклеїнової кислоти, протешу, вектора тощо означає, що вони були модифіковані введенням чужорідної нуклеїнової кислоти або протеїну, або зміною вихідної нуклеїнової кислоти або протеїну, або що дана клітина походить від клітини, модифікованої таким чином. Отже, рекомбінантні клітини мають експресію генів, відсутніх у вихідній (не рекомбінантній) формі клітини, або вихідних генів з аномальною, зниженою або зовсім відсутньою експресією.

"Суворі умови гібридизації" - умови, за яких зонд гібридується до своєї цільової субпослідовності, як правило, у комплексній суміші нуклеїнових кислот, але гібридизація проходить тільки до цільової послідовності. Суворі умови залежать від послідовності і є різними у різних обставинах. Докладно про гібридизацію нуклеїнових кислот див. Tijssen, "Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes," Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid analysis, 1993. Як правило, жорсткі умови обирають на 5-10°C нижче точки плавлення ( $T_m$ ) даної послідовності при певній іонній силі та pH.  $T_m$  - це температура (при даній іонній силі, pH та концентрації нуклеотидів), за якої 50% зондів, комплементарних до цілі, гібридизуються до цільової послідовності в умовах рівноваги (цільові послідовності присутні з надлишком, при  $T_m$ , 50% зондів гібридизовані у рівновазі). Суворі умови також досягаються додаванням дестабілізуючих агентів, наприклад, формаміду. Для селективної або специфічної гібридизації позитивним сигналом є принаймні двократна, переважно 10-кратна фоновіа гібридизація. Приклад суворих умов гібридизації: 50% формаміду, 5x SSC та 1% SDS, інкубування при  $t = 42^\circ\text{C}$ , або 5x SSC, 1% SDS, інкубування при  $65^\circ\text{C}$ , з промивкою у 0.2x SSC та 0.1% SDS при  $65^\circ\text{C}$ .

Нуклеїнові кислоти, які не гібридизуються одна до одної за жорстких умов, залишаються по суті ідентичними, якщо по суті ідентичними є кодовані ними поліпептиди. Це відбувається, наприклад, коли утворюється копія нуклеїнової кислоти з використанням максимально дозволеної генетичним кодом виродженості кодону. У таких випадках нуклеїнові кислоти звичайно гібридизуються за помірковано суворих умов гібридизації. Приклад "помірковано суворих умов гібридизації" - гібридизація у буфері з 40% формаміду, 1 M NaCl, 1% SDS при  $37^\circ\text{C}$ , промивка у 1X SSC при  $45^\circ\text{C}$ . Позитивна гібридизація потребує рівню принаймні двократного фону. Фахівцю зрозуміло, що можливі інші умови гібридизації та промивки, при збереженні умов які є помірковано суворими. Додаткову інформацію щодо визначення параметрів гібридизації можна знайти у численних джерелах, наприклад, Ausubel et al., вище.

Для PCR (полімеразно-ланцюгової реакції) температура біля  $36^\circ\text{C}$  є типовою для ампліфікації низької суворості, хоча температури ренатурації можуть коливатися від біля  $32^\circ\text{C}$  до  $48^\circ\text{C}$  залежно від довжини праймера. Для ампліфікації PCR високої суворості типовою є температура біля  $62^\circ\text{C}$ , хоча температури ренатурації високої жорсткості можуть коливатися від біля  $50^\circ\text{C}$  до біля  $65^\circ\text{C}$  у залежності від довжини та специфічності праймера. Звичайні умови циклу ампліфікації як високої, так і низької жорсткості включають фазу денатурації при  $90^\circ\text{C}$  -  $95^\circ\text{C}$  протягом 30 сек - 2 хв., фазу ренатурації протягом 30 сек. - 2 хв та фазу подовження при біля  $72^\circ\text{C}$  протягом 1 - 2 хв. Протоколи та вказівки щодо реакцій низької та високої жорсткості див., наприклад, Innis et al, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y., 1990.

"Фармацевтично прийнятний наповнювач" - це наповнювач, придатний для приготування безпечної, нетоксичної та прийнятної фармацевтичної композиції, придатний як для тварин, так і для людей. Такі наповнювачі можуть бути твердими, рідкими, напівтвердими, аерозольними чи газоподібними.

"Фармацевтично прийнятні солі та ефіри" є фармацевтично придатними й мають потрібні фармакологічні властивості. До них належать солі, у яких кислотні протони здатні реагувати з неорганічними або органічними основами. Це можуть бути солі лужних металів, тобто натрію, калію, магнію, кальцію та алюмінію. Органічні солі можуть бути утворені органічними основами, зокрема, амініми, наприклад, етаноламіном, диетианоламіном, триетаноламіном, трометаміном, N-метилглюкаміном тощо. Також придатні є кислі адуктні солі неорганічних кислот (наприклад, соляної або бромистоводневої) та органічних кислот (оцтової, лимонної, малеїнової, алкан- та аренсульфонових кислот, як метансульфорова та бензолсульфорова). Фармацевтично придатні ефіри утворені з карбокси-, сульфоніокси- та фосфонових груп, присутніх у сполуках, наприклад,  $\text{C}_{1-6}$  алкілєфіри. За наявності двох кислотних груп фармацевтично придатна сіль чи ефір можуть бути моносіллю або ефіром одноосновної кислоти або двоосновною сіллю чи ефі-

ром, а коли кислотних груп більше двох, деякі або всі такі групи можуть бути саліфіковані або естерифіковані. Сполуки за винаходом можуть існувати у несаліфікованій та/або неестерифікованій формі, й назви таких сполук можуть включати як оригінальну (несаліфіковану та неестерифіковану) сполуку, так і її фармацевтично прийнятні солі та ефіри. Також деякі сполуки за винаходом можуть бути присутні у кількох стереоізомерних формах, і назви таких сполук включають усі стереоізомери та всі суміші (рацемічні та інші) таких стереоізомерів.

"Фармацевтично прийнятні", "фізіологічно толерантні" та граматичні варіації останніх коли стосуються сполук, носіїв, розчинників та реагентів використовуються як взаємозамінні й означають, що матеріали можна вводити до людського організму, не спричиняючи небажаних фізіологічних явищ до такого ступеню, що введення такої композиції є неприйнятним.

"Терапевтично ефективна кількість" - це кількість, що при введенні хворому спричиняє лікування хвороби.

Якщо не зазначено інше, терміни "хворий" та "пацієнт" які є взаємозамінними і вживаються відносно ссавців, наприклад, людей та інших приматів, а також дослідних тварин - кролів, щурів, мишей тощо. Відповідно "хворий" або "пацієнт" - це будь-який ссавець, якому вводять сполуки за винаходом. У деяких варіантах здійснення винаходу хворий страждає від стану зниженого опіру до хвороб, наприклад, ВІЛ. В одному з варіантів для виявлення хворих з метою лікування фармацевтичною сполукою, що містить один або кілька колектинів та/або сурфактантних протеїнів згідно з винаходом, використовують відомі методики скрінінгу для визначення ступеню хвороби або стану або факторів ризику, пов'язаних з наявною або підозрюваною хворобою чи станом. Ці методики скрінінгу включають, наприклад, офтальмологічне дослідження, щоб встановити, чи страждає хворий очною хворобою. Ці та інші відомі методики дозволяють клініцистам виявити тих, хто потребує лікування. Деякі варіанти здійснення винаходу передбачають сполуки для зберігання, промивки, змочування та/або дезінфекції контактних лінз, а також штучні сльозні сполуки, та/або контактні лінзи містять один або кілька колектинів та/або сурфактантних протеїнів для запобігання розвитку очних хвороб у носіїв контактних лінз.

"Супутнє введення" відомого засобу проти раку або запалення разом з фармацевтичною сполукою за винаходом означає введення засобу або композиції, що є інгібітором тканинного фактору, наприклад, антитіла або малого хімічного утворення, у такий час, щоб як відомий засіб, так і сполука за винаходом дали лікувальний ефект. Таке супутнє введення може відбуватися одночасно, до або після введення протимікробного засобу відносно введення сполуки за винаходом. Середній фахівець легко визначить час, послідовність та дозування окремих засобів та композицій за винаходом.

Після вибору відповідного каркасного сегменту для кандидатів з одного сімейства варіабельні

сегменти важкого та легкого ланцюгів виробляються трансплантацією CDR від вихідних видів до гібридних каркасних сегментів. Складання гібридних антитіл або фрагментів гібридних антитіл з гібридними варіабельними сегментами для одного із зазначених аспектів здійснюють за відомими методиками. Наприклад, послідовності ДНК, що кодують вищеописані гібридні варіабельні домени (тобто каркаси на основі цільового виду та CDR від породжуючого виду) можна одержувати синтезом олігонуклеотидів та/або полімеразно-ланцюговою реакцією. Нуклеїнові кислоти, що кодують CDR сегменти, можна також виділяти з антитіл породжуючих видів за допомогою відповідних рестриктаз та лігувати у каркас цільового виду за допомогою відповідних зшивних ферментів. Або ж каркасні сегменти варіабельних ланцюгів антитіл породжуючого виду можна змінювати сайт-скерованим мутагенезом.

Оскільки гібриди створюються з багатьох кандидатів, що відповідають кожному каркасному сегментові, існує безліч комбінацій послідовностей, придатних для побудови згідно з наведеними принципами. Відповідно можна складати бібліотеки гібридів з різними комбінаціями окремих каркасних сегментів. Такі бібліотеки можуть бути електронними базами даних послідовностей або фізичними колекціями гібридів. Складання бібліотеки фізичних антитіл або фрагментів антитіл переважно здійснюють з використанням синтетичних олігонуклеотидів. В одному з прикладів олігонуклеотиди конструюють так, щоб їх сегменти взаємно перекривалися, завдяки чому їх можна ренатувувати й заповнювати полімеразою, наприклад, шляхом полімеразно-ланцюгової реакції (PCR). Багатокроковий повтор перекриваючого подовження використовується для того, щоб генерувати генні вставки  $V_L$  та  $V_H$ . Ці фрагменти конструюються за регіонами перекриття людських константних доменів і щоб їх можливо було зливати, використовуючи подовження перекриття аж до утворення повних легких ланцюгів та фрагментів важких ланцюгів Fd. Сегменти важких та легких ланцюгів Fd можна зшивати, подовженням перекриття, з утворенням єдиної бібліотечної вставки Fab, яку можна клонувати до дисплейного вектора. Можна користуватися й іншими способами складання гуманізованих бібліотек генів. Наприклад, бібліотеку можна скласти з олігонуклеотидів, які перекривають один одного, за допомогою лігазно-ланцюгової реакції (LCR) (Chalmers et al., Bio-techniques, 30-2: 249-252, 2001).

Різноманітні форми фрагментів антитіл можна генерувати та клонувати до відповідного вектора з утворенням бібліотеки гібридних антитіл або бібліотеки гібридних фрагментів антитіл. Наприклад, варіабельні гени можна клонувати до вектора, який містить як каркас залишок потрібного константного домену. До фрагментів, які можна клонувати, належать також цільні легкі ланцюги, Fd частини важких ланцюгів або фрагменти, які містять кодувальну послідовність Fd як важких, так і легких ланцюгів. Або ж фрагментами антитіл, що використовуються для гуманізації, можуть бути одноланцюгові антитіла (scFv).

Будь-яка система відображення вибору може використовуватися у зв'язку з бібліотекою за винаходом. Протоколи відбору для виділення потрібних членів з великих бібліотек є відомі, наприклад, метод фагових дисплеїв. Такі системи, де різні послідовності пептидів репрезентуються на поверхні ниткоподібного бактеріофага, виявилися корисними для створення бібліотек фрагментів антитіл (та послідовностей нуклеотидів, що їх кодують), для відбору *in vitro* та ампліфікації фрагментів специфічних антитіл, що зв'язують цільовий антиген. (Scott et al., Science, 249: 386, 1990). Послідовності нуклеотидів, що кодують сегменти VH та VL, пов'язані з фрагментами генів, що кодують лідерні сигнали, які скеровують їх до периплазматичного простору *E. coli*, внаслідок чого одержані фрагменти антитіл відображаються на поверхні бактеріофага, як правило, злиті з покривними протеїнами бактеріофага (наприклад, пілії або pVIII). Або ж фрагменти антитіл відображаються ззовні на лямбда-фагах чи капсидах T7 (фагових тілах). Перевагою систем відображення на фагах є те, що ампліфікація обраних членів бібліотек, як біологічних систем, відбувається просто шляхом зростання фага, що містить обраний член бібліотеки, у бактеріальних клітинах. Більш того, оскільки послідовність нуклеотидів, яка кодує поліпептидний член бібліотеки, міститься у фагу або у фагемідному векторі, це спрощує побудову послідовностей, експресію та подальші генетичні маніпуляції. Прийоми побудови бібліотек відображення антитіл на бактеріофагах та експресії бібліотек на лямбда-фагах добре відомі (McCafferty et al., Nature, 348: 552, 1990; Kang et al., Proc. Natl Acad. Sci U.S.A., 88: 4363, 1991).

Цей винахід також стосується антитіл та антигенних рецепторів Т-клітин (TCR), які специфічно зв'язують поліпептиди цього винаходу. Антитілами в цьому винаході є IgG (у тому числі IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4), IgA (у тому числі IgA1 та IgA2), IgD, IgE або IgM та IgY. Термін "антитіло" (Ab) тут охоплює всі антитіла, включаючи однокланцеві цільні антитіла, та їх фрагменти, що зв'язують антигени. Переважно йдеться про фрагменти антитіл, що зв'язують людські антигени, у тому числі Fab, Fab' та F(ab')<sub>2</sub>, Fd, однокланцеві Fv (scFv), однокланцеві антитіла, з'єднанні дисульфідно Fv (sdFv), та фрагменти, що містять домен VL або VH. Антитіла можуть походити від будь-яких тварин, включаючи птиць та ссавців. Переважно йдеться про людей, мишей, кролів, кіз, морських свинок, верблюдів, коней або курей.

Молекули або фрагменти, що зв'язують антитіла, у тому числі однокланцеві антитіла, можуть містити одну або кілька варіабельних ділянок самих по собі або у комбінації з усіма або деякими з наступних: шарнірний сегмент, домени CH1, CH2 та CH3. Винахід також охоплює будь-які комбінації варіабельного сегменту (сегментів) з шарнірним сегментом, доменами CH1, CH2 та CH3. До обсягу винаходу також входять моноклональні, поліклональні, химерні, гуманізовані, людські моноклональні та людські поліклональні антитіла, які специфічно зв'язують поліпептиди за винаходом, й

нарешті, антитіла, що є антиідіотиповими до антитіл за винаходом.

Як зазначено вище, антитіла за винаходом можуть бути моноспецифічні, біс-специфічні, триспецифічні або мультиспецифічні. Мультиспецифічні антитіла можуть бути специфічними до різних епітопів поліпептиду за винаходом або специфічними як до поліпептиду за винаходом, так і до гетерогенних сполук, наприклад, чужорідного гетерогенного поліпептиду або твердого носія (див., наприклад, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147: 60-69, 1991; патенти США №№ 5,573,920; 4,474,893; 5,601,819; 4,714,681; 4,925,648, кожний з яких є цілком включений до цього опису як посилальний матеріал; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553, 1992).

Антитіла придатні для використання за винаходом можна розглядати відносно епітопу (епітопів) або частини (частин) поліпептиду за винаходом, що їх дане антитіло розпізнає або специфічно зв'язує. Епітопи або частини поліпептидів можна характеризувати, як наведено тут, наприклад, за положенням відносно N-закінчення та C-закінчення, за розміром у амінокислотних залишках, що йдуть безперервно. Також можна виключити антитіла, які специфічно зв'язують будь-який епітоп або поліпептид у винаході. Отже, цей винахід охоплює антитіла, які специфічно зв'язують поліпептиди цього винаходу, й дозволяє виключати їх.

Антитіла за винаходом можна також характеризувати їх перехресною реактивністю. Антитіла, що не зв'язують жодного іншого аналога, ортолога або гомолога поліпептидів за винаходом, входять до його обсягу. Також входять антитіла, які не зв'язують поліпептиди з ідентичністю менше 95%, менше 90%, менше 85%, менше 80%, менше 75%, менше 70%, менше 65%, менше 60%, менше 55% та менше 50% (розраховано за відомими методами, що описані тут) до поліпептиду за винаходом. Далі, винахід охоплює антитіла, які зв'язують лише поліпептиди, кодовані полінуклеотидами, які гібридизуються з полінуклеотидом за винаходом у суворих умовах (як описано тут). Також антитіла за винаходом можуть характеризуватися по спорідненості при зв'язуванні. Переважні спорідненості при зв'язуванні мають сталу константу дисоціації  $K_d$  менше  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M та  $10^{-15}$  M.

Антитіла, що інгібують сигналізацію тканинного фактору, мають використання, зокрема, у відомих прийомах для очищення, виявлення та мічення поліпептидів за винаходом, включаючи діагностичні та лікувальні методики *in vitro* та *in vivo*. Наприклад, антитіла слугують при імуноаналізі для кількісного та якісного визначення рівнів поліпептидів за винаходом у біопробах (див., наприклад, Harlow and Lane вище, цілком включений до цього опису як посилальний матеріал).

Антитіла за винаходом можуть використовуватися окремо або у сполученні з іншими сполуками. Антитіла можна також рекомбінантно зливати з гетерологічним поліпептидом до N- або C-закін-

чення або хімічно кон'югувати (ковалентно і нековалентно) з поліпептидами інших композицій. Наприклад, антитіла за винаходом можна рекомбінантно зливати або кон'югувати з молекулами, що слугують маркерами у детекторних аналізах, та ефекторними молекулами, таким як гетерогенні поліпептиди, ліки або токсини (див., наприклад, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5,314,995 та EP 0 396 387, які всі цілком включені до цього опису як посилальний матеріал).

Антитіла за винаходом можна одержувати будь-яким відомим способом. Наприклад, поліпептид за винаходом або фрагмент антигену можна ввести тварині, щоб індукувати вироблення сироваток, що містять поліклональні антитіла. Термін "моноклональне антитіло" не обмежується антитілами, одержаними методом гібридомії. Він стосується будь-якого антитіла, одержаного від одного клону, в тому числі еукаріотного, прокаріотного чи фагового клону, будь-яким способом. Моноклональні антитіла можна створювати різноманітними способами, добре відомими фахівцям, а саме гібридомним, рекомбінантним та фаговими дисплеями.

Відомі гібридомні методи описані у Harlow and Lane вище; Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681, 1981 (цілком включені до цього опису як посилальний матеріал). Фрагменти Fab та F(ab')<sub>2</sub> можна одержувати протеолізом за допомогою таких ферментів, як папаїн (для фрагментів Fab) або пепсин (для фрагментів F(ab')<sub>2</sub>).

[0096] Або ж антитіла, що інгібують сигналізацію тканинного фактору, можна одержувати методом рекомбінантної ДНК та фагових дисплеїв чи відомими прийомами хімічного синтезу. Наприклад, антитіла за винаходом можна одержувати різними відомими методами фагових дисплеїв, де домени функціональних антитіл відтворюються на поверхні частинки фагу, який несе полінуклеотидні послідовності, що їх кодують. Фаг із потрібною зв'язувальною здатністю обирають з бібліотек комбінаторних антитіл (людських чи мишачих) прямо за допомогою антигена, переважно зв'язаного або захопленого на твердій поверхні або гранулі. Зазвичай це нитчасті фаги, у тому числі fd та M13 із стабілізованими Fab, Fv або дісульфіно зв'язаними доменами антитіл Fv, рекомбінантно зв'язаними з протеїнами гену III або гену VIII фага. Приклади методів фагових дисплеїв, придатних для одержання антитіл за винаходом, див. Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50, 1995; Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186, 1995; Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958, 1994; Persic et al., *Gene* 187: 9-18, 1997; Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280, 1994; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; та патенти США №№ 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727 та 5,733,743, усі цілком включені до цього опису як посилальний матеріал.

Як описано у цих джерелах, після відбору фага сегменти, що кодують антитіло, виділяють з фага та генерують цілі антитіла, у тому числі людські антитіла, або інші фрагменти, що зв'язують антигени, та експресуються у будь-якому організмі-хазяїні, включаючи клітини ссавців, комах, рослин, дріжджів та бактерій. Наприклад, можливо застосовувати відомі прийоми рекомбінантного продукування фрагментів Fab, Fab' та F(ab')<sub>2</sub>, наведені у WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12: 864-869, 1992; and Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34, 1995; та Better et al., *Science* 240: 1041-1043, 1988.

Приклади методик, придатних для одержання одноланцюгових Fv та антитіл, описані у патентах США №№ 4,946,778 та 5,258,498 (цілком включені до цього опису як посилальний матеріал); Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203: 46-88, 1991; Shu, L. et al., *PNAS* 90: 7995-7999, 1993; та Skerra et al., *Science* 240: 1038-1040, 1988. У певних випадках, наприклад, при використанні антитіл *in vivo* у людей та аналізі на виявлення *in vitro*, краще вживати химерні, гуманізовані або людські антитіла. Способи одержання химерних антитіл відомі (див., наприклад, Morrison, *Science* 229: 1202, 1985; Oi et al., *BioTechniques* 4: 214, 1986; Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202, 1989; та патент США № 5,807,715. Антитіла можна гуманізувати різними способами, наприклад, трансплантацією CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; та патенти США №№ 5,530,101 та 5,585,089), маскуванням або утворенням іншої контактної поверхні (resurfacing) (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., *Molecular Immunology*, 28: 489-498, 1991; Studnicka et al., *Protein Engineering* 7: 805-814, 1994; Roguska et al. *PNAS* 91: 969-973, 1994) та перетасуванням ланцюга (патент США № 5,565,332). Людські антитіла одержують різними відомими методами, у тому числі описаним вище фагових дисплеях (див. також патенти США №№ 4,444,887; 4,716,111; 5,545,806; та 5,814,318; та WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; та WO 91/10741, усі цілком включені до цього опису як посилальний матеріал).

До обсягу винаходу також входять антитіла, рекомбінантно злиті або хімічно кон'юговані (ковалентно та нековалентно) з поліпептидом за винаходом. Ці антитіла можуть бути специфічні до інших антигенів, ніж поліпептиди за винаходом. Наприклад, антитіла можуть націлювати поліпептиди за винаходом на певні типи клітин *in vitro* або *in vivo* шляхом злиття або кон'югації поліпептидів за винаходом з антитілами, специфічними до окремих поверхневих рецепторів клітин. Антитіла, злиті або кон'юговані з поліпептидами за винаходом, придатні також для імуно-аналізів *in vitro* та очистки відомими методами (див., наприклад, Harbor et al. вище та WO 93/21232; EP 0 439 095; Naramura et al., *Immunol. Lett.* 39: 91-99, 1994; патент США № 5,474,981, усі цілком включені до цього опису як посилальний матеріал; Gillies et al., *PNAS* 89: 1428-1432, 1992; Fell et al., *J. Immunol.* 146: 2446-2452, 1991).

Далі цей винахід стосується сполук, що складаються з поліпептидів за винаходом, злитих або кон'югованих з доменами антитіл, інших ніж варіабельних сегментів. Наприклад, поліпептиди за винаходом можна зливати або кон'югувати з сегментом антитіла Fc або його частиною. Частина антитіла, злита з поліпептидом за винаходом, може утворювати шарнірний сегмент, CH<sub>1</sub> домен, CH<sub>2</sub> домен та CH<sub>3</sub> домен або будь-яку комбінацію цілих доменів або їх частин. Поліпептиди за винаходом можна зливати або кон'югувати з вищезазначеними частинами антитіла, щоб подовжити період напіврозпаду поліпептидів *in vivo* або для імуноаналізів, що виконуються відомим чином. Поліпептиди також можна зливати або кон'югувати з такими частинами антитіла, утворюючи мультимери. Наприклад, частини Fc, злиті з поліпептидами за винаходом, можуть утворювати димери через дисульфідний зв'язок між частинами Fc. Вищі мультимерні форми можна утворювати злиттям поліпептидів з частинами IgA та IgM. Способи злиття або кон'югації поліпептидів за винаходом з частинами антитіла є відомими (див., наприклад, патенти США №№ 5,336,603; 5,622,929; 5,359,046; 5,349,053; 5,447,851; 5,112,946; EP 0 307 434, EP 0 367 166; WO 96/04388; та WO 91/06570 (усі цілком включені до цього опису як посилальний матеріал); Ashkenazi et al., PNAS, 88: 10535-10539, 1991; Zheng et al., J. Immunol., 154: 5590-5600, 1995; та Vil et al., PNAS, 89: 11337-11341, 1992).

Винахід також стосується антитіл, які діють як антагоністи сигналізації тканинного фактору. Наприклад, йдеться про антитіла, які цілком або частково порушують взаємодії рецептор-ліганд з унікальною конформацією поліпептидів за винаходом. Це стосується антитіл, специфічних як до рецепторів, так і до лігандів. Антитіла, специфічні до рецепторів, не запобігають зв'язуванню лігандів, але інгібують сигналізацію рецептора. Сигналізацію рецепторів можна визначити відомими методами, які описані тут або в інших джерелах. Існують також специфічні до рецепторів антитіла, які запобігають зв'язуванню лігандів і водночас інгібують сигналізацію рецептора. Нейтралізуючі антитіла зв'язують ліганд і запобігають зв'язуванню ліганда до рецептора; існують також антитіла, які зв'язують ліганд і запобігають сигналізації рецептора, але не запобігають зв'язуванню ліганда до рецептора. Деякі антитіла активують рецептор. Ці антитіла можуть діяти як антагоністи усіх або лише деяких біологічних функцій, пов'язаних з медіованою лігандом сигналізацією рецептора. Їх можна визначити як антагоністів специфічних біологічних функцій, що зазначені тут. Описані антитіла-антагоністи можна одержувати відомими способами (див., наприклад, WO 96/40281; патент США № 5,811,097 (усі цілком включені до цього опису як посилальний матеріал); Deng et al., Blood 92: 1981-1988, 1998; Chen, et al., Cancer Res., 58: 3668-3678, 1998; Harrop et al., J. Immunol 161: 1786-1794, 1998; Zhu et al., Cancer Res., 58: 3209-3214, 1998; Yoon, et al., J. Immunol, 160: 3170-3179, 1998; Prat et al., J. Cell Sci., 111: 237-247, 1998; Pitard et al., J. Immunol Methods, 205: 177-190, 1997; Liautard et al., Cytokine, 9: 233-241, 1997; Carlson

et al., J. Biol. Chem., 272: 11295-11301, 1997; Taryman et al., Neuron, 14: 755-762, 1995; Muller et al., Structure, 6: 1153-1167, 1998; Bartunek et al., Cytokine, 8: 14-20, 1996). Як зазначено вище, антитіла, що інгібують сигналізацію тканинного фактору на клітинах новоутворень або на запальних клітинах, у свою чергу, можна використовувати для вироблення анти-ідіотипових антитіл, які "імітують" поліпептиди за винаходом, відомими фахівцям способами (див., наприклад, Greenspan et al., FASEB J. 7: 437-444, 1989 та Nissinoff, J. Immunol. 147: 2429-2438, 1991). Наприклад, антитіла, які зв'язуються та конкурентно інгібують мультимеризацію поліпептиду та/або зв'язування поліпептиду за винаходом до ліганду, можуть використовуватися для вироблення антиідіотипів, які "імітують" мультимеризацію поліпептиду та/або домен зв'язування, внаслідок чого зв'язуються до поліпептиду та/або його ліганду й нейтралізують їх. Такі нейтралізуючі антиідіоти або їх фрагменти можна використовувати у лікувальних процедурах для нейтралізації ліганду поліпептиду. Наприклад, такі антиідіотипові антитіла можуть зв'язувати поліпептид за винаходом та/або його ліганди чи рецептори, блокуючи таким чином його біологічну активність.

"Інгібітори," "активатори" та "модулятори" сигналізації тканинного фактору на клітинах новоутворень або на запальних клітинах - це інгібувальні, активуючі або модулюючі молекули, які виявляються при аналізі *in vitro* та *in vivo* на зв'язування або сигналізацію тканинного фактору, наприклад, ліганди, агоністи, антагоністи та їх гомологи й міметики.

Поняття "модулятор" охоплює інгібітори та активатори. Інгібітори - це агенти, які шляхом, наприклад, зв'язування повністю або частково блокують стимуляцію, зменшують, запобігають, затримують активацію, деактивують, десенситують або регулюють у бік зменшення активності сигналізації тканинного фактору, це, наприклад, антагоністи. Активатори - це агенти, які шляхом, наприклад, зв'язування стимулюють, збільшують, відчиняють, активують, полегшують, сприяють активації, сенситизують або регулюють у бік збільшення активності сигналізації тканинного фактору, це, наприклад, агоністи. До модулаторів належать агенти, які, наприклад, змінюють сигналінг тканинного фактору зміною взаємодії з: протеїнами, які зв'язують активатори чи інгібітори, рецептори, у тому числі протеїни, пептиди, ліпиди, вуглеводи, полісахариди або їх комбінації, наприклад, ліпопротеїни, глікопротеїни тощо. До модулаторів входять генетично модифіковані варіанти природних сигнальних тканинних факторів, наприклад, із зміненою активністю, а також природні та синтетичні ліганди, антагоністи, агоністи, малі молекули та інші подібні. Аналіз на інгібітори містить, наприклад, введення дослідної модуляторної сполуки до клітини з експресією сигнального тканинного фактору з наступним визначенням функціональної дії на сигналізацію тканинного фактору, як описано тут. Зразки, що містять тканинний фактор, оброблені потенційним активатором, інгібітором або модулятором, порівнюють з контрольними зразка-



ми, що не піддавалися дії інгібітору, активатора або модулятора, для визначення ступеню інгібування. Вважається, що контрольні зразки (не оброблені інгібіторами) дають величину сигналізації тканинного фактору 100%. Інгібування має місце, коли величина сигналізації тканинного фактору становить біля 80% від контролю, опціонально 50% або 25-0%.

Здатність молекули зв'язувати сигнальний тканинний фактор можна визначити, наприклад, за здатністю дослідного ліганду зв'язувати сигнальний тканинний фактор на клітинах. Специфічність зв'язування визначається порівнянням із зв'язуванням з клітинами, що мають лише коагуляційний тканинний фактор.

В одному з варіантів антитіло, що зв'язує сигнальний тканинний фактор, можна виявити шляхом імобілізації або ліганду, або рецептора. Наприклад, аналіз полягає в імобілізації тканинного фактора, модифікованого так, що він імітує сигнальну конформацію, злиту з міткою His на гранулах активованої Ni смоли NTA. Антитіло можна додавати у відповідному буфері, а гранули інкубують певний час при даній температурі. Після промивки для видалення незв'язаного матеріалу зв'язаний протеїн можна виділити, наприклад, SDS (додецилсульфатом натрію), буферами з високим рН тощо, та проаналізувати.

#### Злиті протеїни

Антитіла проти сигнального тканинного фактору можуть застосовуватися для вироблення злитих протеїнів. Наприклад, антитіла за винаходом, злиті з іншим протеїном, слугують антигенними мітками для очищення антитіл або для підвищення стабільності антитіла у лікувальних процедурах, останнє виступає як інгібітор сигнального тканинного фактору.

До доменів, які можуть бути злиті з поліпептидами, належать не лише гетерологічні сигнальні послідовності, а й інші гетерологічні функціональні зони. Злиття не обов'язково буває прямим, воно може здійснюватися через зшивальні послідовності.

Більш того, злиті протеїни можна конструювати, для покращення властивостей поліпептидів. Наприклад, регіон додаткових, зокрема, заряджених, амінокислот можна додати до N-закінчення поліпептиду для поліпшення стабільності та стійкості при очищенні від клітини-хазяїна або при подальшій обробці та зберіганні. Також пептидні частини можна додавати до поліпептиду для полегшення очистки. Такі регіони можна видаляти при кінцевому приготуванні поліпептиду. Додання пептидних частин для полегшення обробки поліпептидів потребує лише загальновідомих прийомів.

Більш того, сполуки антитіл та сполуки, що інгібують сигналізацію тканинного фактору, включно з фрагментами та специфічними епітопами, можна з'єднувати з частинами константного домену імунoglobulinів (IgG), утворюючи химерні поліпептиди. Ці злиті протеїни полегшують очищення та подовжують період напіврозпаду *in vivo*. Повідомлялося про химерні протеїни, які містили перші два домени людського CO4-поліпептиду та різні домени константних сегментів важких або легких

ланцюгів імунoglobulinів ссавців (EP A 394,827; Traunecker et al., Nature, 331: 84-86, 1988). Злиті протеїни із зшитими дисульфідним зв'язком димерними структурами (IgG) також краще зв'язують та нейтралізують інші молекули, ніж мономерні секретовані протеїни або фрагменти протеїнів (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964, 1995).

Подібним чином у EP-A-0 464 533 (аналог у Канаді 2045869) описані злиті протеїни, що містять різні ділянки константного сегменту молекул імунoglobulinу разом з іншим людським протеїном або його частиною. У багатьох випадках Fc частина злитого протеїну корисна для діагностики та лікування, і в деяких випадках, зокрема, поліпшує фармакокінетичні властивості (EP-A 0232 262.) Або ж може бути доцільним видалення Fc частини після злиття, коли протеїн експресовано, виявлено та очищено. Наприклад, Fc частина може заважати діагностиці та лікуванню, якщо злитий протеїн слугує антигеном при імунізації. У фармацевтиці, наприклад, людські протеїни, наприклад, hIL-5, зливають з Fc частинами для високоточного аналізу при виявленні антагоністів hIL-5 (Bennett et al., J. Molecular Recognition 8: 52-58, 1995; K. Johansonera et al., J. Biol. Chem., 270: 9459-9471 1995).

Більш того, поліпептиди можна зливати із маркерними послідовностями, наприклад, з пептидом, що полегшує очистку злитого поліпептиду. Переважно послідовністю маркерних амінокислотних послідовностей є гексагістидиновий пептид - мітка у векторі pQE (фірми QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), та інші, багато з яких комерційно доступні. Як зазначено у Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989, гексагістидин полегшує очистку злитого протеїну. Також є зручною для очистки інша мітка "HA", яка відповідає епітопу, одержаному з білка грипозного гемоглобінину (Wilson et al., Cell 37: 767, 1984).

Отже, будь-який з таких злитих протеїнів можна сконструювати за допомогою поліпептидів або поліпептидів за винаходом.

#### Бібліотеки фагів scFv

Бібліотека антитіл scFv, які інгібують сигналізацію тканинного фактору у ссавців, не впливаючи на гемостаз, може використовуватися для лікування хвороб пов'язаних з порушенням ангіогенезу, новоутворень або запалень. Одним з підходів для бібліотеки фагового дисплею для виявлення композицій антитіл, які специфічно зв'язують та інгібують сигнальний тканинний фактор, не підвищуючи ризик кровотечі, є використання бібліотек фагів scFv (див., наприклад, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070, 1990). Описані різні варіанти бібліотеки scFv, відображеної на покривних протеїнах бактеріофагів. Відомі також удосконалення фагових дисплеїв, наприклад, за WO96/06213 та WO92/01047 (Medical Research Council et al.) та WO97/08320 (Morphosys), які включені сюди як посилальний матеріал. Відомі також бібліотеки відображень Fab, наприклад WO92/01047 (CAT/MRC) та W091/17271 (Affymax).

Гібридні антитіла або фрагменти гібридних антитіл, клоновані до вектору відображень, які інгібують сигналізацію тканинного фактору при лікуванні новоутворень або запалень, можна відібрати для виявлення варіантів, що зберігають високу зв'язувальну активність, бо антитіло або фрагмент антитіла будуть представлені на поверхні фага або фагоподібної частки (див., наприклад, Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001, зміст якого включений сюди як посилальний матеріал). Наприклад, у разі Fab фрагментів, продукти легкого та важкого ланцюгів Fd знаходяться під контролем Іас промотора, і з кожним ланцюгом злитий лідерний сигнал, що скеровує продукти до периплазматичного простору клітини-хазяїна. Саме у цьому просторі може правильно проходити збірка фрагментів антитіл. Фрагменти важкого ланцюга експресуються злитими з доменом білка оболонки фага, завдяки чому зібраний фрагмент антитіла включається до оболонки новоутвореного фага або фагоподібної частки. Утворення нових фагоподібних часток вимагає додання допоміжного, або хелперного фагу, який містить усі необхідні гени фага. Коли бібліотека фрагментів антитіла з'являється на поверхні фага або фагоподібної частки, відбувається так званий "пенінг". При цьому i) антитіла, презентовані на поверхні фага або фагоподібної частки, зв'язуються з цільовим антигеном, ii) незв'язані частки вимиваються, iii) зв'язані частки елюються з антигена, iv) елюйовані частки зв'язуються з новими бактеріальними клітинами, щоб розмножитись і збагатити базу для подальшого відбору. Зазвичай відбуваються три або чотири цикли пенінгу, поки не буде проведений скрінінг клонів антитіл по специфічному зв'язуванню. Таким чином фаги/фагоподібні частки дозволяють пов'язати зв'язувальний фенотип (антитіла) з генотипом (ДНК), що й робить технологію дисплею антитіл дуже успішною. Однак для гуманізації можна використовувати інші форми векторів, наприклад, клонування бібліотеки фрагментів антитіл до вектора літичних фагів (модифіковані системи T7 або Lambda Zap) для відбору та/або скрінінгу.

Після відбору потрібних гібридних антитіл та/або фрагментів гібридних антитіл вважається, що їх можна одержувати у великих обсягах будь-яким відомим способом, наприклад, експресією в прокаріотичних або еукаріотичних клітинах або що. Наприклад, гібридні антитіла або фрагменти можна одержувати відомим чином, будуючи вектор експресії, який кодує важкий ланцюг антитіла, де CDR та, за потреби, мінімальна частина каркаса варіабельного сегменту, необхідна для збереження вихідної специфічності зв'язування антитіла (побудованого вищенаведеними методами), беруться з антитіла породжуючого виду, а решта антитіла - з імуноглобуліну цільового виду, яким можна маніпулювати, як описано тут, утворюючи вектор для експресії важкого ланцюга гібридного антитіла.

У варіанті здійснення винаходу бібліотеку однокланцевих антитіл Fv (scFv) можна одержати з лімфоцитів периферійної крові від 5, 10, 15 або 20

чи більше хворих з різними формами раку. Дали можна відібрати повністю людські scFv антитіла з високою спорідненістю за допомогою синтетичних сіалілових кон'югатів Lewis\* та Lewis\* BSA. В одному дослідженні ці людські scFv антитіла демонструють специфічність до сіалілових препаратів Lewis\* та Lewis\*, про що свідчать аналізи ELISA, BIAcore та проточна цитометрія зв'язування з поверхнею клітин аденокарциноми підшлункової залози. Секвенування нуклеїнової кислоти показує, що одержані принаймні чотири індивідуальні гени scFv. Значення  $K_d$  становлять від  $1.1$  до  $6.2 \times 10^{-7}$  М, що є порівнянне із спорідненостями mAb, одержаних при вторинній імунній реакції. Ці антитіла можуть бути цінними реагентами для визначення структури та функцій вуглеводневих антигенів та при лікуванні людських пухлинних захворювань (Mao, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 6953-6958, 1999).

В іншому варіанті демонстровані на фагах комбінаторні бібліотеки антитіл придатні для вироблення та відбору широкої гами антитіл до відповідного антигена, наприклад, антитіл, що інгібують сигналізацію тканинного фактору при лікуванні новоутворень або запалень. Протеїни оболонки фага pVII та pIX можуть демонструвати гетеродімерну структуру антитіл Fv сегменту. Аспекти цієї техніки були розширені для створення великої бібліотеки людських однокланцевих Fv (scFv) з  $4.5 \times 10^9$  членів відображених на pIX нитчастого бактеріофага. Більш того, різноманітність, якість та корисність бібліотеки була продемонстрована відбором клонів scFv проти шести різних білкових антигенів. Більш ніж 90% відібраних клонів показують позитивне зв'язування до відповідних антигенів після трьох циклів пенінгу. Проаналізовані scFv також показують високу спорідненість. Наприклад, кінетичний аналіз (BIAcore) показує, що scFv проти стафілококового токсину В та токсину холери В мають наномольну та субнаномольну сталу дисоціації відповідно, отже, їх спорідненість дорівнює або перевищує спорідненість mAb, одержаних імунізацією. Досягнута також висока специфічність не лише між дуже відмінними протеїнами, але й між близькими протеїнами, такими як аглютинини *Ricinus communis* ("рицину") (RCA<sub>60</sub> та RCA<sub>120</sub>), незважаючи на гомологію послідовностей між ними >80%. Можна припустити, що ефективність бібліотеки відображень на pIX вища, ніж у pIII формату бібліотеки, і що вона є ідеальною для пенінгу до найрізноманітніших цільових антигенів (Gao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12612-12616, 2001).

Специфічне зв'язування між антитілом або іншим зв'язувальним агентом та антигеном передбачає спорідненість принаймні біля  $10^{-6}$  М. Переважно спорідненість становить принаймні біля  $10^{-7}$  М, краще  $10^{-8}$  М -  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М або  $10^{-12}$  М. Термін "епітоп" означає антигенну детермінанту, здатну зв'язуватися з антитілом. Епітоп звичайно складається з хімічно активних поверхневих груп або молекул, наприклад, амінокислот або бічних ланцюгів сахарів, й має специфічну трьохвимірну структуру та специфічні характеристики заряду. Конформаційні та неконформаційні епіто-

пи розрізняються тим, що перші, але не останні, втрачають зв'язувальну здатність у присутності денатуруючих розчинників.

Імунологічний аналіз зв'язування для виявлення сигналіну тканинного фактору та його модуляторів

Винахід пропонує способи виявлення сигналіну тканинного фактору та ідентифікації модуляторів сигналіну тканинного фактору. Як пояснюється далі, деякі методи скеровані на виявлення модуляторів сигналізації тканинного фактору у клітинній системі аналізу. В інших варіантах модулятори сигналізації тканинного фактору ідентифікуються у безклітинній системі. У деяких варіантах дослідні сполуки аналізуються для виявлення модуляторів тканинного фактору, які інгібують або пригнічують медіовану TF/VIIa сигнальну активність, але не впливають на гемостаз *in vivo*. Такі модулятори (наприклад, низькомолекулярні органічні сполуки) можна ідентифікувати за допомогою відомих сполук, що мають визначені властивості (наприклад, MAb 10H10) у різномірних конкурентних формах аналізу, що наведені тут. Так, деякі методики відбору за винаходом спрямовані на виявлення сполук, які інгібують сигналізацію TF/VIIa, але не блокують коагуляцію. Ці методики полягають у вимірюванні у присутності дослідних сполук або без них зв'язування між (i) антитілом або молекулою, що зв'язує антиген, які мають специфічність зв'язування на рівні MAb 10H10, та (ii) поліпептидом тканинного фактору, після чого виявляють інгібування зв'язування у присутності дослідної речовини у порівнянні з відсутністю дослідної речовини. У деяких методиках використовується мишаче MAb 10H10, вироблене гібридомою під № ATCC HB93 83. У деяких методиках відбору застосовуються дослідні сполуки, що являють собою переважно низькомолекулярні органічні сполуки, наприклад, хімічні сполуки з молекулярною масою не вище 5000, бажано, не вище 2,500, 1,000 або 500.

Ці методики можна здійснити будь-яким із наведених тут способів та форматів аналізу. На додаток до визначення здатності конкурентного зв'язування з тканинним фактором в присутності MAb 10H10, вимірюється також активність у модульованні сигналізації тканинного фактору (наприклад, інгібування сигнальної активності TF/VIIa без суттєвого ефекту на гемостазі). Сполуки випробують на інгібування будь-якої сигнальної активності, медіованої TF/VIIa, як описано тут (наприклад, фосфорилування MAP кінази або комплексоутворення з сигналізацією через активованій протеазо-активний 2). Методи вимірювання медіованої TF/VIIa сигнальної активності добре відомі. Як зазначено далі у прикладі 8, медіовану TF/VIIa сигнальну активність можна визначити за кількісним фосфорилуванням MAP кінази, наприклад, дослідженням рівня фосфорилування вестерн-блотінгу MAP кінази (наприклад, ERK кінази) у клітинах HUVEC (ендотеліальній клітині пупкової вени людини) або CHO (яєчниках китайського хомяка), стимульованих факторами VIIa та X. Ці аналізи можуть застосовуватися у методиках відбору, що описані тут, для ідентифікації нових мо-

дуляторних сполук (наприклад, інгібіторів) сигналізації тканинного фактору.

Вони також можуть використовуватися у методах лікування за винаходом для контролю ефекту прийнятого інгібітору сигналіну тканинного фактору. Сполука вважається інгібітором сигналізації TF, якщо здатна інгібувати сигнальну активність TF принаймні на 50%, принаймні на 75%, принаймні на 90% або принаймні на 95% від рівня сигналізації TF у відсутності сполуки. Кількісне інгібування сигналізації TF можна визначити будь-яким відомим способом (наприклад, Ahamed et al., Blood 105:2384-91, 2005) або за наведеною тут методикою, наприклад, зниженням рівня фосфорилування ERK у клітинах HUVEC протягом 6 діб за умов, наведених у прикладі 8 далі.

За будь-яким з відомих або описаних тут методів аналізу ідентифіковані за скрінігом сполуки (або інгібітори у методиках лікування за винаходом) можуть додатково вивчатися з метою довести, що вони суттєво не впливають на медіований тканинним фактором гемостаз (наприклад, коагуляцію). Наприклад, активність медіованої TF коагуляції можна виміряти вестерн-блотінгом за кількісним фактором генерації Ха у клітинах HaCaT, як демонструється у прикладах далі. Ці методики аналізу придатні для сполук, відібраних скрінігом за винаходом, або інгібіторів у методиках за винаходом. Сполука не впливає або не блокує активацію (тобто не має суттєвого ефекту) медіованого TF гемостазу (наприклад, коагуляції), якщо у її присутності активність гемостазу скорочується не більш ніж на 5%, не більш ніж на 10%, не більш ніж на 15%, або не більш ніж на 25% (наприклад, активність коагуляції, виміряна генерацією Ха за описаних умов) у порівнянні з величиною за її відсутності. У деяких варіантах потенціальну блокувальну активність сполуки щодо коагуляції можна визначити, вимірюючи дію сполуки на зв'язування тканинного фактору антитілом, яке блокує медіовану тканинним фактором коагуляцію. Таким є моноклональне антитіло 5G9, яке виробляє гібридома ATCC під № HB9382. Інгібувальна дія цього антитіла на коагуляцію та відповідні аналізи докладно описані у патенті США № 5,223,427. Відсутність помітної дії сполуки на зв'язування MAb 5G9 з тканинним фактором (наприклад, скорочення на принаймні 20%, 30%, 40%, 50%, 75% чи більше) вказує на те, що дана сполука навряд чи блокує медіовану тканинним фактором коагуляцію.

Сигналіг тканинного фактору можна також визначити якісно або кількісно за будь-яким відомим методом імунологічного аналізу зв'язування (наприклад, патенти США №№ 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288 та 4,837,168). Антитіла, придатні для методів імунологічного аналізу, можуть діяти як інгібітори сигналізації тканинного фактору не впливаючи на гемостаз ссавців. В імунологічній практиці антитіла використовують при діагностиці або лікуванні хвороб, спричинених зміненою сигналізацією тканинного фактору - фактору VIIa у ссавців. Наприклад, антитіло MAb 10H10 діє як інгібітор сигналізації тканинного фактору, не впливаючи на гемостаз у ссавців, і є придатним для імунологічного аналізу зв'язування за винахо-

дом. Огляд загального імуноаналізу див. *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7th ed. 1991). Імунологічні аналізи зв'язування (або імуноаналізи) використовують антитіло, яке специфічно зв'язується з відповідним протеїном чи антигеном (у даному разі тканинним фактором або його антигенною субпопуляцією). Антитіло (наприклад, анти-тканинний фактор) можна одержувати будь-яким відомим або описаним тут способом.

В імуноаналізі часто застосовуються маркери, які специфічно зв'язують та мітять комплекс, утворений антитілом та антигеном. Маркерним агентом може бути один з компонентів комплексу антиген/антитіло. Отже, маркером може бути мічений тканинний фактор або ж третє утворення, наприклад, вторинне антитіло, яке специфічно зв'язує комплекс антитіло/тканинний фактор (вторинне антитіло звичайно буває специфічним до антитіл того виду, з якого походить перше антитіло). Також маркерами можуть бути інші протеїни, здатні специфічно зв'язувати константні сегменти імуноглобуліну, як то протеїн А або протеїн G. Ці протеїни демонструють сильну анти-імуногенну реактивність щодо константних сегментів

імуноглобуліну різних видів (наприклад, Kronval et al., *J. Immunol.* 111: 1401-1406, 1973; Akerstrom et al., *J. Immunol.* 135: 2589-2542, 1985). Маркер можна модифікувати часткою, яка піддається розпізнаванню, наприклад, біотином, до якого може специфічно зв'язуватися інша молекула, наприклад, стрептавідин. Фахівцям відома безліч таких часток, що піддаються розпізнаванню.

В ході аналізу після кожної комбінації реагентів можуть бути потрібними інкубація та/або промивка. Інкубація може займати від 5 секунд до кількох годин, факультативно від 5 хвилин до 24 годин. Втім, тривалість інкубації залежить від формату аналізу, антигена, об'єму розчину, концентрацій тощо. Звичайно аналізи виконують при кімнатній температурі, хоча діапазон температур може бути широким, від 10°C до 40°C.

Неконкурентні форми аналізу: Імуноаналіз для виявлення сигналіну тканинного фактору у зразках може бути конкурентним або неконкурентним. При неконкурентному аналізі прямо вимірюють кількість антигена. У методиці "сендвіч" антитіла проти тканинного фактору пришивають до твердого субстрата, на якому вони будуть іммобілізовані. Далі ці іммобілізовані антитіла захоплюють тканинний фактор, наявний у зразку. Потім іммобілізований тканинний фактор зв'язується маркером, наприклад, вторинним антитілом до тканинного фактору, яке несе мітку. Або ж друге антитіло може не мати мітки, але воно, у свою чергу, зв'язується третім антитілом, специфічним до антитіл того виду, до якого належить друге антитіло. Друге або третє антитіло звичайно є модифікованою частиною, яка піддається розпізнаванню, наприклад, біотином, до якої може специфічно зв'язуватися інша молекула, наприклад, стрептавідин, утворюючи частину, що піддається розпізнаванню.

Конкурентні форми аналізу: При конкурентному аналізі кількість сигналіну тканинного фактору,

наявного у зразку, вимірюється непрямим шляхом - визначенням кількості відомого, доданого (екзогенного) тканинного фактору, витісненого з антитіла до тканинного фактору невідомим тканинним фактором, наявним у зразку. Наприклад, до зразка додають відому кількість тканинного фактору, після чого зразок обробляють антитілом, що специфічно зв'язує тканинний фактор. Кількість екзогенного тканинного фактору, зв'язаного з антитілом, обернено пропорційна до концентрації тканинного фактору, наявного у зразку. У найкращому варіанті антитіло іммобілізується на твердому субстраті. Кількість тканинного фактору, зв'язаного з антитілом, визначають або вимірюванням обсягу комплексу тканинний фактор/антитіло, або вимірюванням кількості протеїну, що лишився незв'язаним. Кількість тканинного фактору можна визначити за допомогою міченої молекули тканинного фактору.

Іншим варіантом конкурентного аналізу є аналіз інгібування гаптену. Відомий тканинний фактор іммобілізують на твердому субстраті. До зразку додають відому кількість антитіла до тканинного фактору, після чого зразок контактує з іммобілізованим тканинним фактором. Кількість антитіла до тканинного фактору, зв'язаного з відомим іммобілізованим тканинним фактором, обернено пропорційна до концентрації тканинного фактору, наявного у зразку. Знов-таки кількість іммобілізованого антитіла визначають або за іммобілізованою часткою антитіла, або за його часткою, що залишається у розчині. Визначення буває прямим, якщо антитіло мічене, або непрямим, додаючи мічену частину, яка специфічно зв'язується з антитілом, як описано вище.

Визначення перехресної реактивності: Імуноаналіз у конкурентній формі часто використовують для визначення перехресної реактивності. Наприклад, тканинний фактор може бути іммобілізованим на твердому субстраті. До зразку додають протеїни (наприклад, тканинний фактор та гомологи), які конкурують за зв'язування антисироватки з іммобілізованим антигеном. Здатність доданих протеїнів змагатися за зв'язування антисироватки з іммобілізованим протеїном порівнюють із здатністю тканинного фактору змагатися з самим собою. Стандартним шляхом розраховують відсоток перехресної реактивності для зазначених протеїнів. Антисироватки з перехресною реактивністю менше 10% відносно кожного з доданих протеїнів відбирають та накопичують. Антитіла, що мають перехресну реактивність, відокремлюють від накопичених антисироваток імуноабсорбцією доданими сторонніми протеїнами, наприклад, далекими гомологами.

Імуноадсорбовані та накопичені антисироватки далі використовують в імуноаналізі із конкурентним зв'язуванням, як описано вище, для порівняння з другим протеїном, можливо, аллелем або поліморфним варіантом тканинного фактору - імуногенним протеїном. Щоб виконати таке порівняння, кожний з двох протеїнів досліджують у широкому діапазоні концентрацій та визначають кількість кожного протеїну, потрібну для інгібування 50% зв'язування антисироватки з іммобілізова-

ним протеїном. Якщо кількість другого протеїну, потрібна для інгібування 50% зв'язування, перевищує кількість тканинного фактору, потрібну для інгібування 50% зв'язування, менше ніж у 10 разів, то вважається, що другий протеїн специфічно зв'язує поліклональні антитіла, вироблені до тканинного фактору.

Інші форми аналізу: Вестерн-блотінг (імуноблотінг) використовується для знаходження та кількісного визначення тканинного фактору у зразку. Наявні у зразку протеїни розділяють гелелектрофорезом за молекулярною масою, переносять на твердий субстрат (фільтр з нітроцелюлози, нейлону або дериватизованого нейлону) та інкубують зразок з антитілами, які специфічно зв'язують тканинний фактор. Антитіло до тканинного фактору специфічно зв'язує тканинний фактор на твердому субстраті. Ці антитіла можна прямо мітити або виявляти потім міченими антитілами (наприклад, міченими антимишиними овечими антитілами), які специфічно зв'язують антитіла проти тканинного фактору.

Ще одна форма аналізу - це ліпосомний імуноаналіз (LIA), де використовуються ліпосоми, які зв'язують специфічні молекули (наприклад, антитіла) й виділяють замкнені у них реагенти або маркери. Потім виділені речовини виявляють стандартними прийомами (Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41, 1986).

Зменшення неспецифічного зв'язування: Фахівцям зрозуміло, що часто буває потрібно звести до мінімуму неспецифічне зв'язування при імуноаналізі. Зокрема, коли йдеться про антиген або антитіло, іммобілізовані на твердому субстраті, треба мінімізувати неспецифічне зв'язування із субстратом. Засоби скорочення такого неспецифічного зв'язування добре відомі. Як правило, поверхню субстрату покривають протеїновою речовиною, переважно з альбуміну бичачої сироватки (BSA), знежиреного молочного порошку або желатину. Найчастіше з молочного порошку.

Мітки: Вид мітки або групи, що піддається розпізнанню, при аналізі за винаходом не має суттєвого значення, якщо вона не впливає на специфічне зв'язування застосованого антитіла. Групою, що піддається розпізнанню, може бути будь-який матеріал, який має фізичні або хімічні властивості за якими його можна детектувати. Такі мітки широко застосовуються в імуноаналізі, і майже всі вони можуть використовуватися у цьому винаході. Це може бути будь-яка сполука, яку можна визначити спектроскопічними, фотохімічними, біохімічними, імунохімічними, електричними, оптичними або хімічними засобами. У цьому винаході можуть використовуватися магнітні гранули (наприклад, DYNABEADS™), флуоресцентні фарбники (наприклад, флуоресцеїн ізотіоціанат, техаський червоний, родамін тощо), радіоізотопи (наприклад,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  або  $^{32}\text{P}$ ), ферменти (наприклад, пероксидаза хрому, лужна фосфатаза та інші, прийняті в аналізах ELISA - твердофазному імуноферментному аналізі), люмінесцентні та колориметричні мітки, як от колоїдне золото, гранули з кольорового скла або пластику (наприклад, полістиролу, поліпропілену, латексу тощо).

Мітку можна зв'язувати прямо чи непрямо з потрібним компонентом аналізу відомими прийомами. Як зазначено вище, мітки бувають різноманітні, їх вибір залежить від потрібної чутливості, зручності кон'югації із сполукою, стабільності, наявних приладів та можливостей видалення залишків після аналізу.

Нерадіоактивні мітки часто приєднують непрямым шляхом. Як правило, молекула ліганду (наприклад, біотину) зв'язується з іншою молекулою ковалентно. Далі ліганд зв'язується до іншої молекули (наприклад, стрептавідину), яка або сама є помітна, або ковалентно зв'язана з сигнальною системою - помітним ферментом, флуоресцентною або люмінесцентною сполукою. Ліганди та їх цілі можна будь-яким чином комбінувати з антитілами, що розпізнають тканинний фактор, або вторинними антитілами, що розпізнають антитіла до тканинного фактору.

Молекули можна також прямо кон'югувати з сигнальними сполуками, наприклад, ферментом чи флуорофором. Мітками можуть слугувати такі ферменти, як гідролази, особливо фосфатази, естерази та глікозидази, а також оксидази, особливо пероксидази. До флуоресцентних сполук належать флуоресцеїн та його похідні, родамін та його похідні, дансил, умбеліферон тощо. З хемілюмінісцентних сполук можна назвати люциферин та 2,3-дігідродифталазиндіони, наприклад, люмінол. Огляд різних міткових або сигнальних систем див. патент США № 4,391,904.

Засоби знаходження міток добре відомі фахівцям. Наприклад, радіоактивні мітки виявляють лічильником сцинтиляцій або на фотоплівці методом радіоавтографії. Флуоресцентна мітка виявляється збудженням люмінофору на відповідній хвилі та визначенням одержаної флуоресценції. Флуоресценцію визначають візуально, за допомогою електронних детекторів - приладів із зарядовим зв'язком (CCD), фотопомножувачів тощо. Ферментні мітки можна виявити за допомогою відповідних субстратів для ферменту та знаходження відповідного продукту реакції. Нарешті, прості колориметричні мітки визначаються просто за кольором, пов'язаним з міткою. Так, у різних аналізах із щупами кон'юговане золото виглядає рожевим, а кон'юговані гранули показують власний колір.

При деяких аналізах мітки взагалі не потрібні. Наприклад, реакція аглютинації виявляє цільові антитіла. У цій формі мітити компоненти не треба, бо наявність цільового антитіла виявляється візуально.

Хімічний склад малих молекул

"Мала молекула" або "мале хімічне утворення" - це будь-яке хімічне або інше утворення, здатне впливати на біологічні процеси, зокрема, здатне діяти як інгібітор сигналізації тканинного фактору, не впливаючи на гомеостаз ссавця, корисне при діагностиці або лікуванні хвороби у ссавця. Малі молекули можуть містити будь-яку кількість добре відомих та тих, що використовують лікувальних агентів або бути синтезованими з бібліотеки таких молекул з метою скрінінгу для певної біологічної функції або функцій. Малі молекули відрізняються

від макромолекул за розміром. У цьому винаході малі молекули мають молекулярну масу менше 5,000 дальтонів (Da), переважно менше біля 2,500 Da, зокрема, менше біля 1,000 Da, оптимально менше біля 500 Da. У цьому винаході лікування хвороб ссавців, пов'язаних з сигналізацією тканинного фактору/фактору VIIa, мала органічна сполука, пептидоміметика або міметика антитіла може бути міметиком антитіла-інгібітору, а саме MAb 10H10.

Малі молекули - це органічні сполуки без імтації, пептидоміметики, міметики антитіл та їх кон'югати. Термін "органічна сполука" або "мале хімічне утворення" охоплює будь-які сполуки на основі вуглецю, крім макромолекул, як от нуклеїнові кислоти та поліпептиди. Крім вуглецю, органічні сполуки можуть містити кальцій, хлор, фтор, мідь, водень, залізо, калій, азот, кисень, сірку та інші елементи. Органічна сполука може бути ароматичною або аліфатичною. Як приклади органічних сполук можна навести ацетони, спирти, аніліни, вуглеводи, моносахариди, олігосахариди, полісахариди, амінокислоти, нуклеозиди, нуклеотиди, ліпіди, ретиноїди, стероїди, протеоглікани, кетони, альдегіди, насичені, ненасичені та поліненасичені жири, олії та воски, алкени, ефіри, етери, тіоли, сульфіді, циклічні сполуки, гетероциклічні сполуки, імідазоли та феноли. До органічних сполук тут включені також нітровані та галогеновані (наприклад, хлоровані) органічні сполуки. Способи одержання пептидоміметиків наведені далі. Колекції малих молекул та малі молекули, ідентифіковані за винаходом, характеризуються такими прийомами, як прискорювальна мас-спектрометрія (AMS; див. Turteltaub et al., *Curr Pharm Des* 6(10): 991-1007, 2000, *Bioanalytical applications of accelerator mass spectrometry for pharmaceutical research*; Enjalbal et al, *Mass Spectrom Rev* 19(3): 139-61, 2000, *Mass spectrometry in combinatorial chemistry*.)

Переважно малі молекули або малі хімічні утворення легкіші та дешевші в одержанні та виготовленні. Здебільшого малі молекули стабільні у різних умовах зберігання. Їх можна тісно пов'язувати з макромолекулами, утворюючи біологічно активні молекули з поліпшеними фармацевтичними властивостями, такими як час напівжиття в організмі, розподіл в організмі, метаболізм, модифікація, екскреція, секреція, видалення та стабільність поліпшують бажану біологічну активність. Поліпшені фармацевтичні властивості включають зміни у токсикологічних показниках та ефективності хімічного утворення.

Високоєфективні аналізи для модуляторів сигналіну тканинного фактору

Як зазначено вище, винахід пропонує спосіб ідентифікації модуляторів, наприклад інгібіторів або активаторів сигналіну тканинного фактору, де інгібітор не впливає на гемостаз (наприклад, у ссавців). Дослідні сполуки за цими способами можуть бути будь-якою малою органічною молекулою, або біологічним утворенням, як от протеїн, наприклад, антитіло або пептид, сахар, мала хімічна молекула, нуклеїнова кислота, наприклад, антисенсорний олігонуклеотид, ДНКі, рібозим або ліпід. Також модулятори можуть бути генетично

зміненими варіантами тканинного фактору. Як правило, дослідні сполуки - це малі органічні молекули, пептиди, антитіла, ліпіди та аналоги ліпідів.

По суті будь-яка хімічна сполука може бути потенційним модулятором або лігандом у аналізах за винаходом, хоча переважно йдеться про сполуки, розчинні у водних або органічних (особливо на основі ДМСО) розчинниках. Аналізи розраховані на скрінінг великих хімічних бібліотек шляхом автоматизації етапів аналізу та відбору сполук з будь-яких джерел для аналізу, який проходить паралельно (наприклад, у форматі мікротитрування на титраційних мікропланшетах у роботизованих аналітичних установках). Серед постачальників хімічних сполук можна назвати Sigma (Сент-Луїс, штат Місурі), Aldrich (Сент-Луїс, штат Місурі), Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, штат Місурі), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Бюхс, Швейцарія) та інших.

У переважному варіанті високоєфективні методи скрінінгу передбачають створення комбінаторних бібліотек малих органічних молекул або пептидів, що містять велику кількість потенційних лікарських сполук (потенційних модуляторів або лігандів). Такі "комбінаторні хімічні бібліотеки" або "бібліотеки лігандів" просіюють один або кілька разів, як описано тут, для виявлення тих елементів бібліотек (конкретних хімічних видів або підкласів), які демонструють потрібну характеристичну активність. Відібрані речовини слугують "лідерними сполуками" або можуть розглядатися як потенційні чи актуальні ліки.

Комбінаторна хімічна бібліотека - це зібрання різних хімічних сполук, одержаних хімічним або біологічним синтезом, при сполученні багатьох хімічних "будівельних блоків", наприклад, реагентів. Наприклад, лінійна комбінаторна хімічна бібліотека, як от бібліотека поліпептидів, створюється комбінуванням набору хімічних будівельних блоків (амінокислот) в усіх можливих сполученнях для даної довжини сполуки (тобто числа амінокислот у поліпептидній сполуці). Таким комбінуванням хімічних будівельних блоків можна синтезувати мільйони хімічних сполук.

Побудова та скрінінг комбінаторної хімічної бібліотеки добре знайомі фахівцям. До таких комбінаторних хімічних бібліотек належать, зокрема, бібліотеки пептидів (наприклад, патент США 5,010,175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37: 487-493, 1991 та Houghton et al., *Nature* 354: 84-88, 1991). Можна використовувати й інші хімікати для створення бібліотеки, зокрема пептоїди (наприклад, публікація PCT № WO 91/19735), кодованих пептидів (наприклад, публікація PCT № WO 93/20242), довільних біоолігомерів (наприклад, публікація PCT № WO 92/00091), бензодіазепинів (наприклад, патент США № 5,288,514), діверсомерів, як гідантоїни, бензодіазепіни та діпептиди (Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Set USA* 90: 6909-6913, 1993), вінілоподібних поліпептидів (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568, 1992), не-пептидних пептидоміметиків з глюкозним каркасом (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218, 1992), аналогічного органічного синтезу біб-

ліотек малих сполук (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661, 1994), олігокарбаматів (Cho et al., Science 261: 1303, 1993) та/або пептидфосфонатів (Campbell et al., J. Org. Chem. 59: 658, 1994), бібліотеки нуклеїнових кислот (Ausubel, Berger and Sambrook, вище), бібліотеки нуклеїнових кислот пептидів (наприклад, патент США 5,539,083), бібліотеки антитіл (наприклад, Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14: 309-314, 1996 та PCT/US96/10287), бібліотеки вуглеводів (наприклад, Liang et al., Science 274: 1520-1522, 1996 та патент США 5,593,853), бібліотеки малих органічних молекул (наприклад, бензодіазепинів, Baum C&EN, Jan 18, page 33 (1993); ізопреноїдів, патент США 5,569,588; тіазолідинонів та метатіазанонів, патент США 5,549,974; піролідинів, патенти США 5,525,735 та 5,519,134; морфолінових сполук, патент США 5,506,337; бензодіазепинів, 5,288,514 та подібні).

Апаратура для побудови комбінаторних бібліотек доступна для комерційного придбання (наприклад, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Луїсвілл, штат Кентукі; Symphony, Рамм, Воберн, штат Масачусетс, 433A; Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія; 9050 Plus, Millipore, Бедфорд, штат Масачусетс). Крім того, за плату існує доступ до багатьох готових комбінаторних бібліотек (наприклад, ComGenex, Princeton, NJ.; Asinex, Moscow, Ru; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd, Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD та ін.).

Сполуки-кандидати є частиною стратегії створення ліків проти новоутворень або запалень, де сполука інгібує сигналізацію тканинного фактору, не підвищуючи ризик кровотечі. Кандидатом вважається сполука, що зв'язує сигнальний тканинний фактор.

До обсягу винаходу також входять скрінінгові аналізи для виявлення кандидатів або дослідних сполук, що зв'язують тканинний фактор або модулюють активність протеїнів, поліпептидів або біологічно активних частин тканинного фактору. Дослідні сполуки можна одержати одним з численних відомих підходів в створенні комбінаторних бібліотек, серед яких: біологічні бібліотеки; бібліотеки паралельних гомогених чи твердофазних аналізів з об'ємною адресацією; синтетичні бібліотеки, що потребують зворотної деконволюції; бібліотеки за принципом "одна гранула-одна сполука" та синтетичні бібліотеки з відбором за допомогою афінної хроматографії. Підхід біологічної може бути використаний, наприклад, до бібліотеки пептидів, тоді як чотири інші підходи придатні для бібліотек пептидів, непептидних олігомерів або малих молекул (Lam, Anticancer Drug Des. 12: 145, 1997). Про методи синтезу молекулярних бібліотек йдеться, наприклад, у: De Witt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909, 1993; Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37: 2678, 1994; Cho et al., Science 261: 1303, 1993; Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl 33: 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061, 1994; and Gallop et al., J. Med. Chem. 37: 1233, 1994. У деяких способах дослідними сполуками є активуючі варіанти тканинного фактору.

Бібліотеки сполук можна представляти у розчинах (наприклад, Houghten, Bio/Techniques 13: 412-421, 1992), гранулах (Lam, Nature 354: 82-84, 1991), уламках (Fodor, Nature 364: 555-556, 1993), бактеріях (патент США № 5,223,409), спорах (патенти США №№ 5,571,698, 5,403,484 та 5,223,409), плазмідах (Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869, 1992) або на фармах (Scott et al., Science 249: 386-390, 1990; Devlin, Science 249: 404-406, 1990; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382, 1990 та Felici, J. Mol. Biol. 222: 301-310, 1991).

Здатність дослідної сполуки інгібувати сигнальну активність тканинного фактору або його біологічно активної частини визначають, наприклад, контролюючи інгібування сигналізації тканинного фактору у відсутності коагуляційної активності у присутності дослідної сполуки. Здатність дослідної сполуки модулювати сигнальну активність тканинного фактору або його біологічно активної частини також визначають за здатністю тканинного фактору зв'язувати протеїндисульфідізомеразу. Аналізи на зв'язування проводять у клітині або поза клітиною.

Здатність сполуки інгібувати сигналізацію тканинного фактору при лікуванні новоутворень або запалень, не підвищуючи ризик кровотечі, визначають одним із відомих або описаних тут способів шляхом визначення прямого зв'язування. В одному з варіантів здатність сполуки інгібувати сигналізацію тканинного фактору при лікуванні новоутворень або запалень, не підвищуючи ризик кровотечі, визначають, спостерігаючи за сигналізацією тканинного фактору у кератиноцитах або ендотеліальних клітинах. Виявлення сигналізації тканинного фактору може полягати у виявленні експресії рекомбінатного тканинного фактору, який кодує детекторний маркер, такий як послідовність FLAG або люциферазу. Такий аналіз слугує доповненням до аналізу прямого зв'язування. У цілому такі аналізи використовуються для визначення здатності дослідної сполуки інгібувати сигналізацію тканинного фактору.

Як правило, здатність дослідної сполуки зв'язувати тканинний фактор, впливати на сигналізацію тканинного фактору порівнюють з контрольним зразком, зв'язування якого визначають у відсутності дослідної сполуки. У деяких випадках користуються завданою еталонною величиною. Така величина визначається для контрольного зразку, і тоді відхилення у дослідній сполуці від неї свідчать про те, що сполука зв'язує цільову молекулу (наприклад, тканинний фактор) або модулює спричинений тканинним фактором сигналінг PAR2 у присутності протеїндисульфідізомеразу. Еталонна величина також відображає обсяг зв'язування, досягнутий еталоном (наприклад, спорідненість антитіла до сигнального тканинного фактору). У такому випадку подібність дослідної сполуки (наприклад, рівний або менший обсяг зв'язування) до еталону свідчить про те, що це є сполука-кандидат (тобто вона зв'язується з сигнальним тканинним фактором у такому само або більшому ступені, ніж еталонне антитіло).

Далі цей винахід стосується нових агентів, що визначаються вищеописаними скрінінговими аналізами, та їх застосування при лікуванні хвороб за винаходом.

В одному з варіантів пропонується аналіз розчинного типу з використанням тканинного фактору або клітини чи тканини з експресією природного або рекомбінантного тканинного фактору. В іншому варіанті йдеться про високоефективний твердофазний аналіз *in vitro*, де тканинний фактор, тканинний фактор у відповідно модифікованій конформації для імітації клітинних сигнальних пулів, або його ліганд приєднується до твердофазного субстрату шляхом ковалентної або нековалентної взаємодії. Будь-який з описаних аналізів є придатним до високоефективної процедури скрінінгу.

У високоефективних розчинних або твердофазних аналізах за винаходом можливо просіювати по кілька тисяч різних модуляторів або лігандів за добу. Ця методика може використовуватися для аналізів протеїну тканинного фактору *in vitro* або для клітинно- чи мембраннобазованих аналізів що містять генний продукт або протеїн тканинного фактору. Зокрема, у кожній лунці мікротитровального планшета можна проводити окремий аналіз потенційного модулятора, або, якщо йдеться про різні концентрації або часи інкубування, можна виділяти на один модулятор 5-10 лунок. Отже, на стандартному мікротитровальному планшеті можна одночасно аналізувати біля 100 (точніше, 96) модуляторів. На планшеті з 1536 лунками аналізують від 100 до біля 1500 різних сполук. При використанні багатьох планшетів денна пропускна спроможність становитиме 6,000, 20,000, 50,000 й навіть більше 100,000 різних сполук завдяки такій інтегральній системі за винаходом.

При твердофазному аналізі цільовий протеїн або його фрагмент, наприклад, позаклітинний домен, або клітину чи мембрану, яка містить цільовий протеїн або його фрагмент у складі злитого протеїну, з'єднують прямо чи непрямо, ковалентно або нековалентно, з твердим субстратом, наприклад, через мітку. Міткою може бути будь-який компонент. Як правило, молекула, що зв'язує мітку, прикріплюється до твердої основи, а мічена цільова молекула з'єднується з твердою опорою шляхом взаємодії між міткою та молекулою, що її зв'язує.

Можна використовувати чимало міток та молекул, що їх зв'язують, на базі відомих з літератури взаємодій. Наприклад, у випадку коли мітка має природного партнера, що її зв'язує, наприклад, біотин, протеїн А або протеїн G, можна використовувати у відповідну молекулу, що зв'язує (авідин, стрептавідин, нейтравідин, сегмент Fc імуноглобуліну тощо) Антитіла до молекул з природними зв'язувальними сполуками, таких як біотин, також широко використовуються для зв'язування міток (див. каталог SIGMA Immunochemicals 1998, SIGMA, St. Louis MO).

Подібним чином будь-яка гаптенна або антигенна сполука у комбінації з відповідним антитілом може утворювати пару мітка/зв'язувальна сполука. Тисячі специфічних антитіл є у продажі, також ба-

гато описано у літературі. Наприклад, у поширеній конфігурації міткою слугує перше антитіло, а зв'язувальною сполукою - друге антитіло, яке розпізнає перше. Крім взаємодій антитіло-антиген, парами мітка-зв'язувальна сполука можуть слугувати взаємодії рецептор-ліганд. Наприклад, агоністи та антагоністи рецепторів клітинних мембран, як от такі рецептор-лігандні взаємодії можливі, серед їх елементів: дзвоноподібні рецептори, трансферин, с-набір, ліганди вірусних рецепторів, рецептори цитокіну, рецептори хемокіну, рецептори інтерлейкіну, рецептори імуноглобуліну та антитіла до нього, сімейство кадгерину, сімейство інтегрину, сімейство селектину тощо (наприклад, Pigott & Power, The Adhesion Molecule Facts Book I, 1993). Подібним чином токсини та отрути, вірусні епітопи, гормони (наприклад, опіати, стероїди тощо.), міжклітинні рецептори (наприклад, ті, що медіують дію різних малих лігандів, у тому числі стероїдів, тіреїдного гормону, ретиноїдів та вітаміну D; пептиди), ліки, лектини, сахари, нуклеїнові кислоти (у лінійних та циклічних полімерних конфігураціях), олігосахариди, протеїни, фосфоліпіди та антитіла здатні взаємодіяти з різними клітинними рецепторами.

Синтетичні полімери (поліуретани, поліефіри, полікарбонати, полісечовина, поліаміди, поліетиленіміни, поліарилсульфиди, полісилоксани, полііміди та поліацетати) також можуть бути мітками або зв'язувати мітки. Багато інших пар мітка/молекула, що її зв'язує придатні у системах аналізу за винаходом описаним тут, вони відомі фахівцям в цій галузі.

Звичайні зшивальні агенти - пептиди, поліефіри тощо - також можуть бути мітками і включати поліпептидні послідовності, наприклад, поліглікопослідовності від 5 до 200 амінокислот. Такі гнучкі зшивальні агенти добре відомі фахівцям. Наприклад, поліетиленглікольні лінкери випускає фірма Shearwater Polymers, Inc. у Гантсвілі, штат Алабама. Ці лінкери можуть мати амідні, сульфгідрильні або гетерофункціональні групи зчеплення.

Сполуки, що зв'язують мітки, прикріплюються до твердих субстратів будь-яким відомих чином. Тверді субстрати, як правило, піддають дериватизації або функціоналізації повною або частковою обробкою реагентом, який фіксує хімічну групу на поверхні, що реагує з частиною сполуки, яка зв'язує мітки. Наприклад, для прикріплення до дільниці довшого ланцюга придатні аміни, гідроксильні, тіоли та карбоксильні групи. Аміноалкілсилани та гідроксіалкілсилани функціоналізують численні поверхні, наприклад, скляні. Побудова таких твердофазних біополімерів описана у літературі (наприклад, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154, 1963 (опис твердофазного синтезу, наприклад, пептидів); Geysen et al, J. Immun. Meth. 102: 259-274, 1987 (опис синтезу твердофазних компонентів на шпильках); Frank & Doring, Tetrahedron 44: 6031-6040, 1988 (опис синтезу різних пептидних послідовностей на целюлозних дисках); Fodor et al, Science 251: 161-111, 1991; Sheldon et al, Clinical Chemistry 39: 718-719, 1993; Kozal et al, Nature Medicine 2: 753-759, 1996 (усі описують масиви біополімерів на твердих субстратах). Сполу-



ки, що зв'язують мітки, прикріплюють до субстратів також нехімічними способами - нагріванням, зшиванням під дією УФ опромінювання тощо.

Біспецифічні сполуки як модулятори сигналіну тканинного фактору

Запропоновано спосіб виявлення кандидатурних біспецифічних дослідних сполук, які знижують концентрацію агента у сироватці та/або кровообігу тварин, крім людей. Сполуки, відібрані або оптимізовані представленими за винаходом методами, можуть використовуватися для лікування пацієнтів, котрим буде корисне введення цих сполук, наприклад, людей.

Кандидатурні сполуки, що можуть випробуватися у методиках за винаходом, є біспецифічними молекулами. "Біспецифічною сполукою" є, та що має дві різні специфічності зв'язування, наприклад, біспецифічні антитіла, гетерополімери та гетерополімери на основі антигенів.

Біспецифічні молекули за винаходом переважно містять зв'язувальну частину, специфічну для тканинного фактору, протеїндисульфідізомерази або PAR2, переважно для людських тканинного фактору, протеїндисульфідізомерази або PAR2, зшити з другою зв'язувальною частиною, специфічною для цільового агента (наприклад, певного антитіла або антигена). Серед прикладів зв'язувальних частин, специфічних до тканинного фактору, можна навести ліганди тканинного фактору - переважно антитіла до сигналіну тканинного фактору. Антитіло може бути інгібітором сигналізації тканинного фактору у ссавців, який не впливає на гемостаз.

В іншому варіанті нові молекули, що зв'язують тканинний фактор, можна виявити за їх здатністю зв'язувати тканинний фактор та інгібувати сигналіну тканинного фактору. Наприклад, бібліотеки сполук або малих молекул можна піддати аналізу на зв'язування в безклітинній системі. Будь-яку кількість дослідних сполук, наприклад пептидоміметики, малі молекули або інші препарати, можна використовувати для тестування та одержати одним з багатьох відомих підходів комбінаторних бібліотек, включаючи біологічні бібліотеки; бібліотеки паралельних розчинних чи твердофазних аналізів з об'ємною адресацією; синтетичні бібліотеки, що потребують зворотного скручування; бібліотеки за принципом "одна гранула- одна сполука" та синтетичні бібліотеки з використанням афінної хроматографії для відбору. Біологічна бібліотека обмежується бібліотеками пептидів, тоді як чотири інші підходи придатні для бібліотек пептидів, непептидних олігомерів або малих молекул (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12: 145, 1997).

У багатьох програмах відбору ліків котрі тестують бібліотеки модулюючих агентів та природні екстракти потрібні високоефективні аналізи, щоб швидко пропустити якомога більше сполук. Часто як первинним аналізам віддають перевагу аналізам на безклітинних системах, що можуть бути отримані з очищених та напівочищених протеїнів, бо вони дозволяють швидко спостерігати розвиток подій та відносно легко виявляти зміни у цільовій молекулі, медійовані дослідним модулювальним агентом. Більш того, вплив токсичності на клітини

та/або біотолерантності дослідного модулювального агента, як правило, можна ігнорувати у системі *in vitro*, зосереджуючи аналіз на дії препарату на цільовій молекулі, що виявляється у зміні зв'язувальної спорідненості з елементами, які передують або йдуть після цільової молекули в сигнальному ланцюзі.

В іншому варіанті для виявлення нових зв'язуючих тканинний фактор молекул використовують відомий прийом фагового дисплею. В одному з варіантів винахід дозволяє проводити скрінінг кандидатурних або тестованих сполук, що зв'язуються з тканинним фактором чи його біологічно активною ділянкою. Клітинні аналізи для виявлення молекул, що зв'язують тканинний фактор, дозволяють знайти додаткові агенти, здатні діяти як біспецифічні сполуки за винаходом. Наприклад, експресований в клітинах тканинний фактор можна використовувати у скрінінговому аналізі. Наприклад, можна виявляти сполуки, що дають статистично значущі зміни показників зв'язування з тканинним фактором.

Ще в одному варіанті безклітинного аналізу молекулу, що зв'язує тканинний фактор, виявляють за здатністю зв'язувати протеїн тканинного фактору *in vitro*. Молекулу, що зв'язує протеїн тканинного фактору, можна знайти і здатність протеїну зв'язувати білок тканинного фактору випробувати відомими методами визначення прямого зв'язування. Здатність протеїну зв'язувати цільову молекулу визначають, зокрема, аналізом біомолекулярної взаємодії у реальному масштабі часу (BIA) (Sjolander et al., *Anal. Chem.* 63: 2338-2345, 1991, та Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705, 1995). "BIA" - це технологія вивчення біоспецифічних взаємодій у реальному часі без застосування міток (наприклад, BIAcore). Зміни в оптичному явищі - поверхневому плазмонному резонансі (SPR) - слугують ознакою реакцій, що відбуваються між біологічними молекулами у реальному часі.

Безклітинні аналізи за винаходом придатні як для розчинних, так і мембранно зв'язаних форм протеїнів. У разі мембранно зв'язаних форм протеїнів доцільно використовувати солюбілізатор, щоб утримувати мембранно зв'язану форму протеїну у розчині. До таких солюбілізаторів належать неіонні детергенти, як от *n*-октилглюкозид, *n*-додецилглюкозид, *n*-додецилмальтозид, октаноїл-N-метилглюкамід, деканоїл-N-метилглюкамід, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, ізотридециполі(ефір етилен гліколю)<sub>n</sub>, 3-[(3-холамідопропил)діметиламін]-1-пропансульфонат (CHAPS), 3-[(3-холамідопропил)діметиламін]-2-гідрокси-1-пропансульфонат (CHAPSO), або N-додецил-N,N-діметил-3-амоній-1-пропансульфонат.

Відомі методи аналізу, які дозволяють виявити взаємодії між протеїнами (наприклад, імунопреципітація, двугібридний аналіз тощо). При постановці таких аналізів у присутності дослідних сполук або без них можна виявити сполуки, що модулюють (наприклад, інгібують або підсилюють) взаємодію протеїнів за винаходом з цільовими молекулами.

Здатність протеїну зв'язуватися або взаємодіяти з цільовою молекулою можна визначити, наприклад, прямим зв'язуванням. При аналізі прямого зв'язування протеїн можна помітити радіоізотопом або ферментом таким чином, що ознакою зв'язування протешу з цільовою молекулою стане виявлення міченого протеїну у комплексі. Наприклад, протеші можна прямо або непрямо мітити  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  або  $^3\text{H}$ , а радіоізотоп виявляти підрахунком радіовипромінювання або лічильником сцинтиляцій. Або ж молекулу можна помітити ферментом - пероксидазою з хрому, лужною фосфатазою або люциферазою, а ферментну мітку визначити за ступнем перетворення відповідного субстрату на продукт.

Звичайно доцільно іммобілізувати або протеїн за винаходом, або той, що його зв'язує, щоб полегшити відокремлення комплексу від некомплексованих форм того чи іншого протеїну, а також автоматизувати аналіз. Зв'язування з попереднім чи наступним елементом сигнального ланцюга у присутності кандидатурної сполуки або без виконують у будь-якому суді, придатному для реагентів - мікротитрувальному планшеті, пробірці або мікроцентрифугі. В одному з варіантів бере участь злитий протеїн, який додає домен, що дозволяє протеїну зв'язатися з матрицею. Наприклад, злиті протеїни глутатіон-S-трансферази (GST) з тканинним фактором адсорбуються на гранулах глутатіонсефарози (фірми Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) або на дериватизованих від глутатіону мікротитрувальних планшетах, які потім комбінують з лізатами клітини, наприклад, міченими  $^{35}\text{S}$ , та модульовальним агентом, і суміш інкубують за умов, що сприяють утворенню комплексу, наприклад, за фізіологічних умов стосовно солі та pH, хоча ці умови можна зробити трохи жорсткішими. Після інкубації гранули відмивають від незв'язаної мітки, а іммобілізовану на матриці радіоактивну мітку визначають або прямо (наприклад, вміщують гранули до сцинтилянту), або у супернатанті після дисоціації комплексів. Або ж комплекси дисоціюють від матриці, розділяють за допомогою SDS-PAGE (та електрофорезу у поліакриламідному гелі з дедecilсульфатом натрію) та визначають рівень зв'язуваного тканинний фактор протеїну у гранульованій фракції, обрахований за стандартними електрофорезними методами.

При аналізі можна використовувати інші прийоми іммобілізації протеїнів на матрицях. Наприклад, можна одержувати біотиновані молекули з комплексу біотин-NHS (N-гідроксисукцинімід) відомим способом (наприклад, біотинувальний набір фірми Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) та іммобілізувати його у лунках покритого стрептавідином 96-лункового планшета (фірми Pierce Chemical).

Також у рамках винаходу можливо визначати здатність сполуки модулювати взаємодію між тканинним фактором та протеїндисульфідізомеразою або тканинним фактором та PAR2, не вдаючись до мічення реагентів. Наприклад, мікрофізіометром можна визначати взаємодію протеїну за винаходом з його цільовою молекулою без міток ані на протеїні, ані на цільовій молекулі (McConnell et al, Science 257: 1906-1912, 1992). Використане слово

"мікрофізіометр" (наприклад, Cytosensor) - це аналітичний прилад, який вимірює швидкість закислення клітиною свого оточення за допомогою світлоадресованого потенціометра (LAPS). Зміни швидкості закислення характеризують взаємодію між сполукою та рецептором.

Гетерополімери на антигенній основі, які можуть випробуватися за цим винаходом, переважно містять зв'язувальну частину, яка є специфічною до тканинного фактору, зокрема, людського тканинного фактору, зшити з антигеном, який розпізнається аутоантитілом. Антигеном, який розпізнається аутоантитілом, може бути, зокрема, фактор VIII (антитіла, пов'язані з лікуванням гемофілії шляхом заміни рекомбінантного фактору VIII); м'язовий рецептор ацетилхоліну (антитіла, пов'язані з міастенією); кардіоліпін (пов'язаний з вовчаком); протеїни, пов'язані з тромбоцитами (пов'язані з ідіопатичною тромбоцитопенією); численні антигени, пов'язані з синдромом Шьогрена; антигени, що виникають при аутоімунних реакціях на пересадку тканин; антигени серцевого м'язу (пов'язані з аутоімунним міокардитом); антигени, пов'язані з медіюваним імунним комплексом захворюванням нирок; антигени dsДНК та ssДНК (пов'язані з люпус-нефритом); десмоглеїни та десмоплакани (пов'язані з пухирчаткою та пемфігоїдом); та будь-які інші антигени, які чітко характеризуються та пов'язані з патогенезом хвороби.

Типові гетерополімери та гетерополімери на антигенній основі, придатні для використання у цьому винаході, та способи їх одержання добре відомі. Наприклад, типові гетерополімери описані у таких джерелах: WO 03007971A1; U.S. 20020103343A1; патент США № 5,879,679; патент США № 5,487,890; патент США № 5,470,570; WO 9522977A1; WO/02075275 A3, WO/0246208A2 or A3, WO/0180883A1, WO/0145669A1, WO 9205801 A1, Lindorfer et al., J. Immunol. Methods. 248: 125, 2001; Hahn et al., J. Immunol 166: 1057, 2001; Nardin et al., J. Immunol Methods. 211: 21, 1998; Kuhn et al., J. Immunol. 160: 5088, 1998; Taylor et al., Cancer Immunol. Immunother. 45: 152, 1997; Taylor et al., J. Immunol. 159: 4035, 1997; та Taylor et al., J. Immunol 148: 2462, 1992. Крім того, можна одержувати варіантні форми таких гетерополімерів. Наприклад, можна одержувати форми біспецифічних молекул, вдаючись до різних методик зшивання. Для зшивання компонентів біспецифічної молекули можна використовувати, наприклад, поліетиленгліколь, SATA, SMCC та інші відомі реагенти, що їх випускає фірма Pierce Biotechnology. Приклади придатних для випробування форм біспецифічних молекул наведені у заявці США № 60/411,731 від 16 вересня 2002, зміст якої включений до цієї заявки як посилальний матеріал.

В іншому варіанті готують різні мультимерні форми біспецифічних молекул (наприклад, димери, тримери, тетрамери, пентамери або вищі мультимери). Або випробують очищені форми біспецифічних молекул, наприклад, за заявкою США № 60/380,211 від 13 травня 2002, зміст якої включений до цієї заявки як посилальний матеріал.

Якщо однією із зв'язувальних частин гетерополімеру є антитіло, можна вживати антитіла різ-

них ізотипів (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (наприклад, IgG2a), IgG3, IgG4 або IgM). Або ж однією із зв'язувальних частин можуть бути частини молекули антитіла (наприклад Fab фрагменти). У переважному варіанті однією із зв'язувальних частин є антитіло, що містить Fc домен. Це може бути мишаче антитіло.

Також можна випробувати вплив модифікацій на антитіла, наприклад, вплив деімунізації на антитіло, як описано у заявці США № 60/458,869 від 28 березня 2003.

Згідно з винаходом можливо зменшувати концентрацію агента, наприклад, патогенного агента, у сироватці, кровообігу та/або тканинах тварини, крім людини, принаймні на, наприклад, біля 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% або біля 100%.

Також можливе непряме вимірювання концентрації агента у сироватці, кровообігу та/або тканинах хворого. Наприклад, патологію внаслідок присутності агента у сироватці та/або кровообігу можна виміряти, вивченням зразків тканини від тварини. Інший спосіб непрямого вимірювання концентрації агента у сироватці, кровообігу та/або тканинах тварини, крім людини, полягає у визначенні здатності агента спричинювати інфекцію у тварини, крім людини. Наприклад, можна вимірювати вплив біспецифічної сполуки на клінічні прояви та симптоми інфекції. Здатність біспецифічної сполуки інгібувати поширення інфекції, наприклад, від системи одного органу до іншого або від одного хворого до іншого також можна виміряти.

В іншому варіанті вимірюють здатність біспецифічної сполуки зв'язувати клітини, що несуть тканинний фактор, у тварин, крім людини. Наприклад, в одному варіанті здатність біспецифічної сполуки зв'язувати цільову молекулу тканинного фактору визначають аналізом біомолекулярної взаємодії у реальному масштабі часу (BIA) (Sjolander et al., Anal. Chem. 63: 2338-2345, 1991 and Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705, 1995). "BIA" - це технологія вивчення біоспецифічних взаємодій у реальному масштабі часу без застосування міток (наприклад, BIAcore). Зміни в оптичному явищі - поверхнево-плазмонному резонансі (SPR) - слугують ознакою реакцій, що відбуваються між біологічними молекулами у реальному масштабі часу.

Або ж вимірюють руйнування агента клітинами у тварин, крім людини (наприклад, знищення макрофагами).

Сполуки, що зменшують концентрацію агента у сироватці та/або кровообігу тварин, крім людини (у порівнянні з концентраціями у тварин, крім людини, які не одержували біспецифічну сполуку), можуть бути відібрані.

Сполуки для тестування в аналізах хворого можна вибирати з багатьох випробуваних. Так, біспецифічні сполуки для випробування в експрес-аналізах можуть вже довести свою здатність зв'язувати тканинний фактор, наприклад, в аналізі *in vitro* й можуть проходити подальшу оцінку або оптимізацію в експрес-аналізі. У таких випадках здатність біспецифічної сполуки зменшувати концентрацію агента у сироватці та/або кровообігу можна

порівнювати з іншою біспецифічною сполукою або з неоптимізованою версією тієї самої сполуки, визначаючи здатність біспецифічної сполуки зменшувати концентрацію агента у сироватці та/або кровообігу.

У переважних варіантах здійснення біспецифічної сполуки за винаходом вводять у концентраціях, що становлять від приблизно 1 мкг сполуки / кг маси тіла до приблизно 100 мкг сполуки / кг маси тіла. У цьому винаході терапевтично діюва кількість біспецифічної сполуки (тобто ефективна доза) становить від біля 0.01 до 5000 мкг сполуки / кг маси тіла, бажано, від 0.1 до 500 мкг сполуки / кг маси тіла, краще, від 2 до 80 мкг сполуки / кг маси тіла, ще більш бажано від біля 5 до 70 мкг сполуки / кг маси тіла, від 10 до 60 мкг сполуки / кг маси тіла, від 20 до 50 мкг сполуки / кг маси тіла, від 24 до 41 мкг сполуки / кг маси тіла, від 25 до мкг сполуки / кг маси тіла, 40 мкг сполуки / кг маси тіла, від 26 до 39 мкг сполуки / кг маси тіла, від 27 до 38 мкг сполуки / кг маси тіла, від 28 до 37 мкг сполуки / кг маси тіла, від 29 до 36 мкг сполуки / кг маси тіла, від 30 до 35 мкг сполуки / кг маси тіла, від 31 до 34 мкг сполуки / кг маси тіла або від 32 до 33 мкг сполуки / кг маси тіла. Фахівцеві відомо що різні фактори можуть впливати на дозування, потрібне для ефективного лікування хворого, у тому числі важкість хвороби або розладу, попереднє лікування, загальний стан здоров'я та/або вік хворого й наявність інших хвороб. Більш того, лікування хворого терапевтично ефективними дозами протеїну, поліпептиду або антитіла може займати один або кілька курсів.

У переважному варіанті лікувальна доза біспецифічної сполуки для тварини становить від біля 1 до 500 мкг/кг маси тіла при внутрішньовенному (iv) введенні агента. Ефективну дозу біспецифічної сполуки можна зменшувати або збільшувати протягом курсу лікування. Зміна дозування витікає з результатів вищеописаних діагностичних аналізів.

Дослідні сполуки та/або агенти можна вводити до кровообігу хворого внутрішньовенно (iv). Можливі інші шляхи, зокрема, топікальний, парентеральний, підшкірний або інгаляційний. Термін "парентеральний" охоплює підшкірні, внутрішньовенні або внутрішньом'язові ін'єкції, а також локалізоване введення, наприклад, у місці хвороби або травми. Відоме також уповільнене виділення сполук з імплантатів. Фахівцеві зрозуміло, що лікувальні дози можуть розрізнятися у залежності від таких факторів, як природа розладу, маса тіла хворого, вік, загальний стан здоров'я та шлях введення. Попередньо дози встановлюють шляхом випробувань на тваринах, а їх пристосування до людського організму здійснюється за встановленою практикою.

Кандидатурні сполуки та агенти вводять тваринам у певному інтервалі доз. Якщо вводиться також і агент, сполуку-кандидат можна вводити одночасно, до або після введення агента.

Трансгенні тварини з експресією тканинного фактору за винаходом, наприклад, миші можуть слугувати для відсіву та оцінки кандидатурних сполук на здатність лікування розладів чи хвороб у

людей, пов'язаних з наявністю небажаних агентів у сироватці та/або кровообігу хворого, як аутоантитіла, інфекційні агенти або токсини.

До цільових агентів, що їх можуть зв'язувати біспецифічні сполуки за винаходом, належать присутні у крові агенти, зокрема, віруси, пухлинні клітини, клітини запалювального інфільтрату, полінуклеотиди, антитіла, наприклад аутоантитіла, пов'язані з аутоімунним розладом.

В одному з варіантів здійснення аналізу за винаходом агент вводять трансгенній тварині одночасно, до або після введення біспецифічної сполуки.

Біспецифічні сполуки за винаходом або їх частини можна модифікувати для подовження періоду напіврозкладу. Аналоги пептидів вживають у фармацевтичній промисловості як непептидні ліки, властивості яких аналогічні властивостям шаблонних пептидів. Ці типи непептидних сполук називають "пептидоміметиками" (Fauchere, Adv. Drug Res. 15: 29, 1986; Veber et al., TINS p.392, 1985; та Evans et al., J. Med. Chem 30: 1229, 1987, включені сюди як посилальний матеріал) й розробляють шляхом машинного моделювання молекул. Пептидоміметики, схожі за структурою до терапевтично корисних пептидів, чинять аналогічну лікувальну або профілактичну дію. Зазвичай пептидоміметики є схожі за структурою до парадигмального поліпептиду (тобто поліпептиду, який виявляє біологічну або фармацевтичну активність), як от антигенний поліпептид, але один або кілька пептидних зв'язків у них можуть бути заміщені зв'язком, обраним з-поміж:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (цис і транс),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  та  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , відомими способами, як описано у наступних джерелах: Spatola, A. F., in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267, 1983; Spatola, A. F., Vega Data, Vol. 1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications," 1983; Morley, Trends. Pharm. Sci. pp.463-468, 1980; Hudson et al., Int. J. Pept. Prot. Res. 14: 177-185, 1979

( $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); Spatola et al., Life. Sci. 38: 1243-1249, 1986 ( $-\text{CH}_2\text{S}-$ ); Hann, J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1: 307-314, 1982 ( $-\text{CH}-\text{CH}-$ , цис і транс); Almquist et al., J. Med. Chem. 23: 1392-1398, 1980 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Jennings-White et al., Tetrahedron Lett. 23:2533, 1982

( $-\text{COCH}_2-$ ); Szelke et al., Європейська заявка № EP 45665 CA: 97: 39405, 1982 ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); Holladay et al., Tetrahedron. Lett. 24: 4401-4404, 1983 ( $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); та Hruby, Life Sci. 31: 189-199, 1982 ( $-\text{CH}_2\text{S}-$ ); усі включені сюди як посилальний матеріал. Переважним непептидним зв'язком є  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ . Ці пептидоміметики мають певні переваги перед поліпептидними варіантами, наприклад: меншу вартість одержання, кращу хімічну стабільність, кращі фармакологічні властивості (період напіврозкладу, засвоюваність, потужність, ефективність тощо), змінену специфічність (наприклад, розширений спектр біологічної активності), меншу антигенність тощо. Пептидоміметики ковалентно зв'язуються з однією або кількома мітками, прямо або крізь спейсер (наприклад, амідну групу), у не-

критичних позиціях на пептидоміметики, які можна прогнозувати з даних про кількісну структурну активність та/або шляхом молекулярного моделювання. Такі некритичні позиції не вступають до прямого контакту з макромолекулами, до яких зв'язується пептидоміметик для лікувальної дії. Дериватизація (наприклад, мічення) пептидоміметика суттєво не впливає на його корисну біологічну або фармакологічну дію.

Систематичним заміщенням однієї або кількох амінокислот або послідовності D-амінокислотою того само типу (наприклад, D-лізином замість L-лізину) використовується для створення більш стабільних пептидів. Крім того, можна одержувати відомими способами конформаційно обмежені пептиди (Rizo et al., Annu. Rev. Biochem. 61: 387, 1992, включено до опису як посилальний матеріал); наприклад, шляхом додання внутрішніх цистеїнових залишків, здатних утворювати внутрішньомолекулярні дісульфідні містки, що циклізують пептид.

Такі модифіковані поліпептиди можна одержувати у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяях. Або ж такі пептиди можна синтезувати хімічним шляхом. Способи експресії чужорідних поліпептидів у рекомбінантних хазяїнах, хімічного синтезу поліпептидів та трансляції *in vitro* добре відомі й описані у Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Berger et al., Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 91: 501, 1969; Chaiken, CRC Crit. Rev. Biochem. 11: 255, 1981; Kaiser et al, Science 243: 187, 1989; Merrifield, Science 232: 342, 1986; Kent, Annu. Rev. Biochem. 57: 957, 1988; та Offord, Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing, 1980, які включені до опису як посилальний матеріал).

Поліпептиди можна одержувати прямим хімічним синтезом та використовувати як зв'язувальну частину гетерополімеру. Модифіковані поліпептиди можуть мати непептидну частину, ковалентно приєднану до N-закінчення та/або C-закінчення. У певних переважних варіантах карбоксизакінчення чи амінозакінчення, або обидва, є хімічно модифіковані. Найчастіше аміно- та карбоксильні групи закінчень модифікують ацетилюванням та амідуюванням відповідно. Модифікації амінозакінчень, як ацилювання (наприклад, ацетилювання) або алкілювання (наприклад, метилювання) й модифікації карбоксизакінчень, як от амідуювання, та інші модифікації закінчень, у том числі циклізацію, можна включати до різних варіантів дослідних сполук. Певні модифікації карбоксизакінчень, та/або амінозакінчень, та/або продовження пептидів до ядерних послідовностей можуть надавати певних корисних фізичних, хімічних, біохімічних та фармакологічних властивостей, як от: підвищену стабільність, збільшену потужність та/або ефективність, стійкість до протеаз сироватки, бажаних фармакокінетичних властивостей тощо.

Детектовні мітки

Мітку групи, що застосовується в аналізі, можна визначити спектроскопічними, фотохімічними,

біохімічними, імунохімічними, електричними, оптичними або хімічними засобами. Той чи інший вид мітки не має суттєвого значення за винаходом, якщо не впливає на специфічне зв'язування антитіла із сигнальним тканинним фактором, наприклад, Mab 10H10, що застосовується в аналізі. Такі детектовні мітки широко застосовуються у хімічному або імуноаналізі, і майже всі вони можуть знайти використання у цьому винаході. Мітка - це будь-яка сполука, яку можна виявити спектроскопічними, фотохімічними, біохімічними, імунохімічними, електричними, оптичними або хімічними засобами. У винаході можуть використовуватися магнітні мітки (наприклад, Dynabeads™), флуоресцентні фарбники (наприклад, флуоресцеїнізотіоціанат, техаський червоний, родамін тощо), радіоізотопи (наприклад,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), інші агенти, що створюють відповідне зображення, наприклад, мікропухирці (для ультразвукового зображення),  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$  (для позитронної томографії),  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  (для однофотонної томографії), ферменти (наприклад, пероксидаза з хрому, лужна фосфатаза та інші, що їх застосовують у твердофазному імуноферментному аналізі ELISA), колориметричні мітки, як от колоїдне золото та гранули з кольорового скла чи пластику (наприклад, полістиролу, поліпропілену, латексу тощо). Застосування цих міток описується у патентах США №№ 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241 (усі включені до опису як посиловальний матеріал). Див. також Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6<sup>th</sup> Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.).

Мітку можна зв'язувати прямо чи непрямо з потрібним компонентом відомими прийомами. Як зазначено вище, мітки бувають різноманітні, їх вибір залежить від потрібної чутливості, зручності кон'югації із сполукою, стабільності, наявних приладів та можливостей видалення залишків аналізу.

Нерадіоактивні мітки часто приєднують непрямым шляхом. Як правило, молекула ліганду (наприклад, біотину) зв'язується з молекулою ковалентно. Далі ліганд зв'язується до іншої молекули (наприклад, стрептавідину), яка або сама є помітною, або ковалентно зв'язана з сигнальною системою - помітним ферментом, флуоресцентною або люмінесцентною сполукою. Ліганди та їх цілі можна будь-яким чином комбінувати з антитілами, що розпізнають тканинний фактор, або вторинними антитілами, що розпізнають антитіла до тканинного фактору.

Молекули можна також прямо кон'югувати з сигнальними сполуками, наприклад, ферментом чи флуорофором. Мітками можуть слугувати такі ферменти, як гідролази, особливо фосфатази, естерази та глікозидази, а також оксидотизи, особливо пероксидази. До флуоресцентних сполук належать флуоресцеїн та його похідні, родамін та його похідні, дансил, умбеліферон тощо. З хемілюмінесцентних сполук можна назвати люциферин та 2,3-дігідрофталазиндіони, як от люмінол. Огляд різних міткових або сигнальних систем див. патент США № 4,391,904.

Засоби знаходження міток добре відомі фахівцям. Наприклад, радіоактивні мітки виявляють лічильником сцинтиляцій або на фотоплівці методом радіоавтографії. Флуоресцентна мітка виявляється збудженням люмінофору на відповідній хвилі та визначенням одержаної флуоресценції. Флуоресценцію визначають візуально, за допомогою електронних детекторів - приладів із зарядовим зв'язком (CCD), фотопомножувачів тощо. Ферментні мітки можна виявити за допомогою відповідних субстратів для ферменту та знаходження відповідного продукту реакції. Нарешті, прості колориметричні мітки визначаються просто за кольором, пов'язаним з міткою. Так, у різних аналізах із щупами кон'юговане золото виглядає рожевим, а кон'юговані гранули показують власний колір.

При деяких аналізах мітки взагалі не потрібні. Наприклад, реакція аглютинації виявляє цільові антитіла. Покриті антигеном частки аглютинуються зразками, що містять цільові антитіла. У цьому формі мітити компоненти не треба, бо наявність цільового антитіла виявляється візуально.

Часто клітинний маркер та антитіла до нього мітять ковалентним або нековалентним з'єднуванням з речовиною, яка дає помітний сигнал.

#### Аналітичні набори

Обсяг винаходу також охоплює аналітичні набори, що можуть містити наступні сполуки: моноклональні антитіла, антитіла людських послідовностей, людські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антисенсові олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA(short hairpin) за винаходом, та інструкції з їх застосування. Набір може також містити принаймні один додатковий реагент, або одне чи кілька додаткових людських антитіл за винаходом (наприклад, людське антитіло з комплементарною активністю, яке зв'язується з іншим епітопом антигена, ніж перше людське антитіло). Набори звичайно мають ярлик, де зазначається застосування їх вмісту. Ярлик - це будь-який друкований або записаний матеріал, що додається до набору або іншим чином супроводжує набір.

#### Фармацевтичні композиції

Лікувальні композиції (наприклад, моноклональні антитіла, антитіла людських послідовностей, людські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антисенсові олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA(small interfering)) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA), є придатні для композицій та методів введення хворій людині самі по собі, у вигляді стереоізомерів, прекурсорів, фармацевтично прийнятних солей, гідратів, сольватів, гідратів кислих солей, N-оксидів або ізоморфних кристалічних форм, або ж у вигляді фармацевтичних композицій, де сполука є змішана з відповідними носі-

ями або наповнювачами у терапевтично діювій кількості проти, наприклад, раку або метастазів раку.

Фармацевтично прийнятні носії визначаються як складом самої композиції, так і способом її введення до організму. Відповідно існує величезна кількість придатних складів фармацевтичних композицій для введення лікувальних антитіл у сполученні з композиціями проти пухлинних клітин, або малих молекул, або лігандів (наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 18<sup>th</sup> ed., 1990, включений сюди як посилальний матеріал). Фармацевтичні композиції, як правило, містять відмінно експресований протеїн, агоніст чи антагоніст у формі, придатній для введення хворому. Фармацевтичні композиції складають як стерильні, по суті ізотонічні та у повній відповідності до правил Догрої виробничої практики (GMP) Управління з ліків та харчових продуктів США.

#### Режими лікування

Винахід пропонує фармацевтичні композиції у складі однієї або кількох композицій (наприклад, моноклональні антитіла, антитіла людських послідовностей, людські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антизмістовні олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA, які специфічно зв'язують сигнальний тканинний фактор у новоутворених пухлинних клітинах або запалювальних клітинах, разом із фармацевтично прийнятним носієм. Деякі композиції являють собою комбінації багатьох (наприклад, двох чи більше) антитіл або лікувальних малих молекул.

Профілактичні фармацевтичні композиції або лікарські засоби вводять хворим, які схильні або іншим чином ризикують одержати хворобу або стан (тобто імунну хворобу), у кількості, достатній для зменшення або усунення ризику, пом'якшити симптоми або віддалити появу хвороби, включаючи біохімічні, гістологічні та/або поведінкові симптоми хвороби, її ускладнення та проміжні патологічні фенотипи, прояви яких мають місце при розвитку хвороби. Терапевтичні композиції або лікарські засоби вводять хворим, які підозрюються або вже одержали таку хворобу, у кількості, достатній для усунення або принаймні часткового припинення біохімічних, гістологічних та/або поведінкових симптомів, включаючи ускладнення та проміжні патологічні фенотипи, прояви яких мають місце при розвитку хвороби. Кількість, достатня для досягнення терапевтичного або профілактичного ефекту, вважається терапевтично або профілактично ефективною дозою. У терапевтичному або профілактичному режимі звичайно вводять кілька доз до досягнення потрібної імунної реакції. Імунну реакцію відслідковують і вводять повторні дози, якщо імунна реакція починає згасати.

#### Ефективні дози

Ефективні дози фармацевтичних композицій які можуть містити: моноклональні антитіла, анти-

тіла людських послідовностей, людські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антизмістовні олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA, які інгібують сигналізацію тканинного фактору, або інші інгібітори тканинного фактору, наприклад, інгібітори малі молекули, для лікування новоутворень або запалень, що описані тут, розрізняються у залежності від багатьох факторів, як от шляхів введення, цільового сайту, фізіологічного стану хворого, виду хворого (людина чи тварина), прийому інших ліків та характеру прийому (профілактика або лікування). Звичайно хворим є людина, але можна лікувати й інших ссавців, у тому числі трансгенних. Для оптимізації безпечності та ефективності лікувальні дози треба піддавати аналізу.

Доза лікувальної композиції з антитіл або малих молекул становить від біля 0.0001 до 100 мг/кг, зокрема, від 0.01 до 5 мг/кг маси тіла хворого. Наприклад, дози можуть становити від 1 мг/кг маси тіла до 10 мг/кг маси тіла, тобто у діапазоні 1-10 мг/кг маси тіла. Вводити ліки можна раз на два тижні, або раз на місяць, або кожні 3-6 місяців. У деяких методиках одночасно вводять дві або більше лікувальні композиції антитіл або малих молекул з різною цільовою специфічністю; у таких випадках доза кожної композиції антитіл або малих молекул знаходиться у зазначених межах. Лікувальну композицію антитіл або малих молекул звичайно вводять багаторазово. Проміжки між прийомами окремих доз можуть вимірюватися тижнями, місяцями або роками. Вони можуть бути нерегулярними у залежності від показників рівня лікувальної композиції антитіл або малих молекул у крові хворого. У деяких методиках дозу регулюють так, щоб концентрація композиції антитіл або малих молекул у плазмі була у межах 1-1000 мкг/л, в інших випадках 25-300 мкг/л. Або ж можна вводити композицію антитіл або малих молекул уповільненого виділення, тоді частота прийому зменшується. Розмір дози та частота прийому залежать від періоду напіврозкладу лікувальної композиції антитіл або малих молекул в організмі хворого. Також має значення, йдеться про профілактику чи про лікування. Профілактична композиція вводиться відносно малими дозами з відносно великими інтервалами протягом тривалого часу. Деякі хворі приймають ліки до кінця життя. Лікувальні композиції вводяться відносно великими дозами досить часто, доки не буде зупинено або уповільнено розвиток хвороби, а переважно до повного або часткового усунення симптомів хвороби. Після того хворого можна переводити на профілактичний режим.

Дози для лікувальної сполуки антитіл або малих молекул коливаються у межах від 10 нг до 1 г, 100 нг - 100 мг, 1 мкг - 10 мг або 30-300 мкг у залежності від хворого.

#### Шляхи введення

Лікувальні сполуки (наприклад, моноклональні антитіла, антитіла людських послідовностей, люд-

ські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антизмистовні олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA) для лікування новоутворень або запалень можна вводити парентерально, топікально, внутрішньовенно, орально, підшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочерепно, внутрішньочеревно, внутрішньоназально або внутрішньом'язово, а при профілактиці також шляхом інгаляції, для націлювання лікувальних композицій антитіл або малих молекул на новоутворення чи запалення, та/або для загальної терапії. Найчастіше імуногенні агенти вводять підшкірно, хоча інші шляхи також є можливими. Другий за поширеністю шлях - це внутрішньом'язові ін'єкції, переважно у руку або у ногу. У деяких методиках агенти впорскують прямо до тканини, де виявлена пухлина, наприклад, внутрішньочерепною ін'єкцією або з розрахунком на конвекційну доставку. Для введення композицій антитіл або малих молекул переважною є внутрішньом'язова ін'єкція або внутрішньовенна інфузія. Певні композиції антитіл або малих молекул вводять прямо до черепа. Деякі композиції антитіл або малих молекул розраховані на уповільнене виділення за допомогою спеціальних приладів, наприклад, Medipad™.

Агенти за винаходом можна за бажанням вводити у сполученні з іншими агентами, які принаймні частково лікують різні, у тому числі імунні, захворювання. У випадку пухлин мозку - первинних та метастазів - лікувальні композиції можна також вводити у сполученні з агентами, які полегшують проходження агентів за винаходом крізь гемато-енцефалічний бар'єр (BBB). При внутрішньоназальному введенні лікувальних композицій антитіл або малих молекул вони можуть включати засоби подолання клітинної мембрани.

#### Складання сполук

Сполуки (наприклад, моноклональні антитіла, антитіла людських послідовностей, людські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антизмистовні олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA) для лікування новоутворень або запалень часто вводять у складі фармацевтичних композицій, що містять активний лікарський засіб, наприклад, хіміко-терапевтичний або протизапальний, та різноманітні фармацевтично прийнятні компоненти (Remington's Pharmaceutical Science (15<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980)). Переважна форма залежить від призначення та шляху введення. Сполуки можуть містити фармацевтично прийнятні нетоксичні носії або розбавники, тобто загально вживані компоненти лікувальних композицій для людей або тварин. Розбавник обирають так, щоб не впливати на біологічну активність комбінації. Це, наприклад, дистильована вода, фізіо-

логічний розчин з фосфатним буфером, розчин Рінгера, декстрозний розчин або розчин Генка. Крім того, фармацевтична композиція може містити інші носії, ад'юванти, або нетоксичні, не лікувальні, не імуногенні стабілізатори тощо.

Фармацевтичні композиції також можуть містити великі, повільно метаболізовані макромолекули - протеїни, полісахариди, як хітозан, полімолочні кислоти, поліглікольні кислоти та сополімери (як от функціоналізована латексом Sepharose™, агароза, целюлоза та подібні), полімерні амінокислоти, сополімери амінокислот та ліпідні агрегати (краплини олій, ліпосоми тощо). Також ці носії можуть слугувати імуностимуляторами (тобто ад'ювантами).

Для парентерального введення лікувальна композиція антитіл або малих молекул може мати форму ін'єкційних розчинів чи суспензій речовини у фізіологічно прийнятному розбавнику з фармацевтичним носієм, яким може бути стерильна рідина (водна олія, сольовий розчин, гліцерин або етанол). У композиціях також можуть бути присутні такі додаткові речовини, як змочувачі або емульгатори, поверхнево активні речовини, буферні речовини та подібні. До композицій ще включають компоненти нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження, як от арахісова, соєва або мінеральна олія. Переважними рідкими носіями, особливо для ін'єкційних розчинів, є гліколи, як пропиленгліколь або поліетиленгліколь. Лікувальні композиції антитіл або малих молекул можна вводити у вигляді ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування або імплантованих препаратів з повільним виділенням діючої речовини. Так, лікувальна композиція антитіл або малих молекул з концентрацією 5 мг/мл містить 50 mM L-гістидину, 150 mM NaCl з рН, доведеним до 6.0 за допомогою HCl.

Композиції випускають як рідкі ін'єкційні розчини та суспензії або тверді форми, придатні для розчинення або суспендування у рідкому носії перед впорскуванням. Препарати також можна емульгувати або капсулювати у ліпосомах або мікрочастках, як от полілактид, полігліколід або сополімер для підсилення ад'ювантної дії, як зазначено вище (Langer, Science 249: 1527, 1990 та Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997). Агенти за винаходом можна вводити у вигляді ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування або імплантованих препаратів з повільним або пульсуючим виділенням діючої речовини.

До композицій за винаходом належать також композиції для орального, внутрішньо- назального та пульмонарного введення, трансдермального введення, а також супозиторії.

До супозиторіїв вводять в'язучі та носії, наприклад, полалкиленгліколи або тригліцериди; такі супозиторії містять діючу речовину у межах від 0.5% до 10%, переважно 1%-2%. До оральних композицій вводять такі наповнювачі, як манітол, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, сахарин натрію, целюлозу та карбонат магнію. Такі композиції мають форму розчинів, суспензій, таблеток, пілюль, капсул, препаратів уповільненого виділення

та порошоків і містять 10%-95%, переважно 25%-70%, діючої речовини.

Топікальне введення буває трансдермальним або внутрішньошкірним. Для полегшення засвоєння агент вводять топікально разом з холерним токсином або його детоксикованими похідними чи частинами. (Glenn et al., *Nature* 391: 851, 1998). Для цього компоненти вживають у вигляді зшитих молекул, одержаних хімічним зшиванням або експресією у вигляді злитого протеїну.

Або ж трансдермальне введення здійснюють за допомогою пластирів чи трансферосом (Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25: 3521-24, 1995; Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368: 201-15, 1998).

Фармацевтичні композиції складають як стерильні, по суті ізотонічні та у повній відповідності до правил Доброї виробничої практики (GMP) Управління з ліків та харчових продуктів США.

#### Токсичність

Переважно терапевтично діючі дози композицій (наприклад, моноклональні антитіла, антитіла людських послідовностей, людські антитіла, мультиспецифічні та біспецифічні молекули, малі хімічні молекули, композиції нуклеїнових кислот, наприклад, антизмістовні олігонуклеотиди, олігонуклеотиди з двохланцюговою РНК (RNAi, shRNA, si RNA) або олігонуклеотиди ДНК чи вектори, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують транскрипцію молекул shRNA), описаних тут, дають лікувальний ефект без помітної токсичності.

Токсичність описаних тут протеїнів визначають стандартними фармацевтичними методиками у культурах клітин або на експериментальних тваринах, наприклад, визначенням LD50 (летальної дози для 50% популяції) або LD100 (летальної дози для 100% популяції). Співвідношення між токсичною та терапевтично діючою величинами дози називається терапевтичним індексом. Дані, одержані аналізом у культурах клітин або на експериментальних тваринах, використовують при складанні композицій з такими дозами, які не є токсичними для людини. Описані тут протеїни дозують переважно у такому інтервалі значень, щоб їх концентрація у кровотоку була діювою, але незначно токсичною або зовсім нетоксичною. У цьому інтервалі значення доз можуть коливатися у залежності від випускної форми та шляху введення. Конкретний склад композиції, шлях введення та дозировку обирає лікар з урахуванням стану хворого, (див., наприклад, Fingl et al., 1975, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1).

Далі наводяться приклади здійснення винаходу у суто ілюстративних цілях; вони ніяким чином не обмежують обсяг винаходу.

#### Приклади здійснення винаходу

Як показано у прикладах нижче, заявники встановили, що медіована TF-VIIa коагуляція та клітинна сигналізація втягують певні клітинні пули тканинного фактору. Виявлено, що доступний на поверхні, зовнішньоклітинний Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup> дісульфідний зв'язок тканинного фактору, необхідний для активування коагуляції як і фаза ініціації що сигналізується Ха у третинному комплексі TF-VIIa-Ha, але не для прямого розщеплення PAR2 біна-

рним комплексом TF-VIIa. Мутаційне порушення цього дісульфідного зв'язку рекапітулює функціональні властивості сигнального пула TF-VIIa, який має низьку спорідненість до VIIa на клітинах з нормальною експресією TF.

Крім того, помічено, що протеїндисульфідізомераза (PDI) зупиняє коагуляцію прицільною дією на цей дісульфід. Коагуляційна активність TF пригнічується зв'язуванням позаклітинного PDI з TF, і для утворення TF-PAR2 комплексу та сигналізації TF-VIIa потрібні шляхи дісульфід-тіольного обміну. Зв'язок TF-PDI та сигналізація TF-VIIa чітко корелюють у кількох типах клітин, включаючи клітини раку грудей. Особливе моноклональне антитіло (MAb-10H10) розпізнає лише некоагуляційну, криптичну конформацію TF. Це антитіло інгібує утворення комплексу TF-PAR2 та сигналізацію TF-VIIa, але не заважає активації коагуляції. Блокада сигналізації TF-VIIa у цих клітинах з боку MAb-10H10 сильніше за блокаду коагуляції з боку MAb-5G9 пригнічує зростання пухлини (наприклад, раку грудей або меланоми), що підкреслює важливість сигнального шляху TF-VIIa *in vivo*. При цьому MAb-10H10 чинить мінімальну дію на активування коагуляції, отже, інгібування сигналізації TF-VIIa не заважає гемостазу.

Далі, встановлено, що PDI пригнічує коагуляційну активність TF на шляху, що залежить від оксиду азоту (NO). Судиннозахисний синтез NO часто порушується при атеросклерозі, діабеті або запаленні, й порушення синтезу оксиду азоту може зсунути поверхнево-клітинну активність TF у бік коагуляції. Залежне від NO інгібування коагуляційної активності TF неочікуваним шляхом пов'язує регулювання тромбоутворення з окислювальним стресом при серцево-судинних хворобах та запаленнях.

#### Приклад 1

##### Специфічне інгібування сигнального TF

Експресований на поверхні клітин TF зв'язує VIIa з різною спорідненістю, і активація коагуляції TF звичайно насичена при низьких концентраціях VIIa відносно клітинної сигналізації (Le et al., *J. Biol. Chem.* 267: 15447-15454, 1992; Hjortoe et al., *Blood* 103: 3029-3037, 2004). Неясно, чи диференційне зв'язування VIIa притаманне конформації TF, чи воно спричинюється іншими факторами, що впливають на коагуляційну активність TF, а саме ліпидним оточенням, супутніми протеїнами або мобілізацією кальцію (Sevinsky et al., *J. Cell Biol.* 133: 293-304, 1996; Carson et al., *Blood* 84: 526-534, 1994; Bhattacharjee et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 25: 1737-1743, 2005; Bach and Moldow, *Blood* 89: 3270-3276, 1997). Нами встановлено, що коагуляційна активність TF лишається незмінною, незважаючи на посилення пригнічення рівнів експресії TF до <5% у людських кератиноцитах при затримці росту, про що свідчать незмінні рівні актину (Fig. 1a). Навпаки, сигналізація TF-VIIa пригнічується у відповідності до рівнів TF (Fig. 1b), хоча реактивність PAR не втрачена (Fig. 1e).

Зафарблення непошкоджених клітин підтверджує зменшення експресії TF на поверхні клітин (Fig. 1c), але нами несподівано виявлена втрата епітопів для MAb-10H10, що зв'язуються з карбок-



сильним закінченням TF, не інгібуючи зв'язку з VIIa (Ruf et al., *Biochem. J.* 1978: 729-733, 1991). Реактивність MAb-5G9, яке інгібує коагуляцію та зв'язування до субстрату, зберігається, що свідчить про втрату реактивності MAb-10H10 з залишковим пулом TF, який запускає коагуляцію (Huang et al., *J. Mol. Biol.* 275: 873-894, 1998). Досліди з імунодеплекції з використанням очищеного, з реконструйованими фосфоліпідами TF або лізатів клітин з експресією TF підтверджують ефективний зв'язок лише MAb 5G9, але не MAb-10H10 з коагулянтним TF (Фіг. 1d). Отже, антигенно різномірні пули TF спричиняють коагуляцію на тлі клітинної сигналізації TF-VIIa через PAR2 (Фіг. 1e).

Незалежно від віку культури коагулянтний TF має високу спорідненість до VIIa, оскільки вироблення Ха було насичене до -99% при 1 нМ VIIa. У комплексі TF-VIIa-X, що ініціює коагуляцію, саме породжуваний продукт Ха, а не TF-VIIa, активує PAR (Riewald and Ruf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7742-7747, 2001). Низькі (1 нМ) концентрації VIIa створюють помітний сигналінг лише у присутності субстрату X, а сигналізацію TF-VIIa-Ха блокує інгібітор Ха - NAP5 (Фіг. 1f). Сигналізація TF-VIIa при 10 нМ VIIa не інгібується NAP5, і NAP5 лише мінімально впливає на сигналізацію, коли додається субстрат X разом з 10 нМ VIIa. Отже, наявність субстрату не впливає на сигнальний пул TF-VIIa. Коагуляцію та залежну від Ха сигналізацію комплексу, що ініціює коагуляцію, інгібує MAb-5G9, а не MAb-10H10. Що важливо, MAb-10H10 з низькою реактивністю щодо коагулянтного TF (Фіг. 1c,d) блокує сигналізацію TF-VIIa. Отже, ми знайшли специфічне інгібуюче антитіло до сигнального TF, яке не заважає початку коагуляції або сигналізації третинного комплексу TF-VIIa-Ха.

На фіг. 1 зображене специфічне інгібуювання сигнального TF. а Коагуляційна активність, експресія TF та b сигналізація TF-VIIa у клітинах HaCaT з уповільненим ростом, середнє значення  $\pm$ sd (n=3). Вставки: актин або TF у лізатах клітин, c Визначення TF на поверхні клітин за допомогою MAb-9C3 мічених FITC (флуоресцинотіоціанатом), та MAb-5G9 або 10H10 мічених техаським червоним, d Вироблення Ха у реконструйованому фосфоліпідами TF, імунодеплектованому імобілізованими MAb-10H10 або 5G9 у порівнянні з контролем, e Залежність від PAR2 сигналізації HaCaT TF-VIIa, f Різна спорідненість до VIIa відрізняє TF, який медіює TF-VIIa, від залежного від Ха третинного сигнального комплексу TF-VIIa-Ха. MAb-10H10 специфічно інгібує сигналізацію TF-VIIa; середнє значення  $\pm$ sd (n=3).

#### Приклад 2

Сигнальний TF регулюється протеїндисульфідомеразою

Далі регулювання функції TF у цій моделі відбувається таким чином: клітини пересівають до збідненого по  $\text{Ca}^{2+}$  середовища для запобігання контакту між клітинами протягом 48 годин. Або ж середовище доповнюють за останні 24 години 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (високий рівень  $\text{Ca}^{2+}$ ), що обумовлює появу у клітин чіткої епітеліальної морфології, не впливаючи на рівні експресії TF або зв'язування VIIa. Еквівалентність та домінування експресії TF

на поверхні клітин підтверджується поверхневим біотинуванням та імунопреципітацією з MAb-5G9, який не зв'язує TF після біотинування (Фіг. 2a). Втім, виявляються чіткі функціональні розбіжності TF у цих двох випадках (Фіг. 2b), а коагуляційна активність вище у 3-4 рази у клітинах з низьким  $\text{Ca}^{2+}$ . Хоча рівень прямої активації PAR2 пептидом-агоністом є порівняно однаковим в обох випадках, сигналізація TF-VIIa помітна лише у клітинах з високим, а не низьким рівнем  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже, підвищення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  активує сигнальний TF за рахунок коагулянтного TF. Відповідно, блокування синтезу протеїну циклогекс-сїмідом (CHX) під час додання  $\text{Ca}^{2+}$  блокує сигналізацію TF-VIIa разом з блокуванням вищого глікозильованого TF на поверхні клітин. (Фіг. 2c).

Оскільки протеїндисульфідомераза (PDI) індукується під час інгібування контактів, ми вважаємо, що коагуляційна активність TF пригнічується на шляху PDI, яка націлена на оголений в розчинник дисульфідний зв'язок TF Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup>, необхідний для коагуляції (Rehmtulla et al., *J. Biol. Chem.* 266: 10294-10299, 1991. Такі дисульфідні перехресні ланцюги схильні до відновлення внаслідок напруженої геометрії зв'язку (Hogg, *Trends Biochem. Sci.* 28: 210-214, 2003; Wouters et al., *BioEssays* 26: 73-79, 2004). За допомогою мічення мембранонепроникним тіол-реагуючим 3-(N-малеїмідпропіоніл)біоцитином (MPB), на поверхні клітин знайдена PDI у зв'язку з TF. Мічені MPB смуги 56 та 64 кДа специфічно копреципітувалися разом з TF з клітин з високим  $\text{Ca}^{2+}$  (Фіг. 2d), але блокування сусідніх тіолів феноларсиноксидом (PAO) скасовує мічення. Слабка, з різними ступенями міченості смуга з молекулярною масою, що відповідає TF що залишається, може свідчити про короткочасне відновлення TF. Великі мічені MPB смуги копреципітують з TF, вирівняним з імунопреципітованим PDI, але не з близьким гомологом ERP57, і антитіло до PDI блокує мічення MPB (Фіг. 2e). Нокдаун PDI або ERP57 під дією siRNA (small interfering RNA) також підтверджує співосадження PDI з TF (Фіг. 2f).

Коімунопреципітація біотинованої на NHS поверхні PDI у смугі 64 кДа підтверджується вестерн-блотінгом (Фіг. 2g). Інгібітор PDI бацитрацин блокує копреципітацію PDI з TF (Mandel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90: 4112-4116, 1993). Бацитрацин інгібує сигналізацію TF-VIIa, але не чіпає прямого агоніста PAR2 або реакцію тромбіну (Фіг. 2h). Відмивання поновленої бацитрацином сигналізації TF-VIIa та мічення MPB поверхневої PDI є ознакою швидкого супутнього повторного зв'язування PDI з TF у межах часу, поки тривають ці дослідження (Фіг. 2i). Отже, сигнальний TF на клітинах з високим рівнем  $\text{Ca}^{2+}$  являє собою чутливий до бацитрацину комплекс з PDI.

Хоча наявність бацитрацину трохи посилює коагуляційну функцію TF (Фіг. 2j), відмінність активності при низькому та високому рівні  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах лишається вражаючою. Ми вважаємо, що частковий ефект додання бацитрацину на активність TF спричинений недостатньою дисоціацією PDI відносно умов мічення (Фіг. 2g,i). Недовга дія  $\text{HgCl}_2$  суттєво підвищує коагуляційну активність TF голо-

ним чином при високому клітинному рівні  $\text{Ca}^{2+}$ , що свідчить про негативну регуляцію TF відновлювальними шляхами. Підвищена коагуляція внаслідок окислення впливає на TF, оскільки  $\text{HgCl}_2$  слабо діє при низькому клітинному рівні  $\text{Ca}^{2+}$ , не посилює коагуляцію у присутності бацитрацину, який специфічно порушує зв'язок між PDI та TF, не видаляючи PDI з поверхні клітин (Фіг. 2k). Більш того, бацитрацин є оборотним інгібітором активації  $\text{HgCl}_2$  (Фіг. 2j), але не блокує неспецифічну токсичну дію  $\text{HgCl}_2$  на клітині. Отже, сигнальний TF втрачає коагуляційну активність за рахунок окислювально-відновлювального механізму. Реактивність MAb-10H10, але не інших антитіл зменшується при поверхневому окисненні, що також свідчить про чутливу до окислення-відновлення конформацію сигнального TF.

Фіг. 2 показує як сигнальний TF регулюється PDI. а Подібна експресія TF на поверхні клітин зсувається при високому рівні  $\text{Ca}^{2+}$ , під впливом біотинування NHS поверхні, що запобігає імунопреципітації MAb-5G9. б Слабка коагуляційна активність TF при високому клітинному рівні  $\text{Ca}^{2+}$  пов'язана з інгібуванням MAb-10H10 сигналізації TF-VIIa; \* відміна від контрольного зразка з високим рівнем  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $p < 0.01$ , перевірка за критерієм Ст'юдента, середнє значення  $\pm \text{sd}$  ( $n=4$ ), с Блокування синтезу TF циклогексिमідом (CHX) запобігає сигналізації TF-VIIa, d Мічення MPB протеїнів, що імунопреципітують з TF, інгібується 2 мкМ PAO. Е Спі-вміграція мічених MPB смуг в імунопреципітатах TF та PDI. Антитіло до PDI -SPA-890 - блокує мічення MPB f Нокдаун PDI, але не ERP57 з боку siRNA запобігає появі мічених MPB смуг в імунопреципітатах TF. g Інгібітор PDI - бацитрацин (3 мМ) - дисоціює PDI від TF в імунопреципітатах MAb-9C3 біотинуваних NHS поверхню клітин, h Бацитрацин обернено блокує сигналізацію TF-VIIa. Відмивка: клітини, преінкубовані 10 хвилин з бацитрацином, вимиваються для стимулювання 10 нМ VIIa; \*  $p < 0.01$  відносно контрольних зразків, перевірка за критерієм Ст'юдента, середнє значення  $\pm \text{sd}$  ( $n=4$ ). і Вимивання бацитрацину стимулює повторне зв'язування PDI-TF; мічення через 10 хвилин після промивки, j Вплив бацитрацину на коагуляційну активність TF. Поверхню клітини окислюють 100 мкМ  $\text{HgCl}_2$  за 2 хвилини до функціонального аналізу, k Окислення  $\text{HgCl}_2$  дисоціює PDI від TF, не видаляючи біотиновану MPB або NHS PDI з поверхні клітини.

#### Приклад 3

Мутаційний розрив дисульфідного зв'язку TF рекапітулює зменшення спорідненості до VIIa - ознака сигнального TF

Ми випробували, чи розірваний  $\text{Cys}^{186}\text{-Cys}^{209}$  дисульфідний зв'язок TF рекапітулює сигнальні властивості регульованого PDI TF. Окремі аланін-заміщені мутанти дисульфиду були введені до TF-негативних ендотеліальних клітин пупкової вени людини (HUVEC) шляхом трансдукції аденовірусу, щоб одержати подібну експресію на поверхні. У кожного мутанта вироблення медійованого TF-VIIa Ха скорочується на  $>95\%$ , втім, сигналізація TF-VIIa зберігається у чутливих клітинах аго-ніста PAR2 з експресією C209A, але не C186A TF (Фіг.

3а). Зв'язування VIIa з C209A TF, як показує непряма імунофлуоресценція, лишається на рівні дикого типу TF. Сигналізація TF-VIIa у клітинах з експресією дикого типу TF потребує  $>1$  нМ VIIa, а сигналізація третинного комплексу TF, що ініціює коагуляцію, має місце при  $< 1$  нМ VIIa (Фіг. 3б). У клітинах з трансдукованим C209A TF сигналізація TF-VIIa потребує менших концентрацій VIIa у порівнянні з клітинами з експресією дикого типу TF. Важливо, що медійована C209A TF сигналізація не змінюється при доданні субстрату X з VIIa. Отже, утворення  $\text{Cys}^{186}\text{-Cys}^{209}$  дисульфідного зв'язку є необхідним для генерування TF з високою спорідненістю, який запускає не лише коагуляцію, а й сигналізацію третинного комплексу TF-VIIa-Ха.

Підтверджено, що відновлений C209A TF алостерично стимулює каталітичну активність VIIa, необхідну для протеолітичної сигналізації клітини. Рекombінантний розчинний мономерний C209A TF максимально стимулює активність VIIa при насиченні. Втім, спорідненість відновленого C209A TF до каталітичної активності VIIa нижча, ніж у розчинного, окисленого дикого типу TF (Фіг. 3С). Отже, мутаційний розрив дисульфідного зв'язку TF призводить до зниження спорідненості щодо VIIa - ознаки сигнального TF. MAb-10H10 не блокує каталітичну активність C209A TF-VIIa, це антитіло інгібує лише специфічне зв'язування VIIa з сигнальним TF. Отже, MAb 10H10, вірогідно, запобігає медійованому TF-VIIa розщепленню PAR2 шляхом стеричної перепони.

Фіг. 3 зображує сигналізацію відновленого TF. а Мутантний C209A TF-VIIa сигналізує, але втрачає коагуляційну активність у HUVEC, експресуючи подібний рівень дикого типу, C186A або C209A TF з PAR2. б Дозова відповідь на сигналізацію VIIa з доданням 100 нМ X і без нього у HUVEC з експресією C209A або дикого типу TF, середнє значення  $\pm \text{sd}$  ( $n=4$ ). с Рекombінантний розчинний C209A TF активує VIIa (40 нМ) з пониженою спорідненістю у порівнянні з диким типом TF; середнє значення  $\pm \text{sd}$  ( $n=3$ ). На вставці: гель з гомогенних препаратів мономерного розчинного TF; мітка експресії не відщеплюється від C209A TF, дозволяючи більшу молекулярну масу. Нижній прямокутник: MAb-10H10 не впливає на амідолітичну активність TF-VIIa.

#### Приклад 4

Роль коагулянтного TF та сигнального TF у прогресії пухлини

Специфічні антитіла до коагулянтного (MAb-5G9) та сигнального (Mab-10H10) TF дають можливість з'ясувати їх відповідні ролі у прогресії пухлини. Специфічне прицілювання до TF пухлинних клітин досягається у ксенотрансплантатній моделі раку грудей MDA-MB231. Антитіла з очікуваною специфічністю пригнічують коагуляцію у разі MAb-5G9, а MAb-10H10 інгібує сигналізацію, включаючи індукування проангіогенного інтерлейкіну 8 та TR3 - типова генна первинна реакція нижчого рівня сигналізації PAR (Фіг. 4а,б).

Пухлинні клітини, до яких було імплантоване MAb-10H10, але не MAb-5G9, показують значно менший розмір та масу пухлини у порівнянні з ізогенним контрольним зразком IgG1 (Фіг. 4с). Обро-

блені антитілами клітини зростають у тканинній культурі так само, як і контрольні, що не суперечить літературним даним про те, що експресія TF не впливає на поширення опухолі *in vitro* (Yu et al., Blood 105: 1734-1741, 2005; Zhang et al., J. Clin. Invest. 94: 1320-1327, 1994). MAb-5G9 трохи зменшує обсяг пухлини, що пояснюється його частковою інгібувальною дією на сигналізацію TF-VIIa *in vitro*.

TF підтримує ранню стадію зупинки експериментальних метастазів меланоми через шляхи тромбіну, оскільки MAb-5G9, але не MAb-10H10, пригнічує метастази меланоми M24met. (Mueller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11832-11836, 1992). Оскільки режим введення антитіл у попередніх дослідженнях був недостатнім для оцінки зростання метастазів пухлин, ми повернулися до розгляду ролі сигналізації TF у поширенні пухлини у цій моделі меланоми. MAb-5G9 затримує зростання первинної пухлини меланоми, але MAb-10H10 більше здатний до помітного зменшення фінального обсягу та маси пухлини (Фіг. 4d). На відміну від гематогенних метастазів, що їх поширює коагуляція, прицільний удар по сигналізації TF-VIIa ефективно пригнічує зростання первинної пухлини у двох незалежних моделях *in vivo*.

Фіг.4 показує, як сигналізація TF-VIIa сприяє зростанню пухлини, а, б Сигналізація TF-VIIa блокується MAb 10H10, але не MAb 5G9, у клітинах раку грудей MDA-MB231 (\*  $p < 0.01$ , перевірка за критерієм Ст'юдента, середнє значення  $\pm$ sd ( $n > 4$ ). Вставка: репрезентативний експеримент, з зростання первинної пухлини MDA-MB231 у приступності 1 мг контрольного IgG1 (TIB1 15), MAb-5G9 або MAb 10H10, спільно впорскуваних для досягнення високих локальних концентрацій антитіл. Маса пухлини при забої тварини ( $n = 6$ , 2-сторонній аналіз ANOVA, критерій Крускала-Волліса\*\*  $p < 0.001$ ). d Зростання пухлин клітин меланоми M24met, імплантованих з 1 мг MAb-5G9 або 10H10 чи без них ( $n = 8$ , 2-сторонній ANOVA, критерій Крускала-Волліса \*\* $p < 0.001$ , \*  $p < 0.01$ ).

Ці дослідження розкривають молекулярний механізм, за яким TF переключається з ролі одного з факторів, що запускають каскадну коагуляцію, до ролі співрецептора некоагулянтної сигналізації, що посилює патологію. Оскільки сигнальний TF-VIIa погано зв'язує субстрат, він уникає негайного інгібування внаслідок зворотнього зв'язку залежним від Ха інгібітором шляху TF (TFPI) (Huang et al., Blood 90: 944-951, 1997). Отже, патофізіологічна поширювана сигналізація TF-VIIa проходить без звичайних інгібувальних ланцюгів, що виникають після запуску коагуляції. Прицільне враження сигналізації TF пригнічує зростання пухлини, що прямо свідчить про провідну роль медіованої TF-VIIa активації PAR2 у розвитку патології, незалежно від сигналізації тромбіну *in vivo*. Приклад TF показує, що дисульфідні шляхи обміну є досить гнучкими, щоб перемикаючи один-єдиний рецептор між двома різними біологічними функціями, і що таке регуляторне перемикання можна використати у лікувальних цілях. Це дослідження стимулюватиме подібні роботи з прицільної дії на патофізіологічно значущі поверхневі клітинні рецептори.

#### Приклад 5

Виділення епітопів для антитіл, специфічних до сигнального тканинного фактору

На фіг. 5 показано виділення епітопів для MAb 10H10 - моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з сигнальним тканинним фактором. Зображена імунопреципітація дикого типу або мутованого TF1-218 із зазначеними антитілами, визначена методом вестерн-блотінгу. MAb 10H10 не є ефективним в імунопреципітації TF з мутацією у залишках 149 та 150 (A149, A150); видно, що локалізація епітопів у домені карбоксильного закінчення TF близька до цих залишкових бічних ланцюгів або прямо охоплює їх.

#### Приклад 6

Залежне від оксиду азоту (NO) пригнічення PDI коагуляційної активності TF

Як зазначено вище, мутаційний аналіз показує, що розрив дисульфідного зв'язку Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup> деактивує коагуляційну активність TF, але мічення MPB свідчить про відсутність помітних вільних тіолів TF на клітинах з високим рівнем Ca<sup>2+</sup>. PDI з поверхні клітин каталізує реакції транснаїтрозильовання та денітрозильовання, причому PDI може бути S-нітрозильована на сусідніх тіолах. Для підсилення коагуляційної активності TF потрібна концентрація 50-100 мкМ Hg<sup>2+</sup>, яка є достатньою для вивільнення оксиду азоту (NO) з PDI (Sliskovic et al., J. Biol. Chem. 280, 8733-8741, 2005), а це свідчить на користь припущення, що активуюча дія Hg<sup>2+</sup> пов'язана з денітрозильованням PDI. Щоб перевірити це припущення, використовують метод перемикання біотину для викриття S-нітрозильовання. Вільні клітинні тіоли блокують N-етилmaleїдом (NEM), після чого клітини мітять MPB у присутності аскорбінової кислоти або без неї для вивільнення NO. Подібним чином після блокування вільних тіолів 1 мМ йодацетаміду імунопреципітати TF мітять MPB у присутності аскорбінової кислоти або без неї.

Як показано на фіг.6, з цих досліджень витікає, що PDI пригнічує коагуляційну активність TF на залежному від оксиду азоту шляху, пов'язуючи регулювання тромбогенності TF з окислювальним стресом у судинах. На Фіг. 6а видно, що метод перемикання біотину після блокади тіолів з 1 мМ N-етилmaleїдом (NEM) посилює мічення PDI при вивільненні NO аскорбіновою кислотою (AA) специфічно в імунопреципітатах PDI з клітин з високим рівнем Ca<sup>2+</sup>. При специфічності до клітин з високим рівнем Ca<sup>2+</sup> імунопреципітоване PDI сильніше мітиться MPB у присутності аскорбінової кислоти. Мічені MPB смуги молекулярної маси, що відповідає TF, також стають видимими в імунопреципітатах PDI. Фіг. 6b показує S-нітрозильовання TF, виявлене методом перемикання біотину після блокади тіолів 1 мМ йодацетаміду перед міченням MPB у присутності аскорбінової кислоти або без неї. Після блокади вільних тіолів 1 мМ йодацетаміду імунопреципітати TF помітно сильніше мітяться MPB у присутності аскорбінової кислоти.

Далі перевіряють, чи є спричинена Hg<sup>2+</sup> активація TF оберненою. Після відмивання оксиданту коагуляційна активність TF залишається високою. Результати на Фіг. 6с свідчать, що спричинена

Hg<sup>2+</sup> коагуляційна активність TF є оберненою під впливом залежної від NO PDI шляху. У цьому досліді клітини, відмиті після короткочасної дії 100 мкМ Hg<sup>2+</sup>, інкубують у буфері HEPES, 1.5 мМ Ca<sup>2+</sup> у присутності 1 мМ нітроціаниду натрію (SNP), 1 мМ відновленого глутатіону (GSH) або 1 мМ S-нітроглоглутатіону (GSNO) з 10 мкМ PAO або без протягом 10 хвилин перед аналізом на вироблення Ха. Ці дані показують, що додання поодиночі відновленого глутатіону (GSH) або донора NO нітропрусиду натрію (SNP) не впливає на активність TF, але у комбінації пригнічує коагуляційну активність TF (Фіг. 6с; \* різні контрольні зразки (p<0.05, перевірка за критерієм Ст'юдента; середнє значення ±sd; n = 3)). PAO, що блокує сусідні тіоли, перешкоджає інактивації TF, що вказує на роль PDI у розриві дисульфідного зв'язку TF. NO реагує з GSH, утворюючи S-нітроглоглутатіон, а додання S-нітроглоглутатіону є достатнім для пригнічення TF коагуляційної активності TF.

#### Приклад 7

TF-VIIa сигналінг потребує утворення комплексу TF-PAR2

Додаткові дослідження, як показано на фіг.7, доводять, що Сигналізація TF-VIIa потребує утворення комплексу TF-PAR2. На Фіг. 7а видно, що МАb-5G9 імунопреципітація PAR2 з клітин з високим рівнем Ca<sup>2+</sup> анулюється обробкою Hg<sup>2+</sup>. На Фіг. 7b показано, що МАb 10H10, але не МАb-5G9, порушує комплекс TF-PAR2. Клітини HaCaT попередньо обробляють у середовищі без сироватки 15 хвилин зазначеним антитілом та виявляють TF в імунопреципітаті PAR2. Контрольні зразки не використовують зв'язку з фоном, бо сумісних з PAR2 антитіл від інших видів для вестерн-блотінгу не має в наявності. Фіг. 7с показує, що МАb 10H10 не імунопреципітується з PAR2 з клітин HaCaT. Фіг. 7d показує, що МАb 10H10 не імунопреципітує комплекс, який містить PDI. Мічені MPB клітини імуноосаджують МАb-9C3 або МАb 10H10 та випробують на PDI, TF або біотинування тіолів за допомогою MPB.

Як витікає з фіг. 7, МАb-5G9 не впливає на сигналізацію TF-VIIa, але демонструє високу реактивність щодо коагулянтних та некоагулянтних пулів TF. Це антитіло імунопреципітує комплекс TF з PAR2 з клітин HaCaT (Фіг. 7а). Обробка Hg<sup>2+</sup> для вивільнення поверхневої PDI з TF виключає утворення комплексу PAR2 з TF в імунопреципітатах МАb-5G9. Попередня обробка клітин МАb-5G9 не впливає на повторне зв'язування TF з імунопреципітатами PAR2, а МАb 10H10, яке блокує сигналізацію, суттєво послаблює зв'язок TF-PAR2 (Фіг. 7b). Отже, блокування антитілом сигналізації TF-VIIa корелює з послабленою спільним імунопреципітацією TF-PAR2. На відміну від МАb-5G9, МАb 10H10 не імуноосаджує PAR2 (Фіг. 7с) або PDI (Фіг. 7d), що є свідченням про те, що це антитіло запобігає утворенню комплексу TF, PAR2 та PDI. У сумі дані, наведені на фіг. 7 та фіг. 2, демонструють на клітинній моделі з фізіологічними рівнями TF та PAR2, що PDI діє як регуляторний перемикач між прямою клітинною сигналізацією TF-VIIa та активацією коагуляції.

#### Приклад 8

#### Матеріали та методи

Реагенти. Фактори коагуляції, інгібітори та антитіла були описані вище або надійшли від наступних постачальників: антитіло до PDI RL90 (Alexis), SPA-890 (Stressgen), антитіло до ERP57 (Upstate), N'-(3-малеїмідилпропіонил) біоцитин (MPB) (Molecular Probes), бацитрацин, фенілпарсиноксид (Sigma) (Riewald and Ruf, Proc. Natl. Acad. Set USA 98: 7742-7747, 2001; Ahamed and Ruf, J. Biol. Chem. 279: 23038-23044, 2004; Sevinsky et al., J. Cell Biol. 133: 293-304, 1996; Ruf et al., Biochem. J. 278: 729-733, 1991; Morrissey et al., Thromb. Res. 52:247-61, 1988; Dorfleutner et al., Mol. Biol. Cell 15: 4416-4425, 2004; Dorfleutner and Ruf, Blood 102: 3998-4005, 2003). Бацитрацин повторно очищують гель-фільтрацією та перевіряють на відсутність деградації PDI. Кроляче антитіло до PAR2 індукують KLH-зв'язаним пептидом TIQGTNRSSKGRSLIGKVDGTSHTGCG (послідовність № 5). Експресія розчинних мутантів TF на E. coli описана у Stone et al., Biochem. J. 310: 605-614, 1995.

Крім наведених вище літературних джерел, антитіла 5G9 та 10H10 також докладно описані у патентах США 5,223,427 та 6,001,978. Гібридоми, що продукують ці два антитіла, депоновані згідно з Будапештською угодою в ATCC 27 березня 1987 й одержали номери доступу відповідно HB9382 та HB9383.

Культури клітин. Культури HUVEC утримують та трансдукують, як описано вище (Ahamed and Ruf, J. Biol. Chem. 279: 23038-23044, 2004). Середовище для стандартної культури людських кератиноцитів HaCaT слугує DMEM (модифіковане за Дульбекко середовище Ігла), 10% FBS (телячої сироватки крові), 2 мМ глутаміну. Для одержання культур з низьким рівнем Ca<sup>2+</sup> клітини розсіюють на кератиноцитарний-SFM (Invitrogen), 10% збіднену по кальцію FBS на 48 годин та переключують доданням 2 мМ Ca<sup>2+</sup> за 24 години з циклогексимідом (50 мкМ) або без нього. Для нокдауну siRNA клітини HaCaT щоденно трансфекують при конфлюєнції 40% з 100 нМ siRNA (фірми Santa Cruz Biotechnology) з використанням 2 мкл Lipofectamin 2000 (фірми Gibco).

Аналіз функціонування та сигналізації. Для дослідів з сигналізації клітини приводять до рівноваги у безсироваточному режимі 5 годин у M199, 2 мМ глутаміну, 10 мМ HEPES, 1.5 мМ Ca<sup>2+</sup> (HUVEC), або 24 години (MDA-MB231), або 10-20 хвилин (HaCaT) у DMEM, 2 мМ глутаміну, 10 мМ HEPES. Інгібітори додають за 10 хвилин до стимуляції: анти-TF (50 мкг/мл), кроляче aHTH-PAR2 (100 мкг/мл), анти-TF (ATAP2, 20 мкг/мл, WEDE15, 40 мкг/мл), бацитрацин (3 мМ). Прудин (200 нМ) додають стандартно для виключення сигналізації тромбіну. Фосфорилування MAP-кінази через 10 хвилин та генну індукцію через 90 хвилин після стимулювання агоністом кількісно визначають вестерн-блотінгом та ПЦР (полімеразно-ланцюгової реакції) відповідно (Ahamed et al., Blood 105: 2384-2391, 2005).

Мічення поверхні клітин, імунопреципітація, конфокальне мікроскопування. Клітини промивають та мітять у буферному HEPES з вмістом 1.5

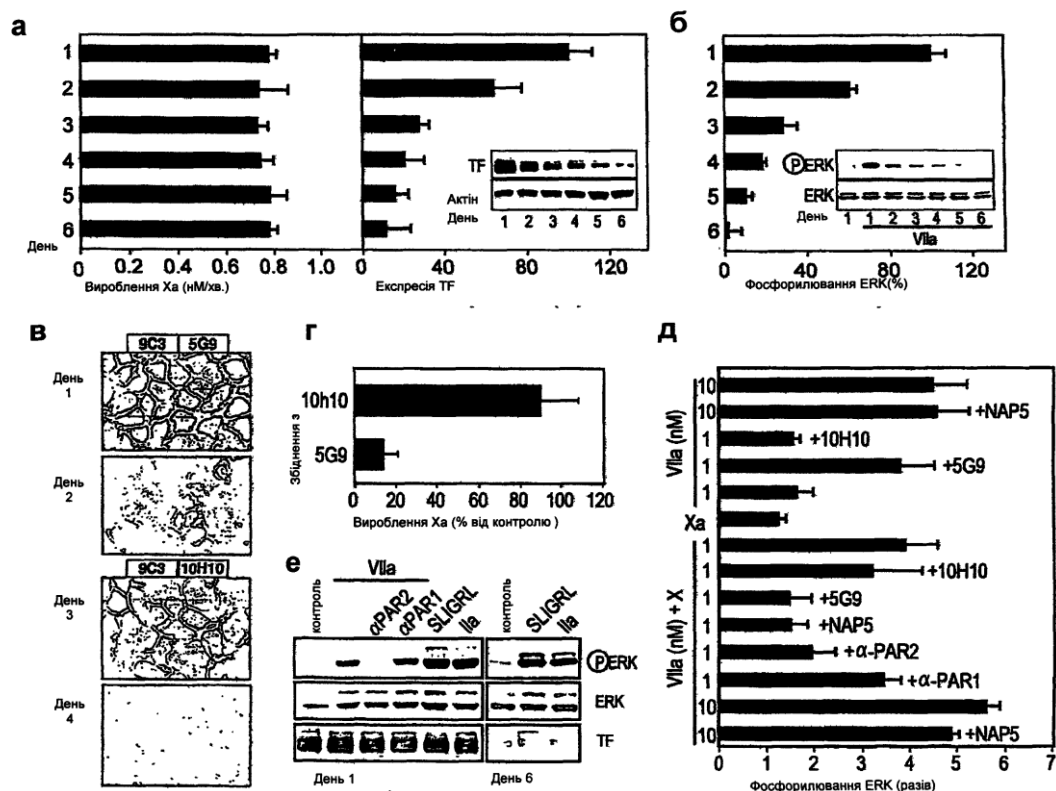
Дослідження зростання пухлин. Клітини 2x10<sup>6</sup> MDA-MB231mfr або 0.5x10<sup>6</sup> M24met змішують з 1 мг MAb 10H10, MAb-5G9 або ізотипового IgG1 (TIB15) у 100 мкл PBS (забуференого фосфатом фізіологічного розчину) та впрорскують підшкірно 6-тижневим самкам мишей CB-17 SCID (Taconic) (Jessani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101: 13756-13761, 2004; Mueller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:

При встановленні інтервалів для фізичних властивостей, як молекулярна маса, або хімічних властивостей, як склад, враховуються усі комбінації та під комбінації інтервалів та їх окремі варіанти.

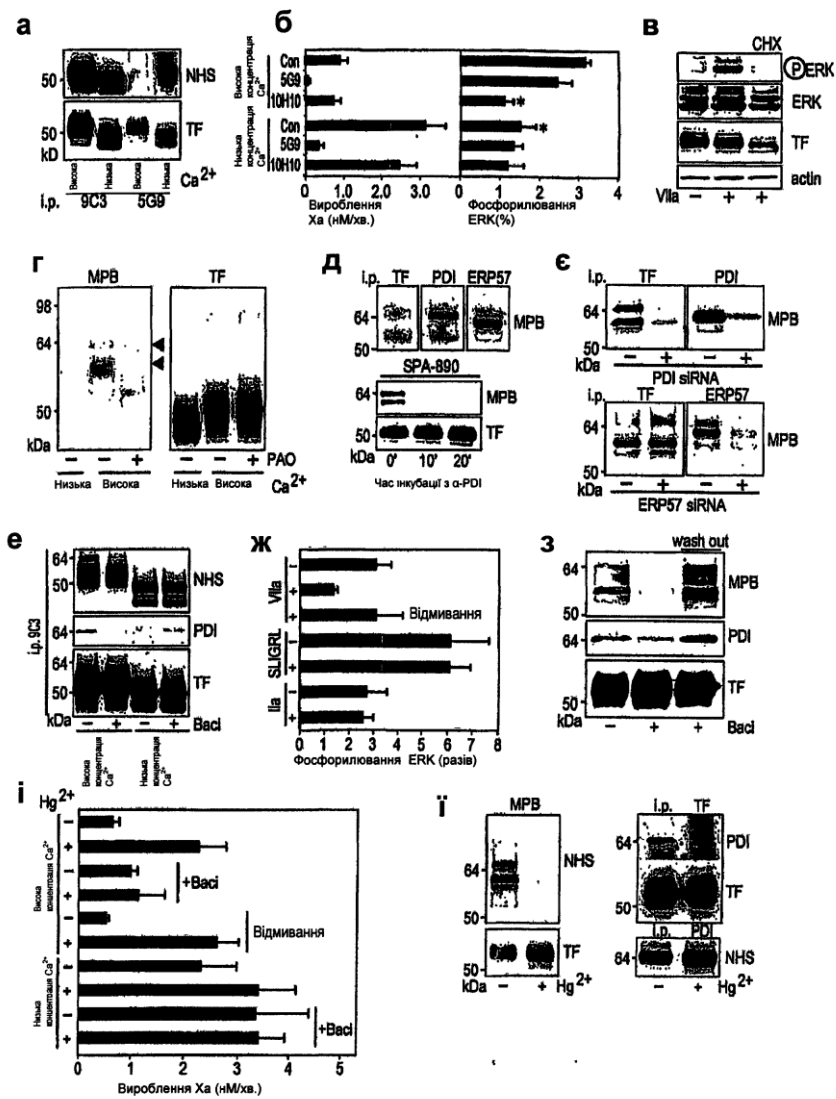
\*\*\*

Усі публікації, послідовності, патенти та патентні заявки, цитовані у цьому описі, повністю включені до нього як посилальні матеріали, як ніби таке зауваження супроводжує кожна окрему публікацію або заявку.

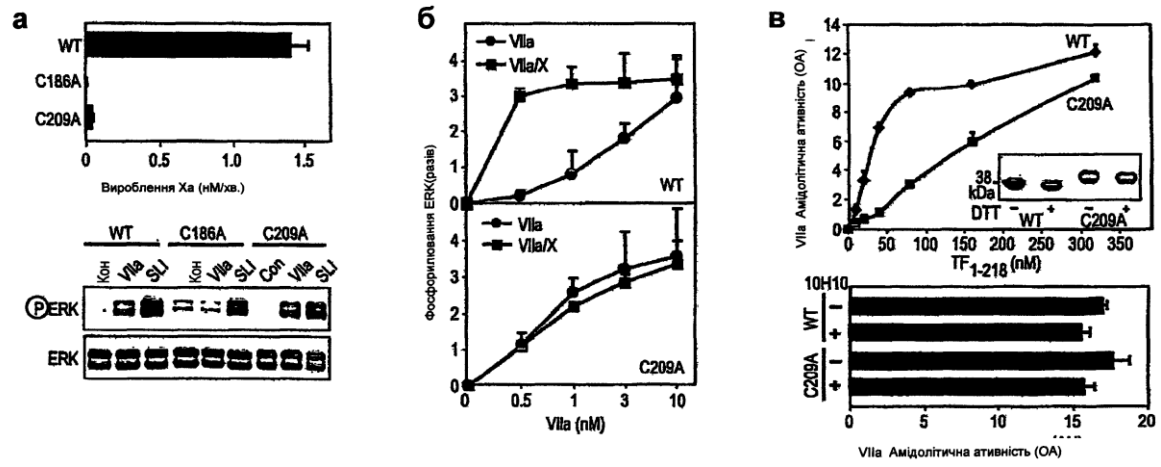
Хоча вищенаведених докладний текст призначений для ілюстрації та кращого розуміння, фахівцям зрозуміло, що у світлі принципів цього винаходу до нього можуть бути внесені різноманітні зміни та модифікації при збереженні сутності винаходу, визначеної його формулою.



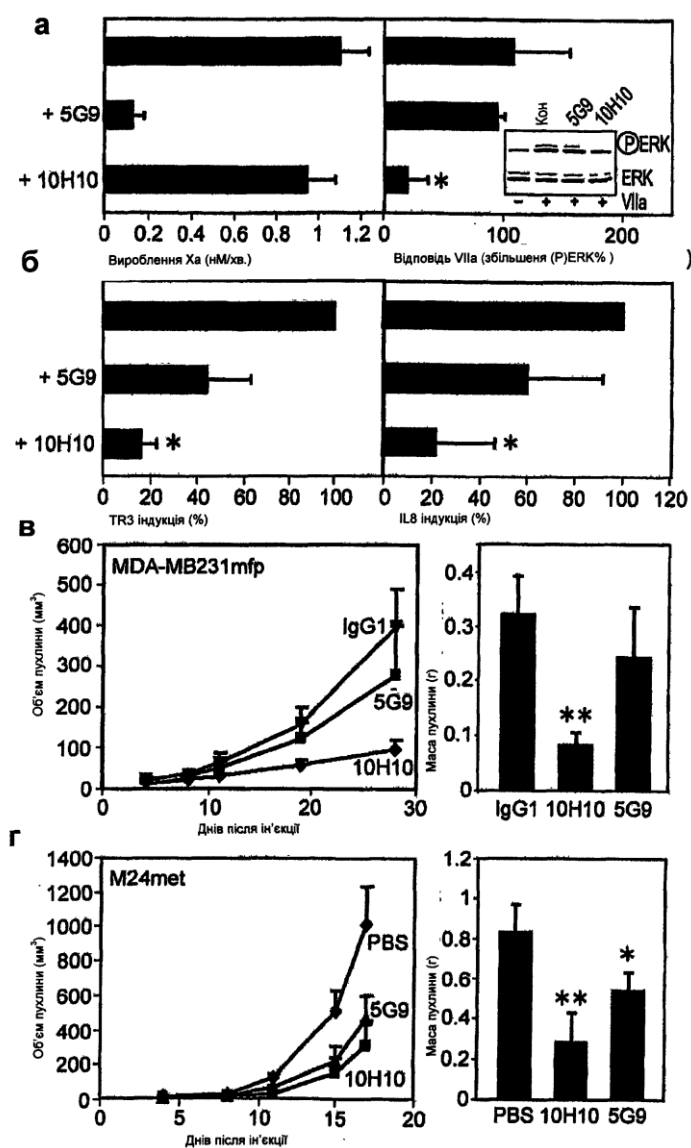
**Fig. 1**



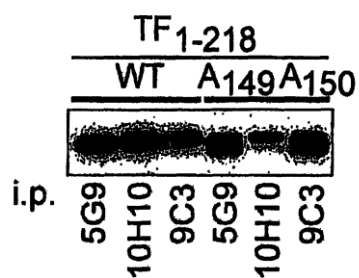
Фіг. 2



Фиг. 3

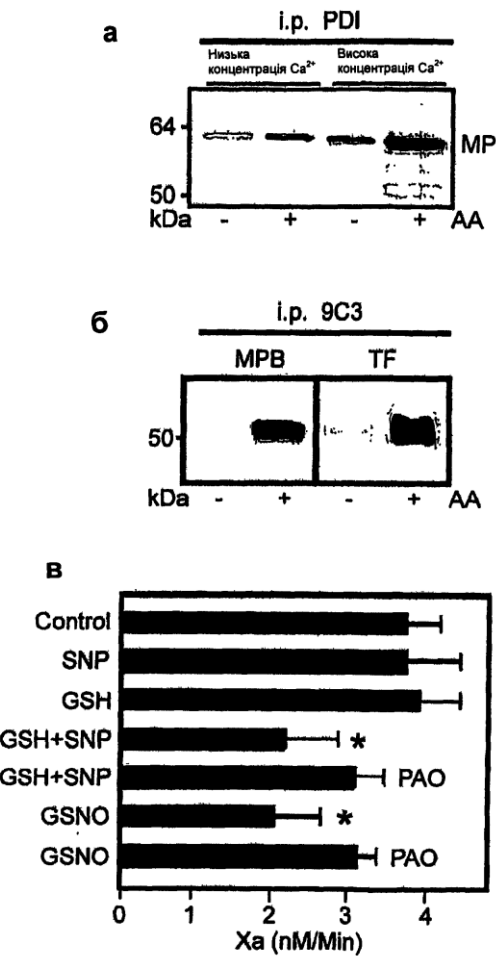


Фиг. 4



Фиг. 5





Фиг. 6

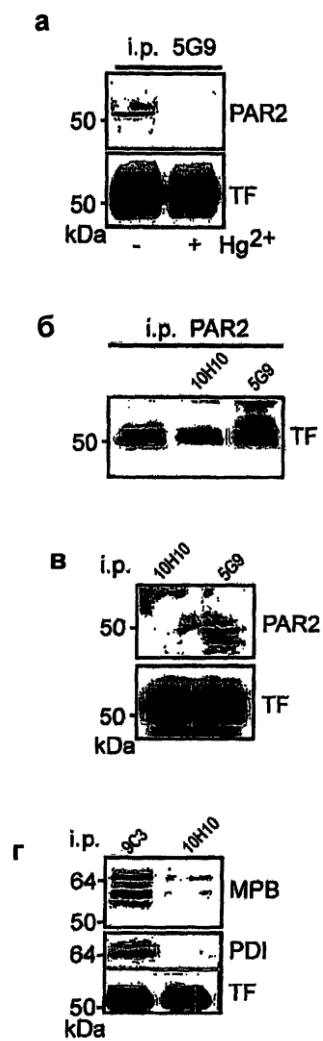


Fig. 7